



**HAL**  
open science

# Sénescence et longévité : des mécanismes aux processus évolutifs : étude chez les oiseaux et les mammifères

Romain Guerreiro

## ► To cite this version:

Romain Guerreiro. Sénescence et longévité : des mécanismes aux processus évolutifs : étude chez les oiseaux et les mammifères. Biologie animale. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS114 . tel-01136699

**HAL Id: tel-01136699**

**<https://theses.hal.science/tel-01136699>**

Submitted on 27 Mar 2015

**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.



BIOGÉOSCIENCES



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement  
UMR CNRS 8262 BioGéoSciences

THÈSE  
Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Biologie évolutive

par Romain Guerreiro

le 14 décembre 2012

Sénescence et longévité :  
des mécanismes aux processus évolutifs  
Etudes chez les oiseaux et les mammifères

Directeur de thèse Professeur Bruno Faivre

Jury :

M. Francois Criscuolo, Chargé de Recherches CNRS, Strasbourg,  
M. Bruno Faivre, Professeur, Université de Bourgogne,  
M. Gabriele Sorci, Directeur de Recherches CNRS, Dijon,  
M. Vincent Staszewski, Laboratoires Merial, Lyon,  
M. Alberto Velando, Professeur, Universidade de Vigo,

Rapporteur  
Directeur  
Président  
Examineur  
Rapporteur

A mon grand-père,  
Et tous les autres héros de ma jeunesse.

# SOMMAIRE

Avant propos .....	1
<b>Chapitre I</b>	
<b>Introduction générale .....</b>	<b>3</b>
<b>1) Origines de l'étude du vieillissement .....</b>	<b>3</b>
<b>2) Mise en évidence du phénomène de vieillissement : de l'Homme aux autres organismes .....</b>	<b>4</b>
<b>3) Les causes du vieillissement : cadre conceptuel.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1) Les causes évolutives .....</b>	<b>5</b>
3.1.1) La théorie de l'accumulation de mutations .....	6
3.1.2) La théorie de la pléiotropie antagoniste (« antagonistic pleiotropy theory ») .....	7
3.1.3) La théorie du soma jetable (« disposable soma theory »).....	8
<b>3.2) Les causes proximales .....</b>	<b>9</b>
3.2.1) La théorie des radicaux libres et le stress oxydant .....	10
3.2.2) Les autres facteurs proximaux du vieillissement .....	13
a) Les théories non-génétiques .....	13
b) Les théories génétiques.....	14
<b>4) Immunité et sénescence .....</b>	<b>14</b>
<b>5) Objectifs de la thèse et démarches adoptées .....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre II</b>	
<b>Matériel et méthodes générales.....</b>	<b>20</b>
<b>1) Les modèles biologiques .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1) Le diamant mandarin.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2) Les autres modèles biologiques .....</b>	<b>23</b>
1.2.1) Le canaris .....	23
1.2.2) Les lignées de souris de laboratoire.....	23
1.2.3) Le hamster doré .....	24
<b>2) Méthodes.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1) Mesures des composantes de la balance redox .....</b>	<b>24</b>
2.1.1) La capacité antioxydante totale.....	24
2.1.2) Les antioxydants circulants .....	25
2.1.3) Les défenses antioxydantes endogènes .....	25
2.1.4) Les dégâts oxydatifs.....	26
<b>2.2) Mesures de composantes immunitaires .....</b>	<b>26</b>
2.2.1) L'oxyde nitrique, effecteur de la réponse inflammatoire .....	26
2.2.2) Les cytokines, autres effecteurs de la réponse inflammatoire .....	27
2.2.3) Les protéines de la phase aigue, marqueurs de l'inflammation....	28

## SOMMAIRE (SUITE)

<b>Chapitre III</b>	
<b>Le rôle des antioxydants sur la sénescence reproductive .....</b>	<b>30</b>
Article 1 .....	33
<b>Chapitre IV</b>	
<b>Conséquences à long terme d'un stress oxydant périnatal d'origine Inflammatoire.....</b>	<b>57</b>
Article 2 .....	60
<b>Chapitre V</b>	
<b>Inflammation et longévité : comparaison entre oiseaux et mammifères.....</b>	<b>80</b>
Article 3 .....	83
<b>Chapitre VI</b>	
<b>La régulation de l'inflammation : perspectives évolutives.....</b>	<b>108</b>
<b>1) Régulation de l'inflammation et âge .....</b>	<b>108</b>
Article 4 .....	111
<b>2) Etude de la forme de la sélection agissant sur des traits immunitaires.....</b>	<b>119</b>
Article 5 .....	121
<b>Chapitre VII</b>	
<b>Synthèse, conclusion et perspectives .....</b>	<b>131</b>
<b>1) Résumé et synthèse des principaux résultats .....</b>	<b>131</b>
<b>2) Limites des approches de cette thèse.....</b>	<b>135</b>
<b>3) Perspectives et pistes de recherches futures.....</b>	<b>137</b>
<b>3.1) Stress oxydant, inflammation         et patrons de sénescence chez les oiseaux .....</b>	<b>138</b>
<b>3.2) Evolution de la régulation immunitaire         et interactions hôtes-parasites.....</b>	<b>140</b>
<b>3.3) Vers une approche intégrative.....</b>	<b>141</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>142</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>153</b>

## **A**vant-propos

L'étude des oiseaux à Dijon est issue d'une longue tradition ornithologique qui trouve ses racines au début du XXème siècle, bien avant l'avènement de l'écologie scientifique. C'est Paul Paris qui fut le premier professeur de Zoologie à s'intéresser aux oiseaux. Avec Henri Jouard, brillant ornithologue amateur, il fonda la société d'étude ornithologique dont le journal *Alauda*<sup>1</sup> fut le bulletin. La communauté ornithologique se consolida et, après-guerre, le CEOB (Centre d'Etude Ornithologiques de Bourgogne<sup>2</sup>) vit le jour dans les nouveaux murs de la Faculté des sciences inaugurée en 1957. De futurs chercheurs de renom tels que Jacques Blondel et Bernard Frochot prirent part à l'aventure aux côtés de Camille Ferry, éminent ornithologue amateur. Le CEOB a connu dès ses débuts un développement rapide comme en atteste la tenue d'un colloque régional en 1962, rencontres qui se poursuivent jusqu'à aujourd'hui (la dernière en date à Dijon s'est déroulée en 2008). La création d'un laboratoire d'écologie a ensuite permis de susciter de nombreuses vocations, comme en témoignent les nombreuses thèses soutenues dans le domaine (ex. Faivre, 1992; Grégoire, 2003; Eraud, 2007), et qui se sont développées jusqu'à aujourd'hui. La présente thèse se veut un prolongement de cet intérêt pour l'étude des oiseaux à Dijon initié il y a presque un siècle. En particulier, j'ai entrepris cette thèse dans la continuité de travaux déjà effectués sur les diamants mandarins au laboratoire par des prédécesseurs tels que Julien Cote, Cyril Eraud, Patrick Gautier ; mais aussi les jeunes chercheurs qui ont travaillé sous la direction de Gabriele Sorci à Paris : Carlos Alonso-Alvarez et Sophie Bertrand. Certains travaux intégrés à

---

<sup>1</sup> <http://www.mnhn.fr/assoc/seof/revue.htm>

<sup>2</sup> Discours de Camille Ferry pour les 50 ans du CEOB : <http://www.cote-dor.lpo.fr/spip.php?article52>

cette thèse ont d'ailleurs débutés en 2006, avant mon arrivée au laboratoire, et se poursuivent actuellement avec le suivi et l'étude d'une cohorte de diamants mandarins.

Je tiens à souligner le fait que ce travail de thèse est le résultat de la convergence de nombreuses énergies et le reflet d'un travail collectif dont je n'ai parfois été qu'une des parties prenantes. C'est un travail qui a demandé à rassembler diverses compétences pour lesquelles des collaborations fructueuses ont été mises en place, notamment avec nos collègues immunologues et physiologistes. De fait, la mise en œuvre d'une approche pluridisciplinaire a été au cœur de cette thèse et c'est un déficit majeur de toutes les recherches actuelles en biologie évolutive qui essaient d'étudier conjointement les bases physiologiques des organismes et les processus évolutifs qui agissent dessus. J'espère que cette thèse aura contribué à créer cette dynamique interdisciplinaire essentielle à la compréhension de nouvelles questions toujours plus stimulantes et toujours aussi fondamentales.

# Chapitre 1

## Introduction générale

### 1) Origines de l'étude du vieillissement

Il n'y a pas de sentiment plus ineffable que l'attente inéluctable de la mort et c'est pourtant la seule certitude que nous aillons en tant qu'êtres humains. Dans nos sociétés modernes, le vieillissement et les maladies associées sont souvent les causes de décès. La vieillesse est en quelque sorte une maladie incurable (Harman 1996).

Toutefois, le vieillissement ne pose pas seulement problème à l'échelle individuelle. Elle présente aussi une vraie problématique sociétale avec des enjeux philosophiques et économiques forts (Ancet et al. 2009). Paradoxalement, c'est avec l'augmentation de l'espérance de vie au cours des derniers siècles que l'Homme a réellement pris conscience de l'importance de ce phénomène et a tenté de l'expliquer.

En effet, grâce aux progrès de la médecine depuis le XVII<sup>ème</sup> siècle et la généralisation des règles d'hygiène avec notamment l'avènement des travaux de Louis Pasteur, l'espérance de vie a connu une augmentation constante, passant de 30 ans en 1750 à près de 80 ans actuellement dans les sociétés occidentales (Oeppen & Vaupel 2002; Finch & Crimmins 2004). L'augmentation de l'espérance de vie a eu comme conséquence directe l'apparition et le maintien dans la population de personnes de grand âge, ce qui ne tarda pas de susciter l'intérêt des scientifiques de l'époque. A titre d'exemple, d'importants travaux sur des phénomènes démographiques furent réalisés par Gompertz (1820, 1825, 1862) pour décrire mathématiquement l'augmentation du risque de mortalité au cours de la vie. D'autres s'intéressèrent aux enjeux médicaux du grand âge comme le Professeur Charcot (1868) avec ses Leçons cliniques sur les maladies des vieillards et les maladies chroniques. D'autres encore se focalisèrent sur les causes physiologiques de la mort par vieillesse (ex. Philip, 1834). Cependant, tous ces travaux restèrent épars et ce n'est qu'avec les progrès de la



génétique et la mise en œuvre de la théorie moderne de l'évolution que la question du vieillissement et de la mort devinrent centrales en biologie, au même titre que celle de l'origine de la vie, du sexe ou de la conscience humaine.

## **2) Mise en évidence du phénomène de vieillissement : de l'Homme aux autres organismes**

Le vieillissement, ou sénescence<sup>3</sup>, est **un processus dont les manifestations externes ou internes se traduisent par le déclin des performances au cours du temps et par la perte de fonctions biologiques menant à la mort de l'organisme** (Kirkwood & Austad 2000; Monaghan et al. 2008).

La définition du vieillissement n'est donc potentiellement pas restreinte à l'Homme même si, pendant longtemps, ce phénomène lui resta uniquement associé pour diverses raisons. En effet, la sénescence se manifeste parfois beaucoup plus subtilement chez d'autres espèces que l'Homme. De plus, on a longtemps cru que les causes de mortalité extrinsèques telles que la prédation, les maladies ou les variations environnementales étaient largement prépondérantes dans la nature, « évitant » ainsi les organismes de vieillir (Comfort 1979; Rose 1991; Kirkwood & Austad 2000). Or, de nombreuses études ont montré depuis que la sénescence opère dans les populations naturelles, grâce à la mise en place de suivis de populations à long terme et à la généralisation de méthodes de captures-recaptures autorisant des analyses poussées à partir des années 1970-1980 (Clutton-Brock & Sheldon 2010).

L'intérêt de ses travaux est d'avoir mis en évidence un déclin concernant différents traits associés à la valeur sélective ou fitness, c'est-à-dire des traits déterminants pour le succès de propagation des gènes dans la population<sup>4</sup>. Les traits mesurés étaient donc soit liés à la survie, soit liés à la reproduction (ex. Moller and De Lope, 1999; Nisbet, 2001; Nussey et al., 2006, 2008). C'est ainsi qu'on a pu montrer dans un premier temps, grâce à des études transversales (voir « Objectifs de la thèse et démarches adoptées » ci-dessous), qu'une augmentation de la probabilité de survie et des performances reproductives avaient lieu dans la première partie de la vie suivie d'un plateau puis d'un déclin en fin de vie (pour une revue : Partridge, 2001; Bronikowski and Promislow, 2005; Forslund and Pärt, 1995). Par la suite, ces résultats ont été confirmés par des suivis longitudinaux grâce à la mise en place d'études à long terme des

---

<sup>3</sup> Au cours de cette thèse, nous utiliserons indistinctement les termes de vieillissement et de sénescence.

<sup>4</sup> Pour une définition claire et synthétique, voir Thomas et coll. (2010)

trajectoires individuelles (ex. Moller and De Lope, 1999; Bryant and Reznick, 2004; Ronce et al., 1998). Les preuves de modifications avec l'âge de divers traits n'ont depuis cessé d'augmenter (pour une synthèse, voir Brunet-Rossinni and Austad, 2006), qu'ils soient liés au comportement (ex. Grotewiel et al., 2005), aux traits sexuels (ex. Torres and Velando, 2007) ou aux grandes fonctions physiologiques que sont le système endocrinien (ex. (Angelier et al. 2006), le système nerveux (ex. Kovács, 2004; Grady and Craik, 2000), le système circulatoire (ex. Ribera-Casado, 1999) et le système immunitaire (ex. Lavoie, 2005).

Une partie majeure du travail sur le vieillissement a donc consisté à décrire le phénomène de déclin des performances, ce que l'on nomme les patrons de vieillissement. Ceci étant, un autre pan de la recherche d'aspect fondamental est l'étude des processus associés à ces patrons. On distingue classiquement, à partir des « quatre questions de Tinbergen » (Tinbergen 1963), deux types de processus : les **causes proximales** qui concernent les mécanismes physiologiques et ontogéniques à l'origine du phénomène et les **causes évolutives** ou ultimes résultant de l'action des forces évolutives telles que la sélection naturelle (Darwin 1859).

### 3) Les causes du vieillissement : cadre conceptuel

#### 3.1) Les causes évolutives

Nous ne présenterons ici que les théories évolutives majeures qui fondent la plus grande partie du travail actuel en recherche évolutive sur le vieillissement. Un certain *nombre d'autres théories ont été développées* depuis, grâce notamment aux progrès constants de la recherche en génétique (Goldsmith 2004). Mais la plupart étant toujours très débattues *et hors de propos pour notre sujet, nous n'en ferons pas l'exposé.*

Le vieillissement a longtemps été considéré comme un phénomène permettant d'accélérer le renouvellement des générations et ainsi d'éviter la compétition entre elles dans un environnement offrant des ressources limitées (Rose 1991). Cependant, la notion de stratégie évolutivement stable, qui est un des apports majeurs de la théorie moderne de l'évolution (Maynard Smith 1982), met à mal cette notion finaliste du vieillissement. En effet, dans une population donnée, tout mutant qui présenterait une longévité accrue produirait plus de descendants par rapport aux autres individus et les formes plus longévives finiraient donc

par l'envahir. Dans ce cas, la stratégie évolutivement stable, celle qui maximise la valeur sélective, semble être la forme immortelle. Or, pour de nombreuses espèces, le processus de vieillissement est la règle plutôt que l'exception. Dès lors, puisque théoriquement la sélection naturelle devrait favoriser les formes de vie de plus en plus longévives, pourquoi le vieillissement existe-t-il ? C'est à partir de ce paradoxe apparent que les travaux de Haldane (1941) inspirés de ceux de Fisher (1930) donnèrent un point de départ aux théories évolutives du vieillissement. En effet, Haldane avait remarqué que des mutations entraînant des maladies dégénératives telles que la chorée de Huntington étaient particulièrement fréquentes dans les populations humaines (1 cas sur 10 000), contrairement à d'autres mutations délétères maintenues à des fréquences beaucoup plus faibles (1 cas sur 8 millions par exemple pour la progeria ou Syndrome de Hutchinson-Gilford). Il souligna également le fait que les maladies dégénératives associées à ces mutations s'exprimaient tardivement, c'est-à-dire après la reproduction, contrairement aux maladies précoces beaucoup plus rares s'exprimant avant la maturité sexuelle comme la progeria. L'expression de ces mutations n'affectant pas la capacité des individus à les transmettre aux descendants, Haldane supposa alors que la force de sélection n'était pas suffisante pour maintenir ces mutations délétères à des fréquences basses. Par la suite, Hamilton (1966) formalisa mathématiquement cette idée selon laquelle la force de la sélection décline aussitôt passé l'âge de la première reproduction. Il prédit que la pression de sélection devenait insuffisante pour maintenir l'aptitude des individus d'âge avancé et que la sénescence était alors inévitable. De plus, la simple disparition progressive des individus exposés aux risques de mortalité extrinsèque (maladies, accidents, prédation) peut suffire à affaiblir la force de sélection agissant sur les classes d'âges avancées. En effet, avec la diminution des effectifs, la contribution des individus âgés aux générations futures, ou **valeur reproductive résiduelle**, diminue (Fisher 1930). La sélection devient alors moins efficace pour éliminer des traits délétères tardifs exprimés chez peu d'individus que les traits délétères exprimés précocement chez beaucoup d'individus.

Par la suite, nous verrons que les théories évolutives du vieillissement qui ont été explicitées se sont toutes appuyées sur l'idée que la force de sélection déclinait avec l'âge.

### *3.1.1) La théorie de l'accumulation de mutations*

A partir des observations de Haldane (1941), Medawar (1952) proposa une théorie qui généralisait l'importance des mutations à effets délétères tardifs sur le vieillissement.

En effet, selon cette théorie, la sélection ne peut éliminer les mutations délétères s'exprimant après l'âge de reproduction de la plupart des individus et prévoit donc l'accumulation au fil des générations de telles mutations à effet tardif dans le génome par simple action de la dérive génétique (Kimura 1968) ou par le jeu d'une balance entre mutation et sélection (Charlesworth 1994), provoquant les maladies associées à l'âge.

Cette théorie reste cependant difficilement testable, et seule l'étude de gènes impliqués dans le vieillissement (ou gérontogènes) chez des espèces modèles comme le vers *Caenorhabditis elegans*, la drosophile ou la souris semble apporter des preuves indirectes de l'existence de ce processus d'accumulation (Guarente & Kenyon 2000; Hasty et al. 2003). De plus, comme nous allons le voir par la suite, la théorie de l'accumulation de mutations et les autres théories évolutives du vieillissement ne sont pas exclusives.

### 3.1.2) La théorie de la pléiotropie antagoniste (« antagonistic pleiotropy theory »)

La théorie de la pléiotropie antagoniste a été proposée par Williams (1957) comme un prolongement de la théorie de l'accumulation de mutations. En se basant également sur la diminution de l'action de la sélection avec l'augmentation de l'âge, Williams suppose l'existence de gènes non seulement porteurs de mutations délétères tard dans la vie mais ayant également un effet bénéfique sur la valeur sélective dans les stades précoces. L'action multiple de gènes est nommée « pléiotropie » en génétique (du grec "pleion", plus, et tropê, changement). Il existerait donc des gènes pléiotropes dont l'action antagoniste, c'est-à-dire favorable précocement puis défavorable tard dans la vie, serait à l'origine du vieillissement observé chez les individus âgés. Cette théorie prédit donc la sélection de gènes favorisant entre autres la fécondité précoce au détriment de la fécondité et de la survie tardive et l'optimisation des traits d'histoire de vie dans le cadre de stratégies évolutivement stables (Maynard-Smith 1978; Stearns 1992).

Plusieurs gènes impliqués dans la reproduction ont été identifiés chez des espèces modèles étudiées en laboratoire comme agissant de manière antagoniste, en conformité avec la théorie de Williams. C'est le cas par exemple du gène *pit 1* qui, une fois muté chez la souris, entraîne un nanisme et des problèmes de reproduction mais allonge considérablement la durée de vie (Flurkey et al. 2001). Récemment des études *in natura* ont également apporté des éléments de validation à cette théorie (ex. Charmantier et al., 2006; Nussey et al., 2006). A titre d'exemple, Charmantier et coll. (2006) ont réussi à mettre en évidence dans leur étude d'une

population de Cygnes tuberculés (*Cygnus olor*) un lien positif entre l'âge de la première reproduction et l'âge de la dernière reproduction. Ainsi, les individus qui investissent tôt dans la reproduction sont aussi ceux qui présentent les premiers signes de déclin reproductif tard dans la vie (ici l'âge de dernière reproduction qui est avancé). De plus, ces deux traits corrélés sont susceptibles d'être héréditaires puisqu'ils présentent aussi une forte variance génétique additive et sont donc potentiellement soumis à la sélection naturelle. Cependant, il reste très difficile avec ce genre de résultats de prouver un lien direct de causalité et nous verrons que ces résultats peuvent aussi être envisagés dans le cadre de la théorie du soma jetable qui met en avant les **compromis d'allocations différentielles** (« trade-offs ») comme source de vieillissement.

### 3.1.3) La théorie du soma jetable (« disposable soma theory »)

Cette théorie doit son nom à Weismann (1893) qui fut le premier à introduire les termes de soma (ou **lignée somatique**) et germen (ou **lignée germinale**) pour distinguer ce qui a trait à la maintenance de l'organisme de ce qui a trait à la reproduction et qui est transmis à la génération suivante.

La théorie du soma jetable proposée par (Kirkwood and Holliday, 1979; Kirkwood and Austad, 2000) est fondée sur la notion de compromis d'allocations différentielles de ressources entre différents traits d'histoire de vie (Stearns 1992). La quantité de ressources dont dispose un individu à un temps donné étant limitée, des compromis apparaissent entre différents **traits d'histoire de vie**, c'est-à-dire l'ensemble des traits impliqués dans la fitness d'un organisme. En particulier, chaque individu va devoir faire des compromis entre des traits liés aux fonctions de maintenance et d'autres traits liés aux fonctions de reproduction. L'optimisation de ces compromis entre maintenance et reproduction va dépendre du coût de chaque trait et de la probabilité de survie. Ainsi, lorsque la probabilité de survie diminue, à cause d'une augmentation de la mortalité extrinsèque (accident, prédation, maladies, etc.) ou d'une faible disponibilité des ressources par exemple, il devient généralement plus avantageux d'investir ses ressources dans la reproduction, au détriment de la maintenance somatique. Le détournement de ressources des fonctions de maintenance et de réparation de l'organisme vers les fonctions liées à la reproduction a pour conséquence l'accumulation au cours du temps de dégâts liés au métabolisme. La reproduction elle-même est source de dégâts dus à l'augmentation du métabolisme lors de cette activité coûteuse (Westendorp and Kirkwood, 1998). Ainsi, le vieillissement peut être le résultat de l'investissement précoce

dans la reproduction plutôt que dans les traits liés à la maintenance. La théorie du soma jetable est souvent considérée comme une déclinaison de la pléiotropie antagoniste de Williams, l'optimisation entre expression précoce et tardive de gènes faisant place à une optimisation entre traits phénotypiques précoces, liés par exemple à la reproduction, et dégâts engendrés ayant des effets tardifs.

Cette théorie trouve de multiples validations empiriques. Par exemple, Péron et coll. (2010) ont montré, à l'aide d'une analyse comparative, qu'une grande partie de la variance de l'âge auquel la probabilité de survie commence à décliner était expliquée par une combinaison de traits reproductifs et de survie précoce. De manière similaire, des travaux ont montré que les conditions de croissance précoce pouvaient grandement affecter les trajectoires individuelles à long terme (Metcalf and Monaghan, 2003; Criscuolo et al., 2008). Nous explorerons ce point particulièrement dans le chapitre IV intégrant également les conséquences à long terme de la réponse inflammatoire (voir point suivant sur « immunité et sénescence »).

Notons que la théorie du soma jetable, en plus de faire un usage fructueux de la théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie, a le mérite de lier les hypothèses évolutives aux causes proximales du vieillissement que nous développerons ci-dessous (notamment voir la partie sur « La théorie des radicaux libres et le stress oxydant »). Cependant, il est important de remarquer que cette théorie n'est pas généralisable aux organismes ne présentant pas de distinction claire entre lignée germinale et lignée somatique et exclut donc d'office de nombreux taxa comme les plantes ou les unicellulaires. Cette restriction n'affectera pas la suite de notre réflexion puisque nous nous sommes concentrés dans notre travail sur des organismes présentant une distinction entre lignée somatique et germinale, et nous nous intéresserons plus particulièrement à des vertébrés homéothermes que sont les oiseaux et les mammifères.

### **3.2) Les causes proximales**

Parallèlement au développement de théories évolutives du vieillissement évoquées ci-dessus, des travaux visant à décrypter les mécanismes physiologiques et cellulaires ont émergé, principalement dans le cadre des recherches biomédicales et biogérontologiques (Kirkwood and Austad, 2000). Une fois de plus, la suite de l'exposé ne se veut pas une présentation exhaustive des différentes théories mécanistiques du vieillissement, la quantité de travail sur le sujet étant particulièrement abondante. Nous nous concentrerons principalement

sur les théories majeures permettant de faire le rapprochement entre les causes évolutives et les causes proximales du vieillissement qui est un des objectifs de cette thèse (voir partie « Objectifs de la thèse et démarches adoptées »).

### 3.2.1) La théorie des radicaux libres et le stress oxydant

Pearl (1928) fut le premier à établir dans le cadre de sa **théorie du taux de vie** (« rate of living ») un lien négatif entre le métabolisme de base et la durée de vie moyenne des espèces. Cependant, les mécanismes responsables de ce lien étaient toujours méconnus. C'est sur cette base que Harman (1956) proposa sa **théorie radicalaire du vieillissement** en se fondant également sur les propriétés nocives des **radicaux libres**, produits en présence d'oxygène, sur les tissus biologiques (Gerschman et al. 1954). En effet, lors du métabolisme aérobie, le dioxygène ( $O_2$ ), qui intervient dans la chaîne respiratoire, forme des molécules dérivées de l'oxygène appelés ROS (pour « Reactive Oxygen Species » ou espèces réactives de l'oxygène) dont les radicaux libres font partie. Les radicaux libres tels que les anions superoxydes ( $O_2^-$ ) ou le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) sont des molécules possédant un électron non apparié ( $\cdot$ ), c'est-à-dire non impliqué dans un doublet d'électrons ou une liaison covalente. Les radicaux libres et autres espèces dérivées de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont des espèces particulièrement réactives capables de s'attaquer aux macro-molécules environnantes telles que les lipides (ex. Beckman and Ames, 1998), les protéines (ex. Augustyniak et al., 2001) et les acides nucléiques (ex. Dizdaroglu et al., 2002), causant parfois d'importants dommages et altérant le bon fonctionnement cellulaire (Finkel & Holbrook 2000). D'après Harman, c'est l'amplification et l'accumulation de ces phénomènes liés au métabolisme oxydant au cours du temps qui pourraient être à l'origine du vieillissement cellulaire et tissulaire. Cette théorie, bien que largement spéculative au départ, trouva de nombreuses validations empiriques par Harman lui-même (Harman 1981) et d'autres (ex. Beckman and Ames, 1998; Lopez-Torres et al., 1993; Muller et al., 2007). Elle peut être considérée comme une théorie majeure du vieillissement (mais voir Fukagawa, 1999).

Les travaux s'intéressant au rôle des radicaux libres mirent très vite en évidence des mécanismes permettant de limiter les effets néfastes du stress oxydatif que l'on nomme **les défenses antioxydantes**. Ainsi, par exemple, la superoxyde dismutase (SOD), qui est une enzyme détoxifiante, fut découverte en même temps que la production d'anions superoxyde (McCord & Fridovich 1969). La SOD avec d'autres métallo-protéines, c'est-à-dire des

protéines possédant des co-facteurs métalliques (comme le cuivre, le zinc, le sélénium), possèdent la capacité de convertir les molécules réactives comme les ROS en espèces moins réactives voire totalement inoffensives. Ces enzymes peuvent être classées dans la catégorie des **défenses endogènes** ou constitutives de l'organisme, au même titre que les systèmes de réparation de l'ADN telle que la glycosylase. D'autres mécanismes interviennent même en amont de la production de radicaux comme les protéines découplantes (« UnCoupling proteins » ou UCP) qui permettent, en inactivant l'ATPsynthase, de garder un état électronique réduit dans la cellule et de réguler la production de ROS par les mitochondries (Criscuolo et al. 2005).

Par ailleurs, des molécules acquises dans l'alimentation permettent aussi de circonscrire les effets du stress oxydatif. Les défenses non-enzymatiques, ou encore **défenses exogènes**, sont constituées de diverses molécules hydrophiles telles que l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, le glutathion, ou des molécules lipophiles telles que les tocophérols (vitamines E), les flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanes, les polyphénols, le lycopène, etc.

Il est à noter que des formes de molécules réactives autres que les ROS existent comme les espèces réactives de l'azote (« reactive nitrogen species » ou RNS) qui sont formées notamment lors du déclenchement de la réaction inflammatoire (Fang 2004). Nous aurons l'occasion de revenir sur leur rôle et leurs conséquences sur le vieillissement par la suite (voir partie sur « immunité et sénescence »).

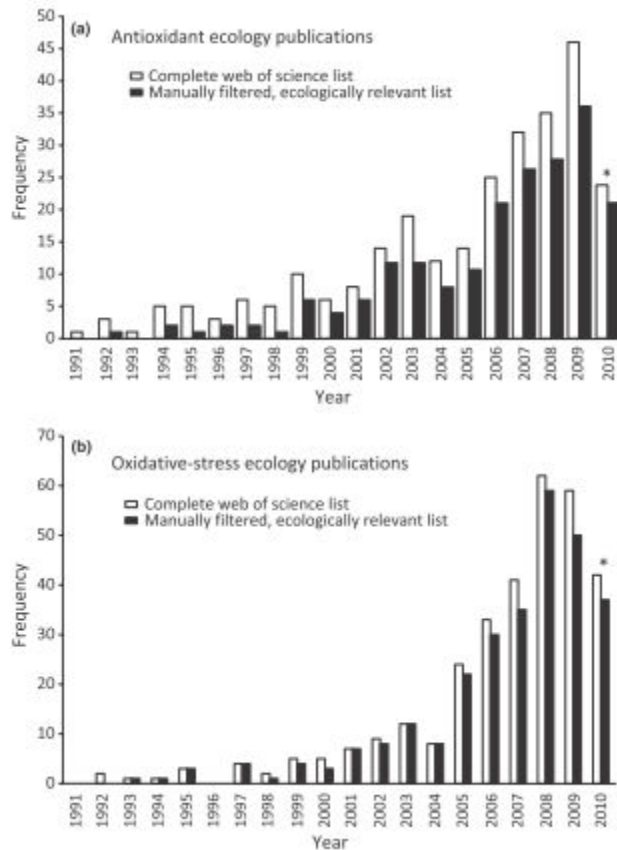
L'homéostasie du système est atteinte lorsque la production de molécules réactives (ROS, RNS) est équilibrée par la mise en place de défenses antioxydantes et de mécanismes de réparation. On parle alors de **maintien de la balance redox** (Finkel & Holbrook 2000). En cas de déséquilibre en faveur des molécules réactives, on parlera d'un **état de stress oxydant** causant les dégâts évoqués plus haut. Ainsi, le vieillissement peut être vu comme la conséquence de l'accumulation de dégâts générés par la production chronique de molécules réactives, mais aussi par un système de protection antioxydante et de réparation défaillant ou insuffisant.

Les recherches visant à tester le rôle du stress oxydant sur le vieillissement ont généralement consisté à modifier une des composantes de la balance redox pour étudier leurs conséquences, soit en supplémentant les individus en antioxydants alimentaires (revue dans Beckman and Ames, 1998), soit au contraire en induisant la production de ROS/RNS (ex. Torres and Velando, 2007), soit par des techniques de génie génétique consistant à stopper l'expression (« Knock Out » ou KO) ou au contraire à surexprimer certains gènes. Ainsi, par exemple, des souris KO pour le gène de l'enzyme SOD ont montré une dégénérescence neuronale précoce



(Muller et al. 2007) alors que des drosophiles portant des copies supplémentaires de gènes codant pour la catalase et la SOD ont vu leur durée de vie allongée de 30% (Jazwinski 1996). En écologie, les chercheurs ont intégré progressivement le stress oxydatif comme une base mécanistique adéquate pour tester des hypothèses dans le cadre de la théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie (voir figure 1 ci-dessous). Ils se sont par exemple intéressés au rôle des antioxydants alimentaires comme des éléments limitants impliqués dans les compromis entre différentes fonctions. En effet, certains de ces composés sont également des pigments comme les caroténoïdes et leurs rôles dans différentes fonctions biologiques comme indicateur des défenses antioxydantes (Hartley & Kennedy 2004), mais aussi l'expression des caractères sexuels secondaires (ex. couleur du plumage, du bec ou d'autres structures) ou la réponse immunitaire en font des ressources clés pour la compréhension des compromis d'allocations entre différents traits d'histoire de vie (Monaghan et al., 2009). Des études comparatives ont également permis de relier les niveaux d'antioxydants circulants et autres défenses antioxydantes avec divers traits d'histoire de vie des espèces considérées (ex. Cohen et al., 2008).

Dans le chapitre III, nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle des antioxydants dans les compromis entre fonctions de maintien (défenses antioxydantes) et fonctions reproductives en étudiant la reproduction de femelles diamants mandarins (*Taenopygia guttata*) de divers âges en fonction de la disponibilité en ressources antioxydantes.



**Figure 1.** L'évolution de la fréquence des publications traitant des antioxydants ou du stress oxydatif en écologie (d'après McGraw et al., 2010 ; tiré du numéro spécial de *Functional Ecology* « The ecology of antioxidants & oxidative stress in animals »)

### 3.2.2) Les autres facteurs proximaux du vieillissement

Le théorie des radicaux libres a mis en avant le stress oxydant comme une cause majeure du vieillissement (Finkel & Holbrook 2000) mais de nombreuses autres théories du vieillissement ont été émises (Medvedev, 1990 en recense plusieurs centaines), dont les mécanismes sous-jacents sont largement interconnectés.

Bien que la discussion concernant leur classification et leur intérêt relatif déborde largement le cadre de cette thèse, évoquons tout de même succinctement certaines de ces théories.

#### a) Les théories non-génétiques

La théorie de l'usure (« wear and tear ») propose que le dysfonctionnement de certains organes associé au vieillissement soit la conséquence de leur usure et de leur non réparation

au cours de l'existence. Toutefois, l'inconvénient de cette théorie est qu'elle ignore largement les mécanismes en jeu au niveau cellulaire, comme le stress oxydant justement.

La théorie de l'accumulation des déchets métaboliques ou de la modification de certaines protéines structurantes comme le collagène (« cross-linking theory »), entraînant une rigidification et une fragilisation des tissus, sont d'autres exemples de théories non-génétiques, et permettent de rendre compte d'un certain nombre de patrons associés au vieillissement. Ceci dit, de manière ultime, toutes ces théories sont liées à des causes génétiques qui fondent l'expression phénotypiques de l'organisme et le vieillissement est, pour ainsi dire, moins le résultat d'une usure ou d'une accumulation de dégâts que d'un non remplacement et une non réparation des parties endommagées, ce qui amène à la question du vieillissement programmé.

#### b) Les théories génétiques

Des théories génétiques du vieillissement ont donc été émises pour comprendre l'origine génétique des changements associés à l'âge et la nature programmée et inéluctable du vieillissement (Hayflick 1998). En particulier, la découverte des mécanismes de réplication avec l'ADN polymérase et surtout la découverte des **télomères et de leur réduction** ont été à l'origine de très nombreux travaux (revues dans Horn et al., 2010). Les télomères sont les parties distales non codantes des chromosomes et les erreurs de réplication au cours des divisions cellulaires pourraient être à l'origine d'une érosion progressive de ces régions, aboutissant in fine à des dysfonctionnements de la cellule, passé un grand nombre de divisions. Ainsi, on a pu relier le rythme de vie (« **pace of life** ») de différentes espèces avec la longueur des télomères, de même qu'on a mis en évidence un lien négatif entre vitesse d'érosion des télomères et durée de vie chez des espèces d'oiseaux (Hausmann et al. 2003). Cependant, de nombreux débats subsistent sur les relations entre le raccourcissement des télomères et l'âge, l'inflammation et le stress oxydatif. Des recherches sont encore nécessaires pour comprendre les implications et les intrications de ces différentes théories.

#### 4) Immunité et sénescence

La réponse immunitaire est une importante fonction biologique et un système complexe de défenses mises en place contre les attaques constantes des parasites. L'immunité a évolué chez de nombreux organismes, des unicellulaires aux vertébrés en passant par les

plantes (Bulet et al. 2004; Jones & Dangl 2006). Chez les vertébrés, on distingue généralement deux types de réponses reposant sur des mécanismes différents mais complémentaires : **l'immunité innée** (ou non-spécifique) et **l'immunité acquise** (ou spécifique).

Le fonctionnement de l'immunité innée repose sur la reconnaissance par des récepteurs de patrons moléculaires exprimés à la surface des parasites appelés PAMPs (pour « pathogen-associated molecular patterns »), qui permettent une fois liés aux PAMPs de déclencher une **réponse inflammatoire** (Janeway & Medzhitov 2002; Akira et al. 2006) au cours de laquelle des produits cytotoxiques vont être sécrétés sur le site de l'inflammation (voir plus bas).

L'immunité acquise repose, quant à elle, sur la production d'un vaste répertoire de lymphocytes reconnaissant des patrons antigéniques spécifiques présentés par les parasites et qui activent un certain nombre d'effecteurs cellulaires, comme les cellules T cytotoxiques, ou moléculaires, comme des protéines antimicrobiennes et les anticorps. L'immunité acquise, en plus de sa spécificité, permet aussi la mise en place d'une mémoire immunologique qui facilite et accentue l'efficacité de la réponse lors de réexpositions ultérieures aux mêmes parasites (Cooper and Alder, 2006).

De nombreuses études, notamment en gérontologie, ont montré un déclin avec l'âge des composantes cellulaires et acquises du système immunitaire (pour une revue voir Malaguarnera et al., 2001). Par exemple, des études ont montré une diminution au cours du temps de certains anticorps, les immunoglobulines IgG et IgA (Paganelli et al. 1992). On observe également une sensibilité accrue des personnes âgées aux maladies infectieuses et une moindre efficacité des vaccins. Ce déclin est également observable chez d'autres espèces comme les oiseaux où l'on a pu montrer une baisse de la réponse à médiation cellulaire (ex. baisse des lymphocytes-T) et/ou humorale (Lavoie 2005), ou chez des invertébrés tels la drosophile (Grotewiel et al. 2005). Mais les changements avec l'âge ne sont pas seulement dus à un déficit de la réponse immunitaire. Parfois, ils consistent plutôt au contraire en une surexpression de certaines composantes comme la réponse inflammatoire qui garde des niveaux élevés. Chez l'Homme, ce phénomène d'inflammation chronique, qualifié d'**inflammaging** (Franceschi et al. 2000) est souvent associé à des pathologies liées à l'âge comme l'athérosclérose, l'arthrite, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, etc. (Chung et al. 2009). Ce lien entre immunité et vieillissement est dû en grande partie au fait que la réponse inflammatoire, en tant que processus non spécifique, est source de dégâts cellulaires à l'origine de nombreux dysfonctionnements que l'on groupe sous le terme de **coûts immunopathologiques**. En effet, suite à une infection, le déclenchement de la réponse

inflammatoire s'accompagne du relargage par les cellules phagocytaires (tels que les macrophages) de nombreux composés cytotoxiques et particulièrement de molécules réactives de l'azote (RNS), comme l'oxyde nitrique (NO), qui peuvent se révéler néfastes à la fois pour les pathogènes présents sur le lieu de l'inflammation, mais aussi pour les tissus de l'hôte par effet collatéral. L'activation de la réponse inflammatoire est sous le contrôle d'un réseau dynamique de cellules et d'effecteurs chimiques appelés **cytokines pro-inflammatoires** comme les interleukines IL-1, IL-6 ou le TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor  $\alpha$  »). La réponse inflammatoire entraîne également une augmentation considérable de l'activité cellulaire, responsable à elle seule d'une poussée métabolique à l'origine de la surproduction de ROS (« **respiratory and oxidative burst** ») (Fang 2004). Ainsi, paradoxalement, la plupart des coûts de l'infection sont considérés comme étant la conséquence de l'inflammation elle-même plutôt que des effets du parasite (Graham et al., 2005).

Face à ces coûts de l'activation de la réponse inflammatoire, des mécanismes de régulation du système sont apparus au cours de l'évolution basés sur la mise en place de **cytokines anti-inflammatoires** qui ont un rôle dans la résolution de la réponse comme l'interleukine-10 (IL-10) ou le TGF- $\beta$  (« transforming growth factor  $\beta$  »).

Les coûts immunopathologiques ont été largement étudiés dans le cadre de recherches biomédicales, dont le choc septique, qui résulte de l'emballement d'une réponse systémique et entraîne un dysfonctionnement généralisé pouvant s'avérer fatal, est la conséquence la plus sévère (Annane et al. 2005). Cependant, les recherches en écologie évolutive n'ont intégré que très récemment ces coûts de la réponse immunitaire non basés sur les ressources dans l'étude des interactions hôtes-parasites (ex. Bertrand et al., 2006; Long et al., 2008; Best et al., 2012). Jusqu'alors, l'attention des chercheurs s'était portée essentiellement sur les coûts énergétiques de l'immunité dans le cadre des compromis d'allocation d'énergie (Sheldon & Verhulst 1996). De plus, l'effet de l'âge en lien avec ces coûts n'a jusqu'à maintenant jamais été discuté dans cette perspective. Or, il s'agit d'un point crucial car, comme cela vient d'être évoqué, un déséquilibre immunitaire en faveur d'un état pro-inflammatoire caractérise le vieillissement. Ceci place l'inflammation et sa régulation au cœur des problématiques du vieillissement, voire de la longévité, comme nous le verrons par la suite.

Nous nous intéresserons en effet aux conséquences sur la fitness des coûts liés à la réponse inflammatoire en fonction de l'âge et plus particulièrement nous montrerons l'importance de la régulation de la réponse dans le chapitre VI (voir article 4). De plus, nous nous intéresserons aux rapports avec les processus micro-évolutifs de traits impliqués à la fois dans l'activation (pro-inflammatoire) et la régulation (anti-inflammatoire) de la réponse dans ce

même chapitre (voir article 5). Nous explorerons également le lien potentiel entre inflammation et longévité chez les oiseaux et les mammifères dans le même chapitre V. Nous verrons enfin dans le chapitre IV comment une stimulation inflammatoire précoce peut influencer la croissance à court terme et la survie à long terme et ainsi discuter l'hypothèse de pléiotropie antagoniste évoquée plus haut avec les théories évolutives du vieillissement (voir également la partie « objectifs de la thèse »).

## **5) Objectifs de la thèse et démarches adoptées**

L'objectif majeur de cette thèse a été d'associer dans un schéma expérimental l'étude de mécanismes fins impliqués dans le vieillissement (stress oxydatif, inflammation) avec les théories évolutives (pléiotropie antagoniste, soma jetable, évolution des traits d'histoire de vie) ; autrement dit d'associer les causes proximales et les causes évolutives de la sénescence. En effet, pendant longtemps, les mécanismes du vieillissement ont été étudiés hors du cadre évolutif et essentiellement chez l'Homme et quelques modèles privilégiés de laboratoire comme la souris, la drosophile ou le vers *Caenorhabditis elegans*. De même, les évolutionnistes ont longtemps ignoré les mécanismes sous-jacents du vieillissement, pourtant potentiellement en prise directe avec les processus évolutifs. Cependant, la dernière décennie a vu une progression significative des travaux associant les mécanismes au cadre écologique et évolutif, particulièrement dans le domaine d'étude de l'écophysiologie du stress oxydatif (voir figure 1 ; Costantini et al., 2010) et le domaine de l'écoimmunologie (Schulenburg et al. 2009). C'est dans cette dynamique que ce travail de thèse veut s'inscrire.

Les études ont été menées en grande partie chez les oiseaux qui sont des organismes remarquables pour l'étude du vieillissement et de la longévité. En effet, leur exceptionnelle durée de vie et leurs taux de vieillissement ralentis malgré des métabolismes et des glycémies élevées par rapport aux mammifères de tailles similaires continuent d'intriguer les chercheurs (Holmes and Martin, 2009; voir chapitre V).

Les travaux sur des diamants mandarins (*Taenopygia guttata*) de différents âges présentés dans le chapitre III ont été réalisés dans la continuité d'expériences déjà effectuées concernant l'importance de la modification de la balance redox sur les compromis entre différentes fonctions au cours de l'âge. Dans une étude précédente, Cote et coll. (2010) avaient en effet exposé des mandarins mâles de différents âges, allant de moins d'un an à 6 ans, à un stress

oxydatif d'origine inflammatoire provoquant des modifications de la balance redox et de l'allocation de caroténoïdes sensibles à l'âge. Ces résultats mettaient ainsi en évidence un effet de la sénescence sur des traits impliqués dans les compromis d'allocation, à savoir la couleur du bec, signal sexuel secondaire chez les mâles, et la capacité antioxydante, fonctions cruciales pour la fitness des individus.

De manière complémentaire, dans cette thèse, nous avons voulu étudier les conséquences de la modification de la balance redox non pas en induisant un stress oxydatif mais cette fois en jouant sur la disponibilité des ressources que représentent les antioxydants alimentaires, augmentant ainsi les défenses antioxydantes. Nous avons ensuite pu étudier les effets de l'abondance de ces ressources sur l'allocation entre fonctions reproductives et défenses antioxydantes en fonction de l'âge (chapitre III). Ces travaux ont été réalisés grâce à la disponibilité d'oiseaux de différents âges qui ont été rassemblés dans une même expérience pour former une **cohorte reconstituée**. Or, cette **approche transversale** présente quelques biais potentiels qu'il faut préciser et que nous évoquerons également dans la discussion des résultats et les limites de cette thèse. En effet, cette méthodologie ne permet pas de s'affranchir des effets éventuels d'une disparition préférentielle de certains phénotypes dans les classes d'âges avancés (van de Pol and Verhulst, 2006). Autrement dit le sous-échantillon des vieux individus n'est pas forcément représentatif de la population de départ et peut influencer les résultats finaux en gommant par exemple le phénomène de sénescence observé dans le cas où les plus âgés seraient des individus particulièrement performants et de bonne « qualité ». De plus, les individus âgés, représentant par définition un sous-échantillon réduit de la population de départ, sont difficiles à acquérir en nombre suffisant au détriment de la puissance et de la complexité des analyses statistiques. Pour parer en partie à ces problèmes, une démarche plus puissante consiste à adopter une **approche longitudinale** permettant un suivi des individus d'une cohorte et la mesure des changements intervenant à l'échelle individuelle, de manière à pouvoir distinguer les effets intra-individuels des effets inter-individuels. C'est la méthodologie qui a été employée dans le chapitre IV, pour étudier les effets d'un stress oxydant d'origine inflammatoire périnatal sur les trajectoires individuelles à plus ou moins long terme (croissance, longévité).

D'autre part, étant donné l'exceptionnelle longévité des oiseaux par rapport aux mammifères de même taille et les débats que suscitent ces différences (pour une revue voir Holmes & Martin, 2009), il nous a paru opportun d'aborder certains mécanismes associés à l'inflammation (potentiellement liée au vieillissement) et en particulier la sensibilité réduite des oiseaux à une inflammation exacerbée, par rapport aux mammifères. Des différences à ce

niveau, encore peu connues chez les oiseaux de manière comparative vis-à-vis d'autres taxons, pourraient expliquer l'apparente lenteur de la sénescence chez les oiseaux et, de manière associée, leur étonnante longévité (voir chapitre V).

Ces approches et la volonté d'explorer les questions associées aux coûts de l'inflammation, à l'emprise possible de la sélection sur son expression et celle de sa régulation en accédant à des mécanismes fins, nous ont amené à travailler sur la souris. En effet, ce modèle classique de laboratoire offre l'accès aux effecteurs de l'immunité que sont par exemple les cytokines pro- et anti-inflammatoires (voir chapitre VI). En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de technique permettant de mesurer in vivo la plupart des marqueurs spécifiques tels que les cytokines chez les oiseaux à l'exception notable du poulet. Les opportunités techniques offertes par le modèle souris compensent la dimension réductionniste des expériences réalisées sur des animaux de laboratoire et offrent des perspectives stimulantes.



## Chapitre II

### Matériel et méthodes générales

Pour lier les questions évolutives et les mécanismes physiologiques sous-jacents, une **approche pluri-disciplinaire** est nécessaire. Nous nous sommes efforcés de la mettre en œuvre dans cette thèse en associant des techniques de biochimie, de biologie moléculaire, d'immunologie et de biostatistiques détaillées dans les parties ci-dessous ainsi que dans les différents chapitres qui suivent.

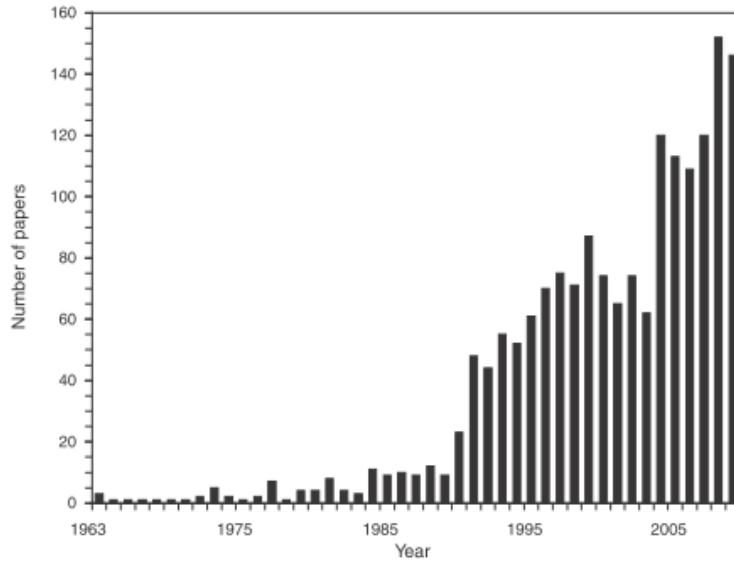
La totalité des travaux a été réalisée sur des animaux maintenus en **captivité**, dans des **conditions expérimentales**, de manière à contrôler au maximum des variables confondantes telles que la densité, les variations climatiques et du cycle nyctéméral, les variations alimentaires, l'exposition aux maladies, aux prédateurs, etc. Ce cadre a l'avantage de standardiser au mieux les conditions pour se concentrer sur l'étude à une échelle fine des mécanismes et permet d'avoir accès à un nombre suffisant d'individus atteignant des âges avancés pour exécuter des analyses statistiques poussées. De plus, cela permet de répéter les expériences, ce qui n'est que trop rarement fait en écologie, notamment dans un but comparatif (voir par exemple chapitre V). Cependant, nous sommes également conscients que cette approche introduit un certain nombre de biais et artéfacts par rapport aux conditions naturelles beaucoup plus restreintes et limitantes et nous restons donc prudents quant à la généralisation de nos résultats à des populations naturelles, même si certains travaux tendent à minimiser les différences (ex. Tschirren et al., 2009).

## 1) Les modèles biologiques

### 1.1) Le diamant mandarin

Le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) est une espèce d'oiseau granivore d'une dizaine de centimètres de la famille des Estrildidés. Le diamant mandarin s'est imposé comme un des oiseaux domestiques les plus populaires dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Il était alors massivement importé d'Australie, son pays d'origine. Ce n'est qu'en 1960 qu'un terme fut mis à son exportation et que des souches totalement domestiquées firent leur apparition en Europe. Dans la nature, ces oiseaux vivent en larges groupes sociaux, se nourrissant, se perchent et nichent à proximité les uns des autres. Les steppes ouvertes avec des arbres et buissons dispersés constituent leur habitat typique mais il n'est pas rare de les rencontrer à proximité de l'Homme, tirant ainsi partie de l'anthropisation de leur habitat naturel pour trouver des sources d'alimentation et des lieux pour se reproduire (Zann 1996). Ce sont également des animaux relativement faciles à maintenir en captivité, peu sensibles aux dérangements humains, capables d'initier des reproductions durant toute l'année et d'enchaîner plusieurs reproductions, ce qui en fait un modèle privilégié pour de nombreuses recherches sur le comportement et la physiologie des oiseaux, ce que confirme la forte augmentation du nombre de publications leur étant consacrées depuis les années 1960 (voir figure 2 ci-dessous).

Dans la nature, la reproduction est généralement initiée par une abondance en ressources déclenchée simultanément par d'importantes précipitations. En captivité, la reproduction peut être stimulée par l'apport de végétaux tendres (salade, jeunes pousses, graines germées) et de compléments alimentaires divers. La ponte est typiquement constituée de 4 à 6 œufs avec une fréquence de ponte d'un œuf par jour. L'incubation est assurée par la femelle et par le mâle, bien que seule la femelle dispose de plaques incubatrices, et dure en moyenne 15 jours. Après l'éclosion successive de tous les jeunes (c'est-à-dire asynchrone), les poussins continuent leur développement au nid jusqu'à leur envol à 3 semaines. Progressivement les caractères sexuels secondaires apparaissent (couleur du bec, plumage) et ils atteignent la maturité sexuelle entre 60 et 100 jours (Zann 1996).



**Figure 2.** Nombre d’articles publiés par an de 1963 à maintenant, à partir d’une recherche bibliographique sur la base de données ISI Web of Science combinant les mots « zebra » et « finch » (d’après Simon C. Griffith and Buchanan, 2010).

Même si dans la nature la majorité des individus meurent rapidement, certains individus peuvent atteindre 5 ans ou plus (Zann, 1996). La durée de vie en captivité peut atteindre 5 à 7 ans (Burley 1985) et le maximum de longévité enregistré chez cette espèce est de 14 ans (base de données AnAge ; De Magalhaes and Costa, 2009).

Le diamant mandarin constitue le modèle central de cette thèse. Ceci dit, d’autres modèles biologiques, notamment des micromammifères, ont été employés à des fins de comparaison ou pour des raisons de disponibilité des outils moléculaires adéquats pour répondre à certaines questions à l’heure actuelle inaccessibles chez les oiseaux. Il convient donc de les présenter également succinctement.

## 1.2) Les autres modèles biologiques

### 1.2.1) Le canari

Le canari, ou serin des Canaries, (*Serinus canaria*) est un petit passereau granivore d'une dizaine de centimètres de la famille des Fringilidés. Il est originaire des îles Canaries ainsi que d'autres îles de Macaronésie (ex. Madères, Açores), d'où il tire son nom. Il fut élevé en captivité dès le XVII<sup>ème</sup> siècle pour la beauté de son plumage, ce qui donna lieu à de nombreuses sélections et hybridations. Il fut également très tôt remarqué pour son chant qui donna lieu à de nombreuses recherches, notamment en neurobiologie.

Comme d'autres espèces populaires d'oiseaux domestiques, le canari peut facilement se reproduire tout au long de l'année si son cycle nyctéméral est correctement manipulé (12-14 heures de jour).

Concernant la longévité de cette espèce, il est généralement admis que les canaris peuvent vivre plus de 10 ans, avec un record de longévité rapporté à 24 ans (base de données AnAge ; De Magalhaes and Costa, 2009).

### 1.2.2) Les lignées de souris de laboratoire

La souris domestique (*Mus musculus*) est un rongeur de la famille des Muridés. Cette espèce a été traditionnellement utilisée comme modèle biologique dans un très grand nombre de recherches. Elle s'est imposée grâce à son cycle de vie court qui permet d'avoir accès rapidement à plusieurs générations, à la facilité et au faible coût de son élevage et à sa proximité avec l'Homme.

Chez la souris, la reproduction peut avoir lieu toute l'année. Les individus atteignent la maturité sexuelle entre 5 ou 6 semaines et peuvent être mis en reproduction dès 8 semaines. Chez les femelles, la gestation dure 18 à 21 jours. Les portées sont typiquement de 5 à 12 souriceaux qui naissent aveugles et glabres. Ils sont nourris par le lait de la mère jusqu'au sevrage, à 3 semaines. Les femelles peuvent alors ré-enchaîner une nouvelle reproduction.

La longévité de la souris est en moyenne de 2 à 3 ans, pouvant aller jusqu'à 4 ans (base de données AnAge ; De Magalhaes and Costa, 2009).

Deux lignées de souris ont été employées dans cette thèse : la lignée C57 black 6 (C57BL/6) et la lignée Swiss, toutes deux issues de la souris domestique. Ces lignées ont été employées dans cette thèse essentiellement pour leur robustesse, leur capacité reproductrice et pour la

connaissance approfondie de leur physiologie, notamment concernant les processus d'inflammation. Il est à noter que la lignée C57BL/6 est une lignée consanguine (« inbred strain ») alors que la lignée Swiss est une lignée non-consanguine (« outbred strain ») par conséquent beaucoup plus hétérogène d'un point de vu génétique.

### 1.2.3) Le hamster doré

Le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) est un petit rongeur de la famille des Muridés, originaire du Moyen-Orient (Syrie, Turquie). C'est un animal d'une dizaine de centimètres pour une centaine de grammes (100 à 150g). C'est une espèce vivant originellement dans des régions de plateaux arides mais qui fut introduite avec succès comme modèle de laboratoire dès les années 1930.

Leur durée de vie en captivité varie de 2 ans et demi à 3 ans, allant jusqu'à presque 4 ans (base de données AnAge ; De Magalhaes and Costa, 2009).

## 2) Méthodes

### 2.1) Mesures des composantes de la balance redox

Il existe plusieurs composantes qui conditionnent l'équilibre de la balance redox : la production de radicaux libres, les défenses antioxydantes et les mécanismes de réparation (Surai 2002). La mesure de production de radicaux et de l'activité de réparation nécessite des techniques invasives comme le prélèvement d'organes et restent par conséquent peu accessibles et d'un intérêt limité pour les chercheurs en écologie (Cohen et al., 2007). En revanche, les mesures des différentes composantes des défenses antioxydantes sont beaucoup plus faisables et commodes. Elles incluent des mesures de la **capacité antioxydante totale**, de différents **antioxydants circulants** et des **enzymes détoxifiantes** telle que la glutathione peroxydase (GPx), la super oxyde dismutase (SOD) ou la catalase.

#### 2.1.1) La capacité antioxydante totale

C'est une mesure fonctionnelle globale de la capacité des antioxydants circulants à neutraliser les radicaux libres. Le dosage consiste à mesurer la couleur émise par un

chromogène sensible à la présence de radicaux libres. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le chromogène vire au bleu-vert. Ainsi, plus l'échantillon sera concentré en antioxydants, plus le  $H_2O_2$  sera neutralisé et moins le virage coloré sera prononcé. La mesure d'absorption de l'échantillon est comparée à une gamme standard utilisant un composé aux propriétés antioxydantes connues, proche de l' $\alpha$ -tocophérol (ou vitamine E) : le trolox (pour plus de détails, voir section « material and methods » de l'article 1).

### 2.1.2) Les antioxydants circulants

La quantification des antioxydants circulants est une mesure plus spécifique des défenses antioxydantes exogènes et permet particulièrement d'étudier le devenir d'éléments intégrés au système dans le cadre d'expériences de supplémentation en antioxydants (voir chapitre III). Différentes techniques existent comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (ou HPLC) pour mesurer des antioxydants tels que la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, l'acide urique. Cependant, la quantité d'échantillons disponible est souvent une contrainte limitant le nombre de mesures faisables de manière fiable. C'est pour cette raison que nous nous sommes limités au dosage du **sélénium** employé dans l'article 1.

La quantification du sélénium, en tant qu'oligo-élément présent en faible quantité dans le plasma, nécessite l'utilisation d'un spectrophotomètre à absorption atomique largement utilisé dans l'étude des transferts d'éléments en écotoxicologie (ex. Bischoff et al., 2002; Savinov et al., 2003). Le dosage nécessite d'abord une minéralisation acide de l'échantillon de manière à transformer le sélénium présent sous diverses formes en borohydrure de sodium ( $NaBH_4$ ) avant d'être chauffé dans une cellule le réduisant ainsi en sélénium élémentaire. Une mesure est ensuite effectuée par spectrophotométrie à absorption atomique après calibration de l'appareil (pour plus de détails, voir la section « material and methods » de l'article 1).

### 2.1.3) Les défenses antioxydantes endogènes

Evoquons par ailleurs rapidement les mesures des **défenses endogènes** ou défenses enzymatiques qui consistent à mesurer l'activité réductrice d'enzymes détoxifiantes contenues dans les cellules sanguines telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathione peroxydase (GPx) ou la catalase. Nous ne détaillerons pas les techniques existantes pour

mesurer ces activités antioxydantes puisque nous ne présenterons pas de résultats relatifs à ces défenses antioxydantes particulières dans cette thèse.

#### 2.1.4) Les dégâts oxydatifs

Une autre mesure pertinente relative au stress oxydatif consiste à quantifier les dégâts occasionnés lors de la poussée oxydative (ou « oxidative burst »). On mesure classiquement les TBars (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) qui sont des molécules issues de la **peroxydation des lipides** (Poubelle et al. 1982). Les TBars comprennent principalement le malondialdéhyde mais aussi d'autres aldéhydes et des carbonyles issus de carbohydrates. Le principe du dosage repose sur la mesure colorimétrique d'un complexe formé de TBars et d'acide thiobarbiturique (TBA) sous haute température (90-100°C) et en condition acide. Les mesures des échantillons sont comparées à une gamme standard de malondialdéhyde (pour plus de détails, voir section « material and methods » de l'article 2).

## 2.2) Mesures de composantes immunitaires

L'activation expérimentale du système immunitaire inné et la quantification de la réponse produite permettent de mesurer une réponse fonctionnelle sans les effets confondants induits par le pathogène lui-même lors de l'exposition (Graham et al., 2010).

Une technique très utilisée consiste à injecter dans la cavité intra-péritonéale ou de manière intraveineuse un antigène constitué de lipopolysaccharides (LPS) bactériens tels que ceux d'*Escherichia coli*. L'exposition à un **challenge immunitaire** au LPS déclenche une réponse inflammatoire au cours de laquelle les macrophages et les hétérophiles produisent de l'oxyde nitrique (**NO**) qui possède notamment des propriétés cytotoxiques pour vaincre les pathogènes (Fang 2004). La quantification de cet **effecteur de l'inflammation** permet donc d'avoir une mesure directe de l'intensité de la réponse suite au challenge.

#### 2.2.1) *L'oxyde nitrique, effecteur de la réponse inflammatoire*

Il existe différentes techniques pour mesurer l'oxyde nitrique circulant (revue dans Archer 1993). Parmi toutes ces techniques, Le **dosage colorimétrique par la réaction de Griess** a l'avantage d'être validé à la fois sur des modèles aviaires et mammaliens (ex. Sild

and Horak, 2009 pour les oiseaux; Jesch, 1998 pour les mammifères). Cette technique consiste à mesurer les formes oxydées plus stables du NO, c'est-à-dire les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). Une phase de déprotéinisation de l'échantillon de plasma puis de réduction des nitrates en nitrites est nécessaire avant la réaction menant au dosage lui-même. La formation d'un composé coloré par ajout des réactifs de Griess permet ensuite une estimation fiable de la quantité de NO de l'échantillon par mesure spectrophotométrique (pour plus de détails, voir section « material and methods » de l'article 3).

### 2.2.2) Les cytokines, autres effecteurs de la réponse inflammatoire

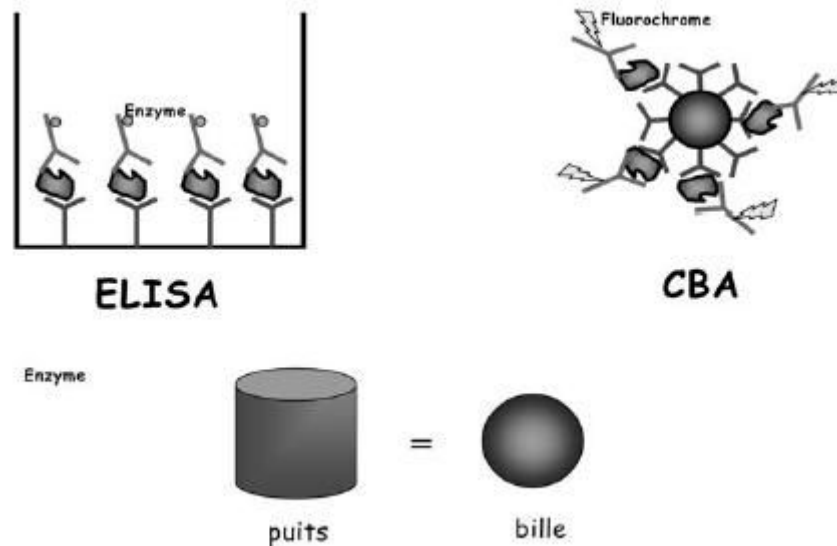
Les **cytokines** sont d'autres effecteurs de la réponse inflammatoire qui ont un rôle plus spécifique de médiateurs. Les cytokines Th-1 (ou **cytokines pro-inflammatoires**), incluant les interleukines telles que l'IL-6 mais aussi le TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor alpha») ou l'IFN- $\gamma$  (« interféron- $\gamma$  »), stimulent la prolifération de cellules telles que les lymphocytes ou les phagocytes et contrôlent leur cytotoxicité. Par ailleurs, les cytokines Th-2 (ou **cytokines anti-inflammatoires**), incluant plusieurs interleukines telles que l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10 induisent la production d'anticorps, l'activation des granulocytes éosinophiles, la dégranulation des mastocytes et plus généralement participent à la résolution de la réponse inflammatoire.

Il existe plusieurs techniques de mesures de cytokines, qui incluent des tests commerciaux de type ELISA et des mesures utilisant la cytométrie en flux. Cette dernière technique, appelé CBA (pour « cytometric bead array »), a l'avantage d'utiliser peu d'échantillons de plasma, permet de faire des mesures multiplexées (c'est-à-dire que plusieurs effecteurs sont mesurés simultanément) tout en étant d'une plus grande précision et d'un moindre coût (ex. Lizard, 2003; Prunet et al., 2006; Nolan and Mandy, 2006).

Tout comme le test ELISA, le CBA est basé sur l'utilisation d'une **technique immunochimique** où la détection de la molécule d'intérêt se fait par la formation d'un complexe formé d'un anticorps de capture, d'un anticorps de révélation et d'un antigène (la molécule d'intérêt) pris en sandwich entre les deux. La différence entre les deux techniques réside dans l'utilisation de **micro-billes** qui constituent le substrat où se fixent les molécules d'intérêt et qui correspondent aux puits des micro-plaques utilisés dans les tests ELISA (voir figure 3 ci-dessous). De plus, les anticorps de révélation sont eux-mêmes couplés à un fluorochrome (généralement la phycoérythrine ou PE) ou lieu d'une enzyme dans les tests ELISA. Ainsi, plus la quantité d'analyte, ou molécule d'intérêt, est importante dans



l'échantillon, plus la quantité fixée sur les billes sera grande et plus la fluorescence sera forte (voir section « material and methods » de l'article 5 pour plus de détails). L'utilisation concomitante de plusieurs billes de tailles ou fluorescences différentes permet la mesure simultanée de plusieurs molécules d'intérêt (mesures multiplexées).



**Figure 3.** Comparaison entre méthode ELISA et méthode CBA (Cytometric Bead Array).  
Figure tirée de Lizard (2003).

### 2.2.3) Les protéines de la phase aigue, marqueurs de l'inflammation

Une autre mesure permettant de quantifier l'intensité de la réponse inflammatoire consiste à doser les **protéines de la phase aigue de la réponse** (« acute phase proteins ») dont la concentration augmente en réponse à l'infection. Ces protéines sont sécrétées en majeure partie par les hépatocytes suite à leur stimulation par des cytokines pro-inflammatoires relarguées dans la circulation sanguine. Parmi ces protéines, on compte l'haptoglobine, les protéines C-réactives (CRP) ou le sérum amyloïde A (SAA). Elles ont des fonctions dans la restauration de l'homéostasie et la limitation de la prolifération microbienne. Leur concentration est généralement représentative de la sévérité et des dégâts causés par la réponse et c'est pour cette raison que leur dosage a souvent été utilisé comme diagnostic inflammatoire (Murata et al. 2004).

L'**haptoglobine** est une de ces protéines qui est considérée comme un bon marqueur d'inflammation utilisé à la fois dans des études aviaires et mammaliennes (ex. (Fagoonee et al. 2005; Millet et al. 2007; Huntoon et al. 2008; Matson et al. 2012). C'est une constituante de l'alpha-globuline, qui se lie à l'hémoglobine circulant librement dans le plasma suite à l'éclatement d'hématies, empêchant ainsi son action oxydative envers les lipides et protéines environnantes ou sa réutilisation par les pathogènes (Gutteridge 1987; Dobryszczyka 1997).

La quantification de l'haptoglobine peut être réalisée grâce à l'utilisation de kits commerciaux colorimétriques (TP801; Tri-Delta Diagnostics, NJ, USA) basés sur la variation à faible pH de l'activité peroxydase de l'hémoglobine en fonction de la quantité d'haptoglobine présente dans l'échantillon (voir section « material and methods » des articles 2 et 3 pour plus de détails).

Le **sérum amyloïde A** (SAA) est une apolipoprotéine conservée au sein des mammifères qui peut également être quantifiée à l'aide de tests ELISA classiques (voir figure 3 ; Mouse SAA, KMA0011, Invitrogen) impliquant la coloration de complexes liant des anticorps anti-SAA avec les antigènes correspondants (SAA) mesurés au spectrophotomètre (voir aussi section « material and methods » de l'article 4).

## Chapitre III

### Le rôle des antioxydants sur la sénescence reproductive

Le vieillissement est un phénomène général observable à l'échelle des populations (Brunet-Rossinni & Austad 2006) et qui est défini comme un déclin des performances individuelles (Monaghan et al. 2008).

Loin d'être paradoxal, selon la théorie évolutive (voir introduction générale), le vieillissement est considéré comme le résultat de l'optimisation des compromis entre différents traits d'histoire de vie (Williams 1966; Stearns 1992). Cependant, les bases mécanistiques qui contraignent ces combinaisons de traits d'histoire de vie ont longtemps été ignorées par les évolutionnistes (Ricklefs and Wikelski, 2002). Le stress oxydatif est un des mécanismes physiologiques principaux qui exercent une contrainte permanente sur les traits d'histoire de vie et qui est aussi une cause majeure du vieillissement (Finkel & Holbrook 2000). En effet, le métabolisme aérobie est à l'origine de la production de radicaux libres qui est la source inévitable de dégâts oxydatifs qui ne peuvent être contrôlés que par la mise en œuvre efficace de défenses antioxydantes et autres mécanismes de réparation. Or, ces défenses antioxydantes sont pour partie une ressource limitante acquise dans l'alimentation (défenses exogènes). Les antioxydants vont donc être potentiellement impliqués dans des compromis d'allocations entre différentes fonctions cruciales pour la fitness.

Les modèles issus de la théorie des traits d'histoire de vie prédisent également que ces compromis d'allocation en ressources devraient être modifiés au cours de la vie des individus du fait de la diminution avec l'âge de la valeur reproductive résiduelle et de la probabilité de survie (Pianka & Parker 1975; Stearns 1992). Cette logique débouche sur la théorie de l'investissement terminal qui prédit que les individus très âgés n'ayant qu'une faible probabilité de reproduction future devraient investir leurs dernières ressources dans la

reproduction au détriment de la survie (Clutton-Brock, 1984). Alternativement, le phénomène de sénescence pourrait gommer, voire inverser, cette tendance en entraînant une baisse des performances reproductives chez les plus âgés incapables de mobiliser les ressources disponibles ou souffrant de coûts trop élevés proportionnellement à leur investissement reproducteur.

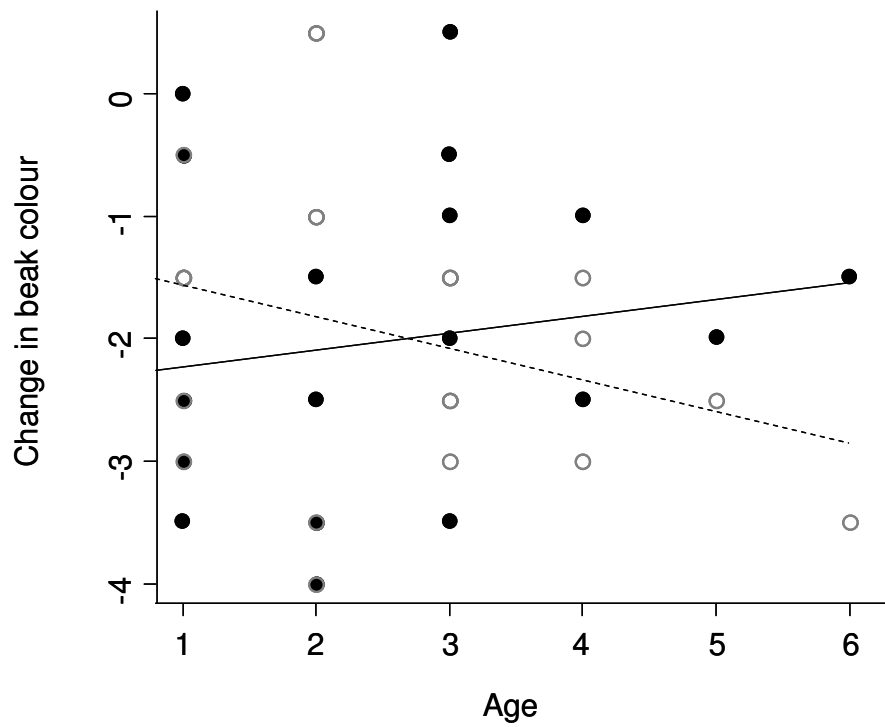
Ces liens entre coûts reproductifs et investissement reproductif en fonction de l'âge et l'importance de ressources clés telles que les antioxydants ont rarement été pris en compte dans des études précédentes. Nous avons exploré ces liens dans le prolongement de travaux déjà élaborés en ce sens (ex. Cote et al., 2010) mais intégrant ces nouvelles dimensions. Nous avons étudié ces différentes composantes en réalisant une expérience sur une cohorte reconstituée de diamants mandarins femelles de différents âges, allant de 1 à 6 ans, supplémentés en antioxydants (mélange de vitamine C, E et sélénium) afin d'augmenter la disponibilité des défenses antioxydantes avant la reproduction, étape clé en terme de fitness mais également très coûteuse métaboliquement.

Nous avons trouvé principalement des preuves de sénescence reproductive avec le nombre d'œufs pondus qui diminuait et le délai de ponte qui augmentait en fonction de l'âge des femelles. Nous avons également trouvé que l'effort reproductif, en termes de nombre d'œufs pondus, tendait à avoir des répercussions négatives sur la capacité antioxydante particulièrement chez les vieux individus.

D'autre part, nous avons observé que la disponibilité en antioxydants permettait d'amortir les coûts de la reproduction visibles à travers la baisse de couleur du bec qui peut être considérée comme un indice de condition générale des individus. En effet, la baisse de l'indice de coloration avait tendance à être moins prononcée chez les traités que chez les contrôles.

Enfin, la disponibilité en antioxydant au cours de la reproduction a eu pour effet de gommer en partie la sénescence reproductive visible à travers la diminution du délai de ponte et la baisse moins marquée de coloration du bec chez les vieux individus traités.

Bien que moins puissante qu'une étude longitudinale (voir plus haut section « objectifs de la thèse et démarches adoptées »), notre étude, menée sur une cohorte reconstituée de diamants mandarins en captivité, met donc en évidence des signes de sénescence reproductive plutôt qu'un investissement terminal. De plus, cette sénescence reproductive est en partie gommée par la disponibilité de certains antioxydants alimentaires, ce qui suggère que ce sont des ressources clés qui peuvent influencer les compromis entre reproduction et survie au cours de l'âge, en agissant notamment sur les coûts reproductifs.



**Figure 4 de l'article 1.** Changement d'intensité de la couleur du bec au cours de la reproduction (les valeurs négatives indiquent une perte d'indice) en fonction de l'âge des femelles chez les supplémentés en antioxydants (ronds noirs, ligne pleine) et les contrôles (cercles gris, ligne discontinue).

# Article 1

## **Antioxidant supplementation reduces reproductive senescence in female zebra finches (*Taeniopygia guttata*)**

(En préparation)

# **Antioxidant supplementation reduces reproductive senescence in female zebra finches (*Taeniopygia guttata*)**

Romain Guerreiro<sup>1\*</sup>, Emilie Arnoux<sup>1</sup>, Nadia Crini<sup>2</sup>, Gabriele Sorci<sup>1</sup> and Bruno Faivre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BioGéoSciences, CNRS UMR 6282, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup>Université de Franche-Comté, UMR CNRS Chrono-environnement, Besançon, France

\*E-mail : romain.guerreiro@u-bourgogne.fr

**Short-title:** Antioxidants and reproductive senescence.

## **Abstract**

Senescence is a general phenomenon defined as an individual decline of performances with age. Several studies now report such age-related changes in reproductive performances with age in nature. Reproductive performances are influenced by resources allocation to reproduction. These resources are limited and are expected to be traded-off with other fitness related-functions in iteroparous species such as somatic maintenance. As reproductive performance generally decline with age, we also expect resources to be crucial in late-life. In particular, dietary antioxidants, because of their role of defences against oxidative stress damage, might be key resources to counteract reproductive costs. To explore the role of antioxidant in reproduction through age, we supplemented female zebra finches (N=56) of different ages (1 to 6 years) with dietary antioxidants before allowing them to reproduce. Prior to reproduction we found no sign of senescence but we found evidence of reproductive senescence as aged females laid later and less eggs than younger ones. Moreover, reproductive effort had negative effects on maintenance function (antioxidant defences) especially in aged individuals. However, we found that antioxidant availability could alleviate costs of reproduction which were visible through beak colour, a general index of condition. More importantly, antioxidant availability partly dampened reproductive costs in aged individuals, in terms of beak colour and laying delay. Taken together, these results emphasize the role of dietary antioxidant as determinant resources in aged individuals facing costs of oxidative stress during reproduction.

**Key words:** senescence; ageing; reproduction; zebra finch; circulating antioxidants; vitamin C; vitamin E; selenium; oxidative stress; antioxidant capacity.



## **Introduction**

Senescence is defined as a decline of individual performances through time and is associated with a loss of functions ultimately resulting in organisms' death (Kirkwood & Austad 2000; Monaghan et al. 2008a). We typically distinguish actuarial senescence which is a decline of survival probability with age and reproductive senescence which is a decline in reproductive performances with age (Anderson & Apanius 2003). Many evidence of reproductive senescence has been observed in natural populations (Yoccoz et al. 2002; Nussey et al. 2006, 2007 ; Moller & De Lope 1999; Beamonte-Barrientos et al. 2010; for a review, see Brunet-Rossinni & Austad 2006).

Patterns of observed changes in reproductive performances with age might be driven both by adaptive processes and physiological constraints limiting life-history traits combinations (Ricklefs & Wikelski 2002).

On one hand, evolutionary theory of life history predicts that age-specific changes should be the result of optimized allocation of limited resources between competing functions in order to maximise lifetime reproductive success (Williams 1966; Stearns 1992). On the other hand, physiological pathways should constrains life-history traits, particularly through resources trade-offs, which might explain limited combinations of life-history traits observed in nature (Ricklefs & Wikelski 2002).

Oxidative stress has been identified as an important physiological constraint and a major cause of ageing (Monaghan et al. 2008b). Indeed, production of reactive molecules such as reactive oxygen species (ROS) during metabolically demanding activities such as reproduction has been identified as a main source of damage (Alonso-Alvarez et al. 2004; Wiersma et al. 2004; Speakman 2008) which accumulation ultimately result in loss of function and is associated with ageing (Finkel & Holbrook 2000; Wickens 2001). To counter-act costs of oxidative stress and guarantee homeostasis, organisms had evolved a range of antioxidant defences consisting of various endogenous molecules such as detoxifying enzymes (e.g. super oxide dismutase, catalase, peroxidase) as well as exogenous compounds aquired with food such as vitamins (e.g. vitamin C, E) and inorganic elements associated with enzymes' activities (selenium, zinc, copper) (Beckman and Ames, 1998; Prior and Cao, 1999; Fang et al., 2002).

Since diet antioxidants can not be synthesized de novo, we expect them to be limited resources involved in trade-offs between competing functions such as reproduction and somatic maintenance (Catoni et al. 2008). Moreover, we expect them to be particularly crucial in advanced age individuals as oxidative damage may accumulate whereas endogenous defences may decline in the same time (Beckman & Ames 1998; Finkel & Holbrook 2000). As a consequence, antioxidant trade-offs might move with advancing age.

In addition, theoretical models predict that reproductive effort, which is the proportion of resources allocated to current reproduction rather than to other life-history traits (i.e. survival, growth, future reproduction), should increase with age (Williams 1966; Pianka & Parker 1975; Stearns 1992). Indeed, because survival prospects and potential for future reproduction decreases with age, individuals should invest in priority in current reproduction. Clutton-Brock (1984) has termed this phenomenon the “terminal investment” occurring in late life. Some empirical works found supporting evidence for the terminal investment hypothesis in different taxa (Candolin 2000; Isaac & Johnson 2005; Velando et al. 2006; Creighton et al. 2009; Evans et al. 2011). However, other theoretical works questioned the idea of optimized strategies involved in terminal investment hypothesis by putting forward physiological constraints due to declining condition with age (McNamara et al. 2009), which is consistent with many empirical data too (Cameron et al. 2000; Weladji et al. 2002, 2010; Billing et al. 2007).

Thus, age related changes in reproductive effort and reproductive allocation should be the result of the interplay between adaptive processes and physiological constraints relying on key resources such as antioxidants. Moreover, reproductive allocation will depend on resource availability as well as capacity to use them, which could be influenced by senescence processes.

To understand age-related changes in antioxidant resources allocation to reproduction, we manipulated antioxidant availability by supplementing female zebra finches (*Taenopygia guttata*) of different ages (1 to 6 years) with dietary antioxidants (vitamin C, E and selenium) before allowing them to reproduce. We then studied reproductive allocation and reproductive costs determining reproductive effort depending on age and antioxidant availability.

We predicted a decreasing reproductive effort with age because of a decreased reproductive allocation under senescence hypothesis or alternatively an increased effort under terminal investment hypothesis.

Moreover, we expected a higher reproductive cost in old birds resulting from higher investment or senescence due to lack of function.

Because antioxidants are key resources to counter-act oxidative stress due to increased metabolism during reproduction, we also expected treated birds to show dampen reproductive costs, and especially in old birds, as damage due to oxidative stress should accumulate and become more critical with age.

## **Material and methods**

### Experimental procedure

The study was carried out on 56 pairs of zebra finch (*Taeniopygia guttata*) housed indoor in individual cages (0.6 x 0.4 x 0.4 m) with food (commercial exotic seed mix, Versele-Laga, Belgium), grit and water provided ad libitum. The temperature was kept constant ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), under a controlled daily light cycles (LD 13:11 h). The birds originated from a french birdbreeder and we have kept them under the above conditions for several months before the experiment. Each individual wore a ring giving its year of birth. Females were 1 to 6 year-old and males were all one year old. Obviously, sample sizes are small for old age classes, but we cannot expect very old individuals to be numerous in this short-live species (Zann 1996). In each age-class, half of the females were control individuals while the other half was supplemented with antioxidants (vitamin C, vitamin E, and selenium; see “Antioxidant treatment” below) for a period of 27 days. After the period of supplementation, females were randomly assigned to one-year males for breeding during about 3 months. We provided birds with nesting material from the first day of reproduction. During reproduction, we also provided birds with fresh leaf material twice a week (Zann 1996). For each clutch initiated, eggs were numbered daily until clutch completion. For each female, beak colour was measured and a blood sample was collected before supplementation ( $t_0$ ), at pairing (after the supplementation,  $t_1$ ) and at the end of the experiment (after the period of reproduction,  $t_2$ ).

### Antioxidant treatment

We provided supplemented females with a mix of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol, Virbac, France), vitamin C (L-ascorbic acid, Sigma, France) and organic selenium (selenomethionine, Sigma, France) diluted in water. The solution contained 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of vitamin E, 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of vitamin C and 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of selenium. The treatment dose was set to approximately twice the antioxidant levels contained within the seed provided, following a design proposed by Horak et al. (2007). Solution was renewed and prepared daily, and provided in opaque dispensers in order to prevent photo-alteration of vitamins.

### Blood sampling and biological assays

Blood samples were collected before and after supplementation to assess its effect on circulating selenium concentration and antioxidant activity. Blood (50-100  $\mu\text{l}$ ) was collected from the brachial vein using sterile needles and heparinised microcapillary tubes. Blood was quickly centrifuged (4,000 r.p.m., 15 min., 4°C) and the plasma was stored at -80°C until biological assay. Because of the limited amount of blood collected we assessed only circulating selenium concentration and circulating antioxidant activity (see below).

### Measurements of selenium

Circulating selenium concentration was determined with a furnace atomic absorption spectrophotometer (Hitachi Z-9000), a technique that has been extensively used in studies of element transfer (e.g. Bischoff et al.; Savinov et al., 2003). First, samples (20 $\mu\text{L}$  of plasma) were mineralised using 500 $\mu\text{L}$  of nitric acid at 65%, with a 72h period of incubation at 50°C. Three mL of ultra-pure water were then added. Samples (20 $\mu\text{L}$ ) of this plasma solution were injected in the atomizer platform and measurements of integrated absorbance were made at 196 nm. A modifier  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 - \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  were co-injected to stabilize the matrix. Selenium concentration was determined from a standard curve prepared by diluting appropriate amounts of selenium in ultra-pure water (0 to 25  $\text{ng ml}^{-1}$ ). Two standard reference materials (DOLT-3 dogfish liver and TORT-2 lobster hepatopancreas) from the national research council (Canada) were also analysed to validate the measurements.

### Assessment of circulating antioxidants activity

Circulating antioxidant activity is a functional measure (Cohen et al. 2007) using a decolourization assay (Re et al. 1999). The assay measures the rate at which a pre-formed radical monocation of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS·+) is quenched by antioxidants in the test sample. Trolox was used as a standard (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland, Blount et al. 2002). The plasma was diluted 1:30 with assay buffer. Ten µl of diluted samples or standards, 10µl of metmyoglobin and 150µl of chromogen were added per well of 96-well microplates. To initiate the reactions, 40µl of hydrogen peroxide were added and the plate was incubated on a shaker for 5 minutes at room temperature. The read was made at 750 nm. Results are expressed as µmol of Trolox equivalent per ml of test sample.

### Measuring beak colour

Before supplementation, at pairing and at the end of reproduction, female beak colour was assessed using a Dulux Trade Colour chart (Dulux, Asnières, France) under the same light conditions (Blount et al., 2003). A score ranging from 1 (less red) to 9 (redder) was attributed to be colour by comparison with the chart. Measurements of beak colour were always performed by the same person (B.F.) blind with respect to the treatments. In a previous study on the same species, we showed that beak colour scores correlated with bill colour, and that colour scores are highly repeatable both between and within observers (Gautier et al. 2008).

### Statistical analyses

The significance of differences between means was assessed using Student's t-test. Two-way ANOVAs were used to test the differences between age and treatments on the initial values. General linear models were carried out to analyze changes during supplementation (i.e. differences between post-supplementation and initial values:  $t_1-t_0$ ) in selenium concentration in plasma, antioxidant activity and beak colour. Age and treatment were included in the model as fixed effects, testing also its interaction, and initial value was also added as a covariate. Age was considered as a numerical variable in all analyses but we also treated age as a factor in a purpose of illustration in figure 1. We proceeded the same way to analyse the changes occurring on the predicted variables through the reproduction (i.e. differences between post-reproduction and post-supplementation values:  $t_2-t_1$ ), but we also included the

number of eggs laid as an indicator of female reproductive investment summarizing the clutch size and the number of clutches. Finally, we analysed the effect of age, treatment and its interaction on the initiation of reproduction, the number of eggs and the laying delay (i.e. delay between the start of the experiment and the laying of the first egg of the first incubated clutch). Initiation of reproduction was a binary variable (yes or no) and consequently we used a logistic regression (with a binomial distribution of errors and a logit link function) to analyze it. The number of eggs and the laying delay were both count data for which we used regressions with Poisson distribution of errors and a log link function. The non-significant terms ( $p > 0.05$ ) were then dropped from the models in a step-by-step analysis. All the statistical analyses were performed using R software v.2.13.0 (R Development Core Team, 2011). Two females died through the reproduction period (one 5-year old control bird and one 6-year old treated bird) which explains the changes in sample sizes in statistical analyses.

## Results

### Initial values

We did not find any difference for the initial values of circulating selenium concentration, antioxidant activity in plasma and beak colour among age and treatments (all  $P$ 's  $> 0.1$ ).

### Antioxidant supplementation

Selenium in plasma increased notably after supplementation with antioxidants (mean difference (t1-t0)  $\pm$  SE in treated birds:  $10.27 \pm 1.86$  ng ml<sup>-1</sup>, controls birds:  $1.05 \pm 1.55$  ng ml<sup>-1</sup>; table 1;  $F_{1,50} = 11.570$ ,  $P = 0.001$ ). In addition, there was an age effect as circulating selenium increased in aged birds (slope  $\pm$  S.E. =  $1.955 \pm 0.807$ ; table 2a). Supplementation also increased the antioxidant activity in plasma (mean difference (t1-t0)  $\pm$  SE in treated birds:  $0.72 \pm 0.13$   $\mu$ mol ml<sup>-1</sup>, controls birds:  $0.26 \pm 0.13$   $\mu$ mol ml<sup>-1</sup>; table 1; table 2b). Finally, supplementation did not influence beak colour ( $F_{1,53} = 0.152$ ,  $P = 0.698$ ).

### Reproduction

Eighty four percents of pairs reproduced. Initiation of reproduction was influenced neither by age ( $\chi^2 = 0.381$ ,  $P = 0.537$ ) nor by treatment ( $\chi^2 = 0.003$ ,  $P = 0.954$ ).

We found evidence for reproductive senescence as number of eggs laid decreased with age (slope  $\pm$  S.E:  $-0.123 \pm 0.040$ ,  $\chi^2 = 9.612$ ,  $P = 0.002$ ) and as laying delay increased with age (slope  $\pm$  S.E:  $0.044 \pm 0.020$ , table 5). Selenium disappearance with reproduction increased with age (slope  $\pm$  S.E.:  $-2.568 \pm 1.08$ ; table 3a). In addition, we found a tendency indicating that breeding effort (in terms of number of eggs laid) impaired antioxidant capacity especially in older birds (table 3b; figure 1).

We found that majority of individuals consumed antioxidants through reproduction (mean selenium difference (t2-t1)  $\pm$  S.E.:  $-13.79 \pm 1.59$  ng ml<sup>-1</sup>;  $t = 6.488$ ,  $P < 0.001$ ). Antioxidant capacity and beak colour also diminished in majority of birds (mean antioxidant difference (t2-t1)  $\pm$  S.E.:  $-0.70 \pm 0.08$   $\mu$ mol ml<sup>-1</sup>,  $t = 7.325$ ,  $P < 0.001$ ; mean beak colour difference (t2-t3)  $\pm$  S.E.:  $-1.97 \pm 0.16$ ),  $t = 10.231$ ,  $P < 0.001$ ). However, treated birds, tended to consume more selenium (table 3a) and showed a higher decrease of antioxidant capacity (table 3b) than control birds. They reached similar levels as controls by the end of the experiment (table 1). Moreover, we observed that beak colour change was marginally negatively affected by the number of eggs laid in controls, whereas this negative relation disappeared in treated birds (table 4; figure 2). Thus, beak colour was less affected by increased breeding effort in treated birds than in control ones.

Finally, we found that antioxidant availability influenced reproductive senescence. Indeed, laying delay tended to diminish in old treated birds compared to control ones (table 5; figure 3). Similarly, beak colour after reproduction became paler in old control birds compared to treated ones (table 4; figure 4).

## **Discussion**

The aim of our study was to investigate the importance of antioxidants availability on different aspects of age-related changes in reproduction in female zebra finches. Initially, we did not detect any sign of senescence. However, thereafter, we found evidence of reproductive senescence and more importantly we showed that antioxidant availability partly dampened this reproductive senescence and particularly physiological costs associated with reproduction.

To begin with, we did not detect any sign of senescence before reproduction, neither on specific physiological markers related to oxidative stress (i.e. circulating amount of selenium, antioxidant capacity), nor on more general markers of physical condition like beak colour (Zann 1996), which is a carotenoid-dependent trait known to be a condition-dependant trait in both male and female zebra finches (e.g. Birkhead et al., 1998; Bolund et al., 2010) and a good indicators of the overall antioxidant defence availability (Hartley & Kennedy 2004). This might be due to conditions in captivity that are less constrained and less stressful than natural conditions, particularly in terms of resources access (Ricklefs & Cadena 2007). Moreover, we can not exclude occurrence of a differential selective effect due to the cross-sectional nature of our study where old birds could be a subsample of good quality individuals compared to the average initial population (Forslund and Pärt, 1995; van de Pol and Verhulst, 2006).

Following the initial situation, we supplemented female zebra finches with key antioxidants (i.e. vitamin E, vitamin C and selenium) and we found evidence of a simultaneous increase of circulating selenium and antioxidant capacity in plasma, consistent with values respectively found in literature and in a previous study (e.g. Halifeoglu et al., 2003; Cote et al., 2010).

Surprisingly, we found that old birds had higher circulating levels of selenium than younger ones which could be due to a lower capacity to store antioxidants in organs with age, especially in treated birds.

After supplementation, birds were allowed to breed. We found evidence of physiological costs of reproduction probably due to reproductive allocation of resources, visible through (i) consumption of antioxidant resources, (ii) decrease in antioxidant capacity and (iii) in a condition-dependant colour trait (i.e. beak colour).

Reproductive costs were also visible through the negative link between number of eggs laid which indicates reproductive effort and decrease in beak colour (figure 2). Other studies found similar links between reproductive efforts and their costs in terms of oxidative stress. For example, Alonso-Alvarez et al. (2006) found a negative relationship between the number of breeding events and resistance to oxidative stress in captive zebra finches. Here, we found evidence of direct effects of reproduction effort during a reproductive attempt on the consumption of antioxidant resources which decreased antioxidant defences and which might be responsible for an increased oxidative stress.



Antioxidant supplementation interfered with resources consumption as selenium level and antioxidant capacity decreased more in treated birds which had higher circulating concentrations of these compounds at start of reproduction. The fact that antioxidants were consumed in higher amount when available (i.e. in supplemented birds) through reproduction suggests that antioxidants are limiting resources during resource-costly activities like reproduction.

Moreover, antioxidant supplementation also resulted in a compensation of reproductive costs as suggested by disappearance of the negative link between beak colour decrease and number of eggs laid in treated birds (figure 2). This result also highlights another aspect of limiting nature of antioxidants during reproduction, as control birds probably had to trade-off antioxidant resources between condition and maintenance, as reflected by beak colour, and reproductive effort. This is in accordance with previous findings on the role of other antioxidants (i.e. carotenoids) that were found to modulate trade-off between reproductive effort and maintenance in terms of resistance to oxidative stress (Bertrand et al. 2006).

In our study, we also found evidence of reproductive senescence in terms of reproductive effort as old female zebra finches laid less eggs than younger ones. This suggests that females produce less eggs when they get old, in accordance with previous work that showed a decline in egg production with age in domestic fowl (Brody et al. 1923), or in natural wild population of birds (Gustafsson and Part, 1990; Ratcliffe et al., 1998; Reid et al., 2003; Laaksonen et al., 2002). This might be due to a physiological decline in the ability to produce eggs which are costly at least in terms resource consumption (Visser & Lessells 2001; de Heij et al. 2006; Hanssen et al. 2008).

Another evidence of reproductive senescence was the increase of reproductive cost with age. Indeed, this was visible with the link between the change in antioxidant capacity and egg production becoming negative with increasing age (figure 1). This last result confirms antioxidants as key resources during reproduction, particularly with advancing age. This also confirms the link between reproductive cost – here in terms of decreased antioxidant defences – and age. In particular, this result suggests that aged individuals have few resources to trade-off between antioxidant capacity and reproduction, even when supplemented.

Finally, our work revealed that antioxidant are key resources for aged individuals as their availability partly dampened senescence, as suggested by the reduced laying

delay in old treated birds compared to control birds. Laying delay might be a crucial parameter in natural population as illustrated for example by Low et al. (2007) who found in a population of New Zealand Stitchbird (*Notiomystis cincta*) that birds delaying breeding attempt had lower reproductive output than early established birds. Moreover, antioxidant availability also dampened reproductive costs affecting a general condition-dependant colour trait as beak colour were maintained in old treated birds compared to control birds. This last result shows that old birds that had a limited access to antioxidant resources paid higher reproductive costs than younger birds or old birds that were supplemented.

Our cross-sectional study is less powerful than a longitudinal study but yet we were able to detect signs of reproductive senescence rather than evidence supporting terminal investment hypothesis. Moreover, we found evidence for increased reproductive costs with age and that these costs were partly dampened by the supplementation with dietary antioxidants. It then suggests that antioxidants are key resources for aged individuals who may suffer of higher oxidative stress due to accumulated oxidative damages and lower capacity to use resources than younger ones. Moreover, the results suggest that trade-offs between reproduction and antioxidants defences exist and vary with age.

### **Acknowledgments**

This work has been founded by the Agence Nationale de la Recherche, Program ANR-NT05-2-45491 to BF. Experiments were carried out in compliance with national legal requirements and permission (B. F. permit n° 21-CAE-085).

## References

- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., et al. (2006). An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution*, 60, 1913–1924.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. & Sorci, G. (2004). Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, 7, 363–368.
- Anderson, D.J. & Apanius, V. (2003). Actuarial and reproductive senescence in a long-lived seabird: preliminary evidence. *Experimental Gerontology*, 38, 757–760.
- Beamonte-Barrientos, R., Velando, A., Drummond, H. & Torres, R. (2010). Senescence of Maternal Effects: Aging Influences Egg Quality and Rearing Capacities of a Long-Lived Bird. *The American Naturalist*, 175, 469–480.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547–581.
- Bertrand, S., Alonso-Alvarez, C., Devevey, G., Faivre, B., Prost, J. & Sorci, G. (2006). Carotenoids modulate the trade-off between egg production and resistance to oxidative stress in zebra finches. *Oecologia*, 147, 576–584.
- Billing, A.M., Rosenqvist, G. & Berglund, A. (2007). No terminal investment in pipefish males: only young males exhibit risk-prone courtship behavior. *Behavioral Ecology*, 18, 535–540.
- Birkhead, T.R., Fletcher, F. & Pellatt, E.J. (1998). Sexual selection in the zebra finch *Taeniopygia guttata*: condition, sex traits and immune capacity. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44, 179–191.
- Bischoff, K., Pichner, J., Braselton, W., Counard, C., Evers, D. & Edwards, W. (n.d.). Mercury and selenium concentrations in livers and eggs of common loons (*Gavia immer*) from Minnesota.
- Blount, J.D., Metcalfe, N.B., Birkhead, T.R. & Surai, P.F. (2003). Carotenoid Modulation of Immune Function and Sexual Attractiveness in Zebra Finches. *Science*, 300, 125–127.
- Bolund, E., Schielzeth, H. & Forstmeier, W. (2010). No heightened condition dependence of zebra finch ornaments--a quantitative genetic approach. *Journal of evolutionary biology*, 23, 586–97.
- Brody, S., Henderson, E.W. & Kempster, H.L. (1923). The rate of senescence of the domestic fowl as measured by the decline in egg production with age. *The Journal of general physiology*, 6, 41–5.

- Brunet-Rossinni, A. & Austad, S.N. (2006). Senescence in wild population of mammals and birds. In: Handbook of the Biology of Aging. Academic Press, Burlington, Massachusetts, pp. 243–266.
- Cameron, E.Z., Linklater, W.L., Stafford, K.J. & Minot, E.O. (2000). Aging and improving reproductive success in horses: declining residual reproductive value or just older and wiser? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47, 243–249.
- Candolin, U. (2000). Increased signalling effort when survival prospects decrease: male-male competition ensures honesty. *Animal Behaviour*, 60, 417–422.
- Catoni, C., Peters, A. & Schaefer, H.M. (2008). Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Animal Behaviour*, 76, 1107–1119.
- Clutton-Brock, T.H. (1984). Reproductive Effort and Terminal Investment in Iteroparous Animals. *The American Naturalist*, 123, 212–229.
- Cohen, A., Klasing, K. & Ricklefs, R. (2007). Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 147, 110–121.
- Cote, J., Arnoux, E., Sorci, G., Gaillard, M. & Faivre, B. (2010). Age-dependent allocation of carotenoids to coloration versus antioxidant defences. *Journal of Experimental Biology*, 213, 271–277.
- Coulson, J.C. & Horobin, J. (1976). The influence of age on the breeding biology and survival of the Arctic tern *Sterna paradisaea*. *Journal of Zoology London*, 178, 247–260.
- Creighton, J.C., Heflin, N.D. & Belk, M.C. (2009). Cost of reproduction, resource quality, and terminal investment in a burying beetle. *The American naturalist*, 174, 673–684.
- Dhondt, A.A. (1989). The effect of old age on the reproduction of great tits *Parus major* and blue tits *P.caeruleus*. *Ibis*, 131, 268–280.
- Dow, H. & Fredga, S. (1984). Factors Affecting Reproductive Output of the Goldeneye Duck *Bucephala clangula*. *The Journal of Animal Ecology*, 53, 679 – 692.
- Evans, S.R., Gustafsson, L. & Sheldon, B.C. (2011). Divergent patterns of age-dependence in ornamental and reproductive traits in the collared flycatcher. *Evolution; international journal of organic evolution*, 65, 1623–36.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition Burbank Los Angeles County Calif*, 18, 872–879.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247.

- Forslund, P. & Pärt, T. (1995). Age and reproduction in birds - hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 374–378.
- Gautier, P., Barroca, M., Bertrand, S., Eraud, C., Gaillard, M., Hamman, M., et al. (2008). The presence of females modulates the expression of a carotenoid-based sexual signal. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 1159–1166.
- Gustafsson, L. & Part, T. (1990). Acceleration of senescence in the collared flycatcher *Ficedula albicollis* by reproductive costs. *Nature*, 347, 279–281.
- Halifeoglu, I., Karatas, F., Canatan, H., Colak, R. & Karadas, E. (2003). Investigation of antioxidant vitamins (A, E and C) and selenium levels in chickens receiving estrogen or testosterone. *Cell biochemistry and function*, 21, 133–6.
- Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I. & Erikstad, K.E. (2008). A label of health: a previous immune challenge is reflected in the expression of a female plumage trait. *Biology Letters*, 4, 379–381.
- Hartley, R.C. & Kennedy, M.W. (2004). Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 353–354.
- de Heij, M.E., van den Hout, P.J. & Tinbergen, J.M. (2006). Fitness cost of incubation in great tits (*Parus major*) is related to clutch size. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273, 2353–61.
- Horak, P., Saks, L., Zilmer, M., Karu, U. & Zilmer, K. (2007). Do dietary antioxidants alleviate the cost of immune activation? An experiment with greenfinches. *American Naturalist*, 170, 625–635.
- Isaac, J.L. & Johnson, C.N. (2005). Terminal reproductive effort in a marsupial. *Biology Letters*, 1, 271–275.
- Kirkwood, T.B. & Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408, 233–238.
- Laaksonen, T., Korpimäki, E. & Hakkarainen, H. (2002). Interactive effects of parental age and environmental variation on the breeding performance of Tengmalm's owls. *Journal of Animal Ecology*, 71, 23–31.
- Low, M., Pärt, T. & Forslund, P. (2007). Age-specific variation in reproduction is largely explained by the timing of territory establishment in the New Zealand stitchbird *Notiomystis cincta*. *Journal of Animal Ecology*, 76, 459–470.
- McNamara, J.M., Houston, A.I., Barta, Z., Scheuerlein, A. & Fromhage, L. (2009). Deterioration, death and the evolution of reproductive restraint in late life. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 276, 4061–4066.
- Moller, A.P. & De Lope, F. (1999). Senescence in a short-lived migratory bird: age-dependent morphology, migration, reproduction and parasitism. *Journal of Animal Ecology*, 68, 163–171.

- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D.H. & Ricklefs, R.E. (2008a). The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology*, 22, 371–378.
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B. & Torres, R. (2008b). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 9999.
- Nisbet, I.C.T., Winchell, J.M. & Heise, A.E. (1984). Influence of Age on the Breeding Biology of Common Terns. *Colonial Waterbirds*, 7, 117.
- Nussey, D.H., Kruuk, L.E.B., Donald, A., Fowlie, M. & Clutton-Brock, T.H. (2006). The rate of senescence in maternal performance increases with early-life fecundity in red deer. *Ecology Letters*, 9, 1342–1350.
- Nussey, D.H., Kruuk, L.E.B., Morris, A. & Clutton-Brock, T.H. (2007). Environmental conditions in early life influence ageing rates in a wild population of red deer. *Current biology*, 17, R1000–1.
- Pianka, E.R. & Parker, W.S. (1975). Age-specific reproductive tactics. *The American Naturalist*, 109, 453–464.
- van de Pol, M. & Verhulst, S. (2006). Age-dependent traits: a new statistical model to separate within- and between-individual effects. *The American naturalist*, 167, 766–73.
- Prior, R.L. & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free radical biology & medicine*, 27, 1173–81.
- R Development Core Team. (2010). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria.
- Ratcliffe, N., Furness, R.W. & Hamer, K.C. (1998). The interactive effects of age and food supply on the breeding ecology of great skuas. *Journal of Animal Ecology*, 67, 853–862.
- Reid, J.M., Bignal, E.M., Bignal, S., McCracken, D.I. & Monaghan, P. (2003). Age-specific reproductive performance in red-billed choughs *Pyrrhocorax pyrrhocorax*: patterns and processes in a natural population. *Journal of Animal Ecology*, 72, 765–776.
- Ricklefs, R.E. & Cadena, C.D. (2007). Lifespan is unrelated to investment in reproduction in populations of mammals and birds in captivity. *Ecology Letters*, 10, 867–872.
- Ricklefs, R.E. & Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 462–468.
- Savinov, V.M., Gabrielsen, G.W. & Savinova, T.N. (2003). Cadmium, zinc, copper, arsenic, selenium and mercury in seabirds from the Barents Sea: levels, inter-specific and geographical differences. *Science of the Total Environment*.

- Speakman, J.R. (2008). The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 363, 375–398.
- Stearns, S.C. (1992). The evolution of life histories. In: *The Evolution of Life Histories*. Chapman and Hall, New York.
- Velando, A., Drummond, H. & Torres, R. (2006). Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 273, 1443–1448.
- Visser, M.E. & Lessells, C.M. (2001). The costs of egg production and incubation in great tits (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 268, 1271–1277.
- Weladji, R., Mysterud, A., Holand, Ø. & Lenvik, D. (2002). Age-related reproductive effort in reindeer (*Rangifer tarandus*): evidence of senescence. *Oecologia*, 131, 79–82.
- Weladji, R.B., Holand, Ø., Gaillard, J.-M., Yoccoz, N.G., Mysterud, A., Nieminen, M., et al. (2010). Age-specific changes in different components of reproductive output in female reindeer: terminal allocation or senescence? *Oecologia*, 162, 261–271.
- Wickens, A.P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, 128, 379–391.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R. & Verhulst, S. (2004). Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271, S360–S363.
- Williams, G.C. (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Yoccoz, N.G., Mysterud, A., Langvatn, R. & Stenseth, N.C. (2002). Age- and density-dependent reproductive effort in male red deer. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 269, 1523–8.
- Zann, R. & Straw, B. (1984). Feeding Ecology and Breeding of Zebra Finches in Farmland in Northern Victoria. *Wildlife Research*, 11, 533.
- Zann, R.A. (1996). *The zebra finch: a synthesis of field and laboratory studies*. Oxford University Press, New York.

**Table 1.** Mean values  $\pm$  S.E. of (a) circulating Selenium ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) and (b) of antioxidant activity ( $\mu\text{mol ml}^{-1}$ ) assessed the day prior the antioxidant supplementation (t0), at the end of supplementation (t1) and at the end of reproductive period (t2).

	Selenium					
	t0		t1		t2	
	Mean	S.E	Mean	S.E	Mean	S.E
Control	43.14	2.48	44.19	3.07	34.79	2.34
Treated	44.03	1.77	54.30	1.63	37.45	1.90

	Antioxidant activity					
	t0		t1		t2	
	Mean	S.E	Mean	S.E	Mean	S.E
Control	1.31	0.11	1.57	0.09	1.09	0.07
Treated	1.32	0.09	2.04	0.09	1.16	0.08

**Table 2.** Change (post- minus pre-treatment values) (a) in circulating selenium concentration and (b) in circulating antioxidant activity depending on age and antioxidant supplementation during supplementation period.

a.

	D.f	F-value	P-value
Age	1	5.864	0.019
Antioxidant Treatment	1	11.570	0.001
Initial covariate	1	7.047	0.011
Error	50		

b.

	D.f	F-value	P-value
Antioxidant Treatment	1	12.557	0.0008
Initial covariate	1	61.209	<0.001
Error	52		



**Table 3.** Changes (post- minus pre-reproduction values) (a) in circulating selenium concentration and (b) in circulating antioxidant activity depending on age, antioxidant supplementation and breeding effort (number of eggs laid) during reproduction.

a.

	D.f	F-value	P-value
Age	1	5.684	0.021
Antioxidant Treatment	1	3.648	0.0622
Error	47		

b.

	D.f	F-value	P-value
Age	1	0.478	0.493
Antioxidant Treatment	1	4.018	0.050
Number of eggs	1	1.116	0.296
Age x Number of eggs	1	3.537	0.066
Error	50		

Table 4. Changes (pre- minus post-treatment values) in beak colour indices depending on age, antioxidant supplementation and breeding effort (number of eggs laid) during reproduction.

	D.f	F-value	P-value
Age	1	4.271	0.0446
Antioxidant Treatment	1	4.642	0.037
Number of eggs	1	7.574	0.008
Age x Antioxidant Treatment	1	4.354	0.043
Number of eggs x Antioxidant Treatment	1	3.339	0.074
Error	44		

Table 5. Laying delay in terms of number of days before clutch initiation depending on age and antioxidant supplementation.

	D.f	Chi <sup>2</sup>	P-value
Age	1	4.456	0.035
Antioxidant Treatment	1	0.131	0.717
Age x Antioxidant Treatment	1	3.116	0.077

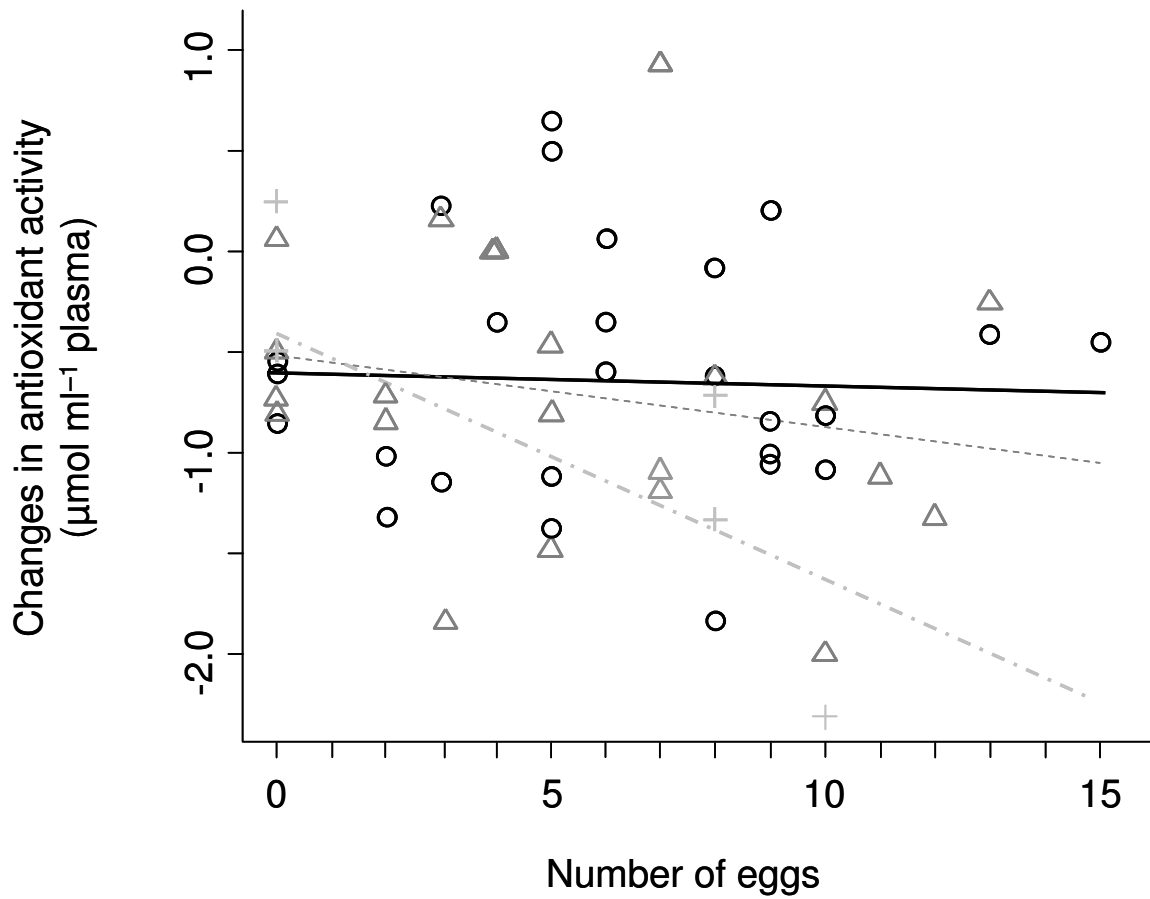


Figure 1. Changes in antioxidant activity during reproduction (pre- minus post-treatment values) in relation with the number of eggs laid for young (1-2 years; open circles, solid line), middle (3-4 years; open triangles, broken line) and old (5-6 years; crosses, broken and pointed line) age classes.

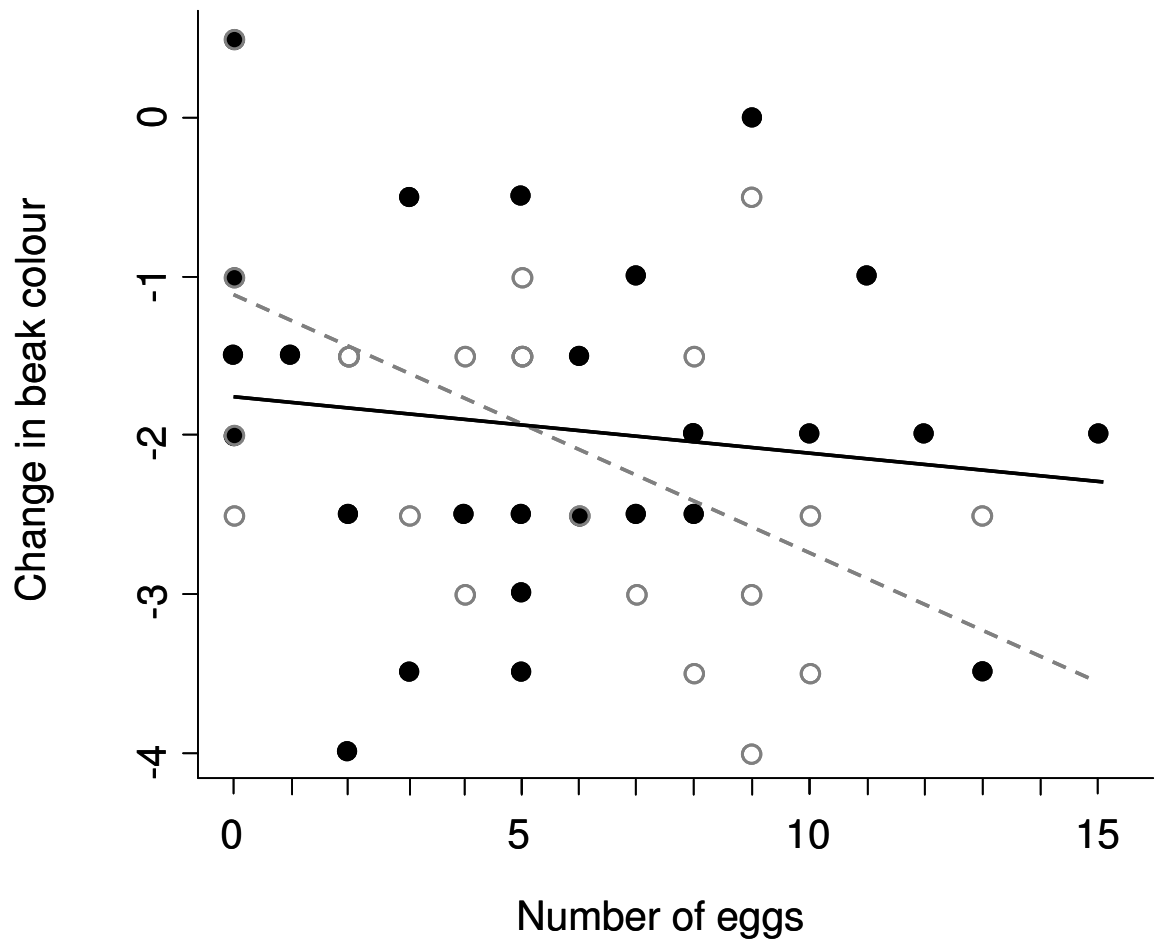


Figure 2. Changes in beak colour during reproduction (pre- minus post-treatment values) in relation with the number of eggs laid for supplemented (filled circles, solid line) and non-supplemented (open circles, broken line) birds.

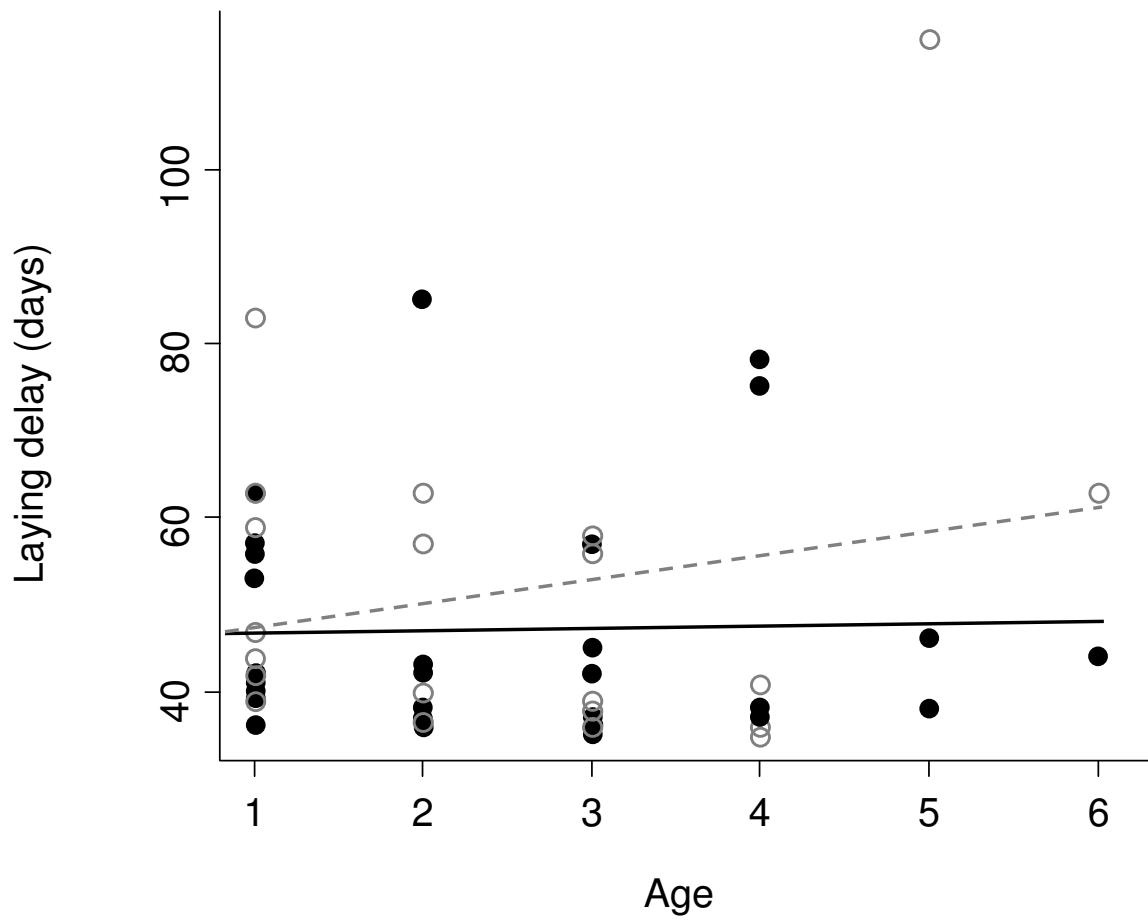


Figure 3. Laying delay in relation with age for supplemented (filled circles, solid line) and non-supplemented (open circles, broken line) birds.

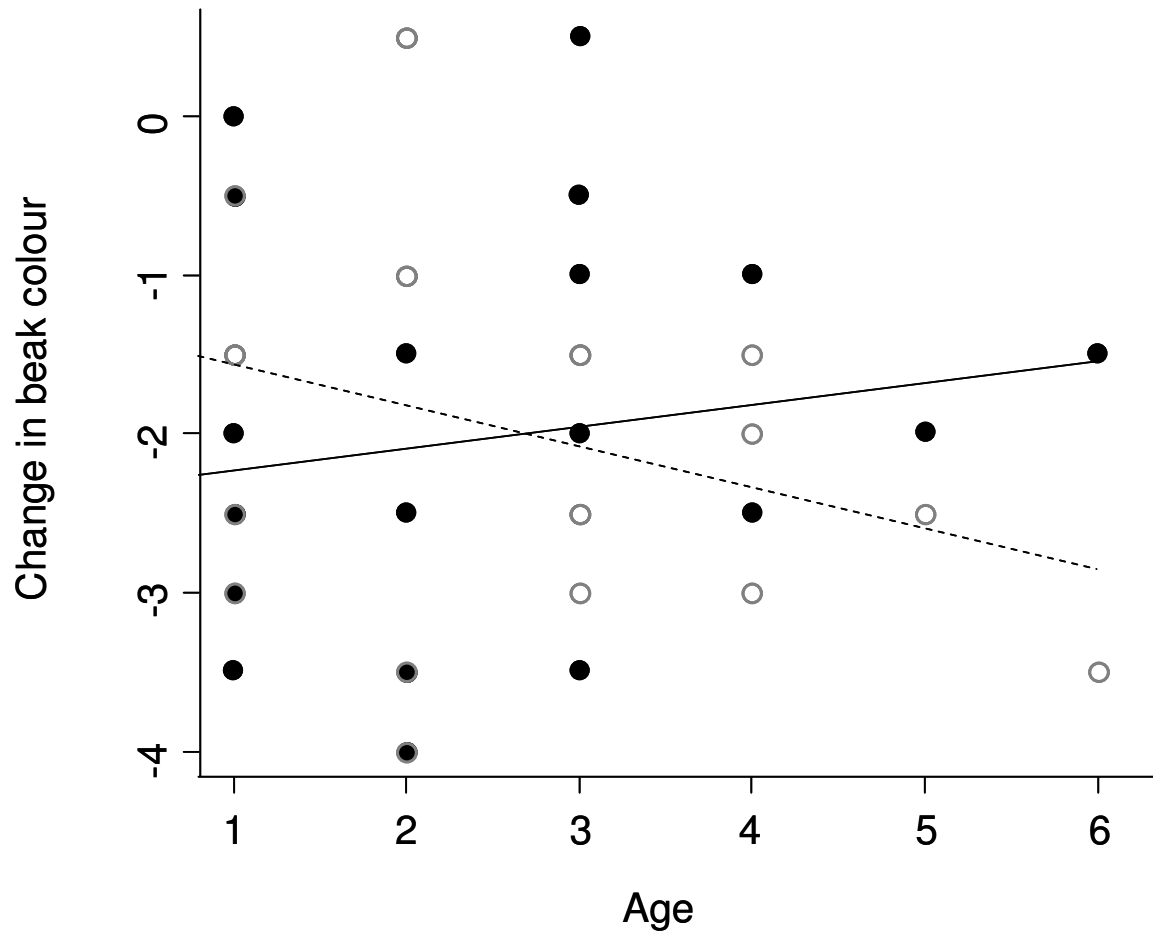


Figure 4. Changes in beak colour during reproduction (pre- minus post-treatment values) in relation with age for supplemented (filled circles, solid line) and non-supplemented (open circles, broken line) birds.

## **C**hapitre IV

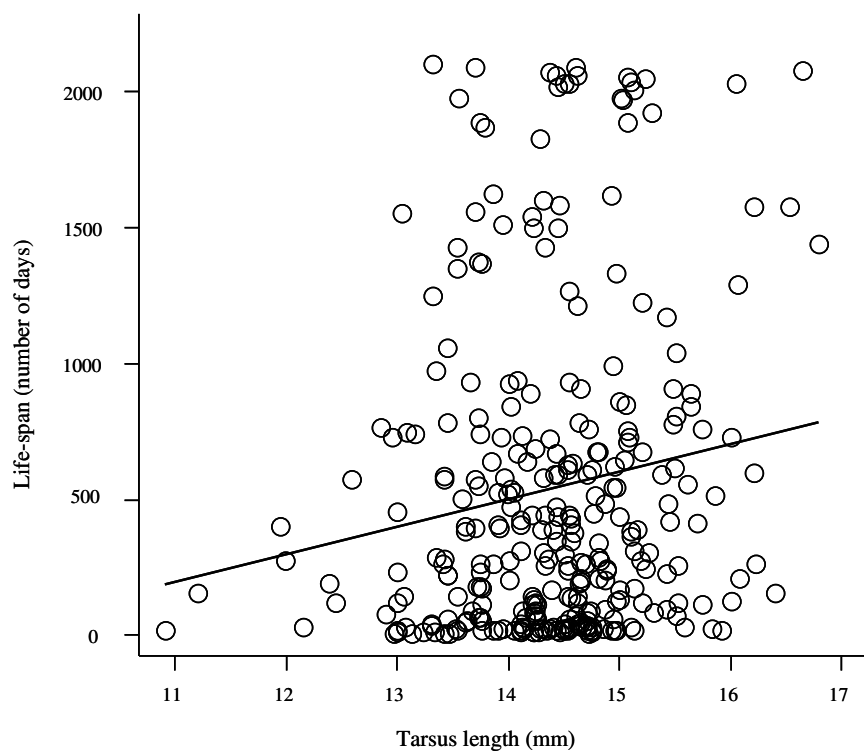
### **Conséquences à long terme d'un stress oxydant périnatal d'origine inflammatoire**

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le stress oxydatif occasionné par un effort reproducteur peut générer des coûts visibles à travers des indices généraux de condition tels que la couleur du bec. Cependant, d'autres fonctions cruciales pour la fitness des individus comme la réponse immunitaire peuvent être à l'origine de dommages radicalaires liés non seulement à l'augmentation du métabolisme lors d'une exposition à un pathogène, mais également à la production de molécules réactives telles que l'oxyde nitrique (NO) impliquées dans la réponse et à l'origine de coûts immunopathologiques (voir section « Immunité et sénescence » ci-dessus). Les parasites présents dans l'environnement constituent une pression incessante sur les défenses des hôtes et ce dès les premiers jours de vie. L'influence de l'environnement périnatal sur les trajectoires des individus a déjà été explorée dans divers contextes, que ce soit par exemple concernant les conditions de croissance – en manipulant l'accès ou la qualité de la nourriture (ex. Colman et al., 2009; Criscuolo et al., 2008), ou en augmentant/diminuant la taille de la nichée (Alonso-Alvarez et al. 2006; Tschirren et al. 2009) – ou encore dans des contextes de stress hormonal (Monaghan et al., 2012) ou physique (Costantini et al., 2012). Néanmoins, les conséquences à long terme des coûts liés à la réponse inflammatoire n'ont jamais été étudiées expérimentalement chez les espèces longévives et ce malgré les nombreuses études épidémiologiques chez l'Homme soulignant le rôle de l'environnement infectieux sur le vieillissement et la durée de vie (ex. Finch and Crimmins, 2004).

Dans cette étude, nous avons abordé cette question en exposant des diamants mandarins à une charge antigénique de manière chronique dans les premières semaines de vie. Nous avons ensuite suivi cette cohorte longitudinale en étudiant les effets de cette activation chronique et

précoce de l'inflammation (i) à court terme sur la survie et des paramètres physiologiques et biométriques, (ii) à long terme sur la durée de vie des individus. Nous avons ainsi observé que les oiseaux exposés à une inflammation chronique présentaient une augmentation des marqueurs physiologiques d'inflammation et une moindre croissance par rapport aux individus contrôles (injectés avec une solution saline non immunogène). Cependant, le traitement n'a pas entraîné de coût en termes de survie à court terme. De plus, nous n'avons pas observé d'effet direct du traitement sur la survie à long terme mais un effet indirect puisque nous avons mis en évidence un effet négatif du retard de développement en partie imputable au traitement sur la durée de vie des individus (voir figure 4 de l'article 2). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activation exacerbée des défenses immunitaires tôt dans la vie induit des coûts directs sur le développement à court terme mais aussi indirectement à long terme sur la longévité. Cependant, les bases génétiques des traits liés à la réponse immunitaire en prise avec la sélection restent à élucider et feront l'objet de discussions, notamment dans le chapitre VI (voir article 5).

Ces résultats constituent les prémisses de cette étude longitudinale qui devrait livrer encore de nombreux résultats sur les effets du stress périnatal d'origine immunitaire sur d'autres traits d'histoires de vie cruciaux pour la fitness ou sur les changements physiologiques associés à l'âge (inflammaging ; voir chapitre VII « synthèse, conclusion et perspectives »).



**Figure 4 de l'article 2.** Longévité des oiseaux de la cohorte en fonction de la longueur du tarse (mesure de croissance)   18 jours post-écllosion.



## Article 2

### **Early inflammatory conditions predict long-term survival in Zebra finches**

(En préparation)

# Early inflammatory conditions predict long-term survival in Zebra finches

Romain Guerreiro<sup>1,\*,#</sup>, Emilie Arnoux<sup>1,#</sup>, Gabriele Sorci<sup>1</sup> and Bruno Faivre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BioGéoSciences, CNRS UMR 6282, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

\*E-mail : [romain.guerreiro@u-bourgogne.fr](mailto:romain.guerreiro@u-bourgogne.fr)

#Both are first authors

**Short-title:** Inflammation and longevity.

## **Abstract**

Early life is crucial as it determines part of the individual success, but it can also be detrimental later in life. This has been the focus of much evolutionary works on ageing determinants and many experimental studies found evidence of long term effects of resources competition during growth or other stressful early conditions. Furthermore, in spite of the interest of epidemiologists for long term consequences of infectious environment, very few experimental works focused on inflammatory consequences in relatively long lived animals. Here, we investigated the short- and long-term consequences of a chronic exposure to inflammatory challenge in a cohort of zebra finches. Our challenges elicited inflammatory response and had detrimental effects in terms of oxidative damage and in terms of chick growth delay. Moreover, smaller grown individuals had shorter life-span than well developed ones, which suggests that damaging inflammatory response had indirect effects on intrinsic causes of death late in life.

**Key words:** senescence; ageing; oxidative stress; inflammation; longitudinal approach; haptoglobin; TBars; lipopolysaccharide; immunity; zebra finch; early conditions; longevity.

## **Introduction**

Understanding evolutionary processes and physiological determinisms that explain longevity is a central question in Ageing Biology (Kirkwood & Austad 2000, Finkel & Holbrook, 2000, Ricklefs & Wikelski, 2002). Early environmental conditions are of prime importance therein as they can greatly influence individual trajectories by acting on processes associated with ageing and longevity (Rubolini et al. 2006; Criscuolo et al. 2008; Christof & Thomas 2009; Tschirren et al. 2009; Costantini et al. 2012). Indeed, many studies showed that conditions prevailing during early development could have long term consequences on several traits that affects fitness such as size or age at maturity, secondary sexual traits, dominance, fecundity (Lindström, 1999; Metcalfe & Monaghan, 2001, 2003). Environment may act directly on organisms during the initial steps of their development, but it can also have an influence through its effects on parents, most often mothers. This last indirect effect has been extensively studied through the so called maternal effects (Mousseau & Fox 1998).

Much of the experimental works has been focused on nutritional and hormonal aspects of early life (for a review see for example Monaghan, 2008) and were mainly interested in relatively short term consequences on fitness (e.g. growth, mortality rate, age at first reproduction, reproductive output at adulthood), and inferred long term fitness consequences (e.g. Alonso-Alvarez et al. 2007; Orledge et al. 2012). Few studies, however, considered long term consequences through longitudinal approaches (i.e. long term survival, longevity, lifetime reproductive rate or senescence rate; see for example Alonso-Alvarez et al. 2006, Millon et al., 2011).

Recently, other aspects of early life have been the target of fruitful demographic and epidemiologic researches by authors interested in long term consequences of early exposure to infectious diseases in humans (Crimmins & Finch, 2006; Finch & Crimmins, 2004; Caruso et al. 2005). Exposure to pathogens is a threat which imposes a permanent counter response by hosts from the first days of life. Immune response comes with immunopathological costs that are often the main cause of disease severity and morbidity (Sell & Max 2001; Graham et al. 2005; Halliwell 2006; Hotamisligil 2006). In addition, damage due to inflammation are linked to oxidative processes generated during the response which has been identified as a main proximal cause of performance decline and disease associated with ageing (Finkel & Holbrook 2000; Sorci & Faivre 2009). Thus, early exposure to infectious diseases could constrain growth and development during key initial individual life-stages, which could have delayed negative consequences late in life (Crimmins & Finch 2006; Mazumder et al. 2010).

The study of long term consequences of early exposure to inflammation requires monitoring of longitudinal cohorts (Finch & Crimmins 2004). If they provide convincing results to suggest that infections during early life have delayed effects that may reduce lifespan, epidemiological surveys from large data sets (especially on long-lived organisms) can hardly disentangle effects of inflammation from those of many other factors. Therefore, the incorporation of longitudinal approach into experiments could be a relevant design, complementary to "simple" epidemiological researches already done, because it eliminates much of the environmental hazard effects. To our knowledge, no experimental evidence for long term effects of an early activation of immunity have been investigated in as long lived species as birds, and so far we are aware of only two experimental works involving short lived invertebrate species (Jacot et al. 2004; Pursall & Rolff 2011).

Here, we investigated the effect of a perinatal inflammatory exposure on life expectancy with a cohort of zebra finches (*Taenopygia guttata*) kept in captivity. Birds were exposed chronically to an antigenic challenge during the first weeks of their life to trigger systemic inflammation. We assessed an acute phase response protein (i.e. haptoglobin), a marker of oxidative damage (TBars levels), and we measured growth to follow the short term consequences of the early antigenic exposure. We also monitored short-term survival (until sexual maturity) and long-term survival (longevity).

We predicted a direct effect of the immune challenge on production of acute phase protein, on oxidative damage, and on delayed growth rate. We also predicted an effect of short-term and long-term survival with challenged birds having shorter life-span than control ones.

## **Material and Methods**

### **Ethic statement**

This work was carried out in compliance with French laws governing experiments on animals (B. F. permit n°21-CAE-085).

### **General procedure**

Hundred and thirteen pairs of less than one-year old zebra finches (*Taenopygia guttata*) provided by a French birbreeder were randomly formed and maintained in cages (0.6m x 0.4m x 0.4m) with food (commercial exotic seed mix, Versele-Laga, Belgium), lettuce, grit and tap water provided ad libitum. We also provided birds with a mixture made of toast,

pasta, organic eggs and vitamins to favour laying and chick growing (Zann 1996). The temperature was kept constant ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), under a controlled daily light cycle (LD 13:11 h). For each clutch initiated, egg laying was monitored daily from one day before the predicted hatching date until clutch completion. Ten days after hatching of the first chick, the whole brood received one of two treatments. First, the treated group (N=181 nestlings among 73 broods) received an intra-peritoneal injection of antigenic mixture of *E. coli* lipopolysaccharide ( $1.33\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of LPS, serotype O55:B5; SIGMA, St. Louis, MO), *S. aureus* peptidoglycans ( $1.33\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , SIGMA, St. Louis, MO) and pure Freund adjuvant (SIGMA, St. Louis, MO). Second, the control group (N=171 nestlings among 69 broods) received an intra-peritoneal injection of the same volume (0.1 ml) of phosphate buffer solution (PBS, 1M). We repeated injections every 4 days until day 30 post-hatching to maintain a chronic stress. Doses were adjusted to chick body mass ( $0.5 \text{ mg/Kg}$ ). The first day of exposure, chicks right tarsus length was measured ( $\pm 0.01\text{mm}$ ) to have an initial point.

The day after the first injection (day 11), chicks were bled in brachial vein to collect blood samples (50 to 100  $\mu\text{l}$ ). Blood was quickly centrifuged (4000rpm, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) and aliquots of plasma were shortly stored at  $-80^\circ\text{C}$  for future biochemical assessments (see next sections). The same procedure was repeated for each clutch at day 19, 31 and 60. Chicks were also measured for their right tarsus length at day 10, 18, 30 and at day 60 to have an index of bone growth and development until reaching sexual maturity.

At weaning (40 days), chicks were separated from parents and at day 60 separated by sex and maintained under standard captivity conditions (exotic seed mix, lettuce, grit and tap water provided ad libitum, temperature  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , daily light cycles LD 13:11 h) and constant density (four birds per cage on average). Individual survival was then monitored three times a week to allow survival analysis and to measure longevity.

#### Haptoglobin assessment

To quantify haptoglobin (mg/ml), we used a commercial assay kit (TP801; Tri-Delta Diagnostics, NJ, USA) extensively used in inflammatory studies (e.g. Matson et al., 2012; Millet et al., 2007). The principle of the kit remains on the combined peroxidase activity of haemoglobin bound with haptoglobin at low pH. Preservation of the peroxidase activity of haemoglobin is directly proportional to the amount of haptoglobin in the sample ( $7.5\mu\text{l}$ ) and is colorimetrically quantified by measuring absorbance at 630nm with a spectrophotometer.

## TBARS levels assessment

We measured circulating lipid peroxidation, from 20 $\mu$ l of plasma, using a commercial assay kit (TBars Assay kit, Cayman Chemical Compagny, MI, USA) following instructions provided by the manufacturer. The principle of the kit remains on the colorimetric measure of a complex formed by the reaction of malondialdehyde (MDA), a main secondary product of lipid peroxidation, and thiobarbituric acid (TBA) under high temperature (90°-100°C) and acidic conditions. The optical measure is realised with a spectrophotometer at 530-540nm.

## Statistical analyses

Initial differences were tested using linear mixed models with mass and tarsus length as dependent variables, treatment as fixed factors and brood identity as random effect.

To study the change in physiological markers and growth rate during early exposure (i.e. between day 11 and day 31 post-hatching) and until maturity (i.e. at day 60 post-hatching), we used mixed effect models for repeated measures including haptoglobin levels, TBars levels and tarsus length as dependent variables, and treatment, sex, time, and interactions as fixed factors. Individual identity and brood identity have been included as random effects.

To study short term survival (i.e. survival until day 60 post-hatching), we considered individuals alive at day 60 post-hatching as censored data. We built survival curves by computing the Kaplan-Meier estimators which allows analysing observations for which the complete distribution is not known (i.e., censored data). The effect of treatment group, covariables (peak responses of haptoglobin and Tbars, both at day 19 post-hatching, and initial tarsus length at day 10 post-hatching) and interactions were tested with a survival mixed model (i.e. cox mixed effects) which allow introduction of brood identity as a random effect. Sex was not included in that model because several chicks did not survive until determining the sex.

To study long term survival (i.e. survival until the end of the experiment), we considered the few remaining individuals (N=29) as censored data. The effect of treatment group, sex, covariables (peak responses of haptoglobin and Tbars, both at day 19 post-hatching and tarsus length at day 18 post-hatching) and interactions were tested with a survival mixed model.

Haptoglobin and Tbars levels were log-transformed in every model. Full models were simplified using step-by-step backward method until reaching the minimum adequate models (i.e. all  $P < 0.05$ ). Changes in sample sizes reflect mortality occurring over the course of the experiment. All statistics were performed with R software version 2.15.0 (R Development Core Team, 2012).

## Results

Prior to challenge, there was an initial difference in chick size, treated birds being on average bigger than control ones (mean tarsus length  $\pm$  S.E. of treated birds :  $12.52 \pm 0.009$  mm, control birds:  $12.04 \pm 0.012$  mm;  $\chi^2=4.00$ ,  $P= 0.045$ ).

Antigenic challenges triggered productions of haptoglobin (Time\*Treatment:  $\chi^2=8.38$ ,  $P=0.004$ ) and lipid peroxidation (Time\*Treatment:  $\chi^2=4.88$ ,  $P=0.027$ ) in the first days of exposure, as LPS treated birds showed higher levels of haptoglobin and TBars than control birds at day 11 and day 18 post-hatching, until reaching similar levels at day 30 which correspond to the end of the challenge period. At day 60 post-hatching, treated birds had slightly lower levels of haptoglobins and TBars than control ones (figure 1 and figure 2). The same patterns were found when only considering individuals alive at day 60 in analyses (data not shown).

Antigenic challenges also impacted growth rate as treated birds which were on average bigger prior to exposure were smaller by the end of the growth period (at day 60) (Time\*Treatment:  $\chi^2= 14.79$ ,  $P< 0.001$ , figure 3). Again, the same pattern was found when only considering individuals alive at day 60 (data not shown).

Short term survival (until day 60 post-hatching) was neither directly influenced by treatment nor by physiological markers of inflammation (i.e. haptoglobin) and oxidative stress (i.e. TBars). Initial tarsus length (at day 10 post-hatching) was the only predictor of short term survival (table 1a,b).

Finally, long term survival was neither directly influenced by treatment nor by physiological markers of inflammation (i.e. haptoglobin) and oxidative stress (i.e. TBars) but was influenced by tarsus length at day 18 post-hatching (table 2a,b; figure 4).

## Discussion

Our study showed that zebra finches exposed to an early antigenic challenge grew more slowly. This delayed development had critical long term effects as smaller birds during exposure were also shorter lived.

During the initial part of the experiment, from first days to sexual maturity of the birds, we observed that zebra finches showed increased levels of both haptoglobin – an acute phase protein – and TBars – a marker of lipid peroxidation produced during oxidative burst (figure 1



and 2). These increases were significant in both challenged and controls birds. This might be determined by two non exclusive processes. First, most physiological functions (including immune system) are still under progressive maturation during the early stages of life of young birds (Apanius 1998; Pihlaja et al. 2006), and rising levels of markers of inflammation and oxidative stress might indicate this maturation. Second, because chicks' environment was not germ-free during our experiment, exposure to treatment was not the only source of activation of immune system, and immunity of all chicks was stimulated by naturally present germs during early life. Nevertheless, levels of haptoglobin and TBars were significantly higher in challenged birds compared to controls ones during exposure, which indicates that antigenic challenges triggered an inflammatory response accompanied by substantial cellular damages during that period. This is in accordance with previous studies using similar mix of non proliferating compounds (i.e. LPS and Freund's adjuvant) to activate an inflammatory response (Martin et al. 2010).

Interestingly, we found that, by the end of exposure period, physiological markers levels were similar in treated and control birds. This should appear surprising because treatment was still applied when circulating levels of haptoglobin and TBars converged between treated and control birds. However, this may witness the activation of "habituation" mechanisms rather than selective disappearance of higher responders as this pattern was conserved when considering only individuals that reached sexual maturity (i.e. day 60). For instance, mechanisms such as those based on transfer proteins (eg. phospholipid transfer protein PLTP) may be more and more activated with exposure to LPS, and enhance its neutralization and elimination by liver (Gautier et al., 2008; Guyard-Dangremont et al., 1998).

Growth rate was also affected by immune challenges as treated birds showed slower growth rate than control birds during exposure and by the end of the growth period (sexual maturity), even with treated birds being by chance initially bigger, which is conservative in that case (figure 3). This is consistent with evidence for reduced growth in children exposed to infectious diseases like dysentery, HIV or respiratory infections (e.g. Rowland et al., 1988; Villamor et al., 2007), and with lower height at adulthood observed for men belonging to the cohort prenatally exposed to the 1918 influenza A H1N1 virus (Mazumder et al 2010). This is also consistent with previous finding in bird populations where infections and parasite loads influenced chicks growth rates (Merino et al. 1999; Bize et al. 2003; Reed et al. 2012) and could have long term consequence on reproductive success (Fitze et al. 2004). Inflammation is a metabolically demanding process and growth delay could be the result of energy intake partly allocated to immune response and other cellular process like repair (Baracos et al.

1987; McDade 2003; Klasing 2004). Moreover, growth delay could be the consequence of anorexia which characterizes sickness situations (Inui 2001) and which can reduce food intake by nearly 20% (Martorell et al. 1980; Butte et al. 1989). Whatever the exact mechanisms involved, this result suggests a direct link between inflammation and development which has been hypothesized to be crucial for long term survival and ageing (Crimmins & Finch 2006). Our survival analyses reveal that growth, which was negatively affected by challenge, predicted long term survival (figure 4), and that there was a possible link between immunopathology due to antigenic exposure and life-span. In humans, Barker (2004) emphasized the importance of early growth in humans and found that low birth weight due to poor foetal growth conditions, and patterns of growth during infancy were associated with increased rate of organ insufficiency like coronary heart disease, stroke, hypertension, type 2 diabetes, which are main sources of late-life mortality in humans. Similarly, in natural populations, Nussey et al. (2007) demonstrated the importance of early harsh conditions in terms of food competition on adult senescence in wild red deer.

Exposure to chronic infectious disease forces organisms to invest mainly in immunity, diverting most energy from growth and tissue organ repairs functions. Smaller individuals that present poor resource allocation to key functioning organs such as kidney or heart must incur higher costs which include late life diseases (Barker 2004). Similarly, in our study, the reduced growth of exposed birds could contribute to the reduced life-span we observed, and similar physiological disorders as those described above may occur. Independently of growth and size, many degenerative diseases that impact lifespan have an inflammatory origin which may start to operate very soon compared to the occurrence of the symptoms and their disabling effects (Sorci & Faivre 2009). The exact physiological cause of death of our birds in absence of extrinsic mortality is unknown, and we cannot conclude if death was the result of organ failure risen from early initiated damage, or if it originated from other causes. Therefore, we cannot infer on the direct or indirect delayed effects of inflammatory mechanisms in our case study. Indeed, smaller size of treated birds might be a sign of internal damage with delayed negative consequences on long-term longevity, as well as the proximal cause of reduced survival.

Our study strongly suggests that early conditions are crucial for survival, and encourage to prospect further mechanistic steps and genetic determinism. Very few data are now available on exact cause of death in bird species, and much work has still to be done to identify them and the associated mechanisms. In addition, a future challenge would be to investigate candidate genes linking immunity, development and late-life disease and mortality.

Candidate genes whose expression may follow antagonistic pleiotropy scheme with positive effects until reproductive life and negative ones later, have been identified in humans (Finch 2009), and could be detected in birds.

## References

- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., et al. (2006). An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution*, 60, 1913–1924.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B. & Sorci, G. (2007). Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology*, 21, 873–879.
- Apanius, V. (1998). The Immune System. In: *Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum* (eds. Starck, J.M. & Ricklefs, R.E.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 203–217.
- Baracos, V.E., Whitmore, W.T. & Gale, R. (1987). The metabolic cost of fever. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 65, 1248–54.
- Barker, D.J.P. (2004). The developmental origins of well-being. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359, 1359–66.
- Bize, P., Roulin, A., Bersier, L.-F., Pfluger, D. & Richner, H. (2003). Parasitism and developmental plasticity in Alpine swift nestlings. *Journal of Animal Ecology*, 72, 633–639.
- Butte, N.F., Wong, W.W. & Garza, C. (1989). Energy cost of growth during infancy. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 48, 303–12.
- Caruso, C., Candore, G., Colonna-Romano, G., Lio, D. & Franceschi, C. (2005). Inflammation and life-span. *Science*, 307, 208–9.
- Christof, B. & Thomas, T.V. (2009). Increased early growth rates decrease longevity of conifers in subalpine forests. *Oikos*, 118, 1130–1138.
- Costantini, D., Monaghan, P. & Metcalfe, N.B. (2012). Early life experience primes resistance to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 215, 2820–2826.
- Crimmins, E.M. & Finch, C.E. (2006). Infection, inflammation, height, and longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 498–503.

- Criscuolo, F., Monaghan, P., Nasir, L. & Metcalfe, N.B. (2008). Early nutrition and phenotypic development: “catch-up” growth leads to elevated metabolic rate in adulthood. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 275, 1565–1570.
- Finch, C.E. (2009). Evolution of the human lifespan and diseases of aging: Roles of infection, inflammation, and nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 1–7.
- Finch, C.E. & Crimmins, E.M. (2004). Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science*, 305, 1736–1739.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247.
- Fitze, P.S., Clobert, J. & Richner, H. (2004). Long-term life-history consequences of ectoparasite-modulated growth and development. *Ecology*, 85, 2018–2026.
- Gautier, T., Klein, A., Deckert, V., Desrumaux, C., Ogier, N., Sberna, A.-L., et al. (2008). Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *The Journal of biological chemistry*, 283, 18702–10.
- Graham, A.L., Allen, J.E. & Read, A.F. (2005). Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 373–397.
- Guyard-Dangremont, V., Desrumaux, C., Gambert, P., Lallemand, C. & Lagrost, L. (1998). Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comparative biochemistry and physiology Part B Biochemistry molecular biology*, 120, 517–525.
- Halliwell, B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in biochemical sciences*, 31, 509–15.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860–867.
- Inui, A. (2001). Cytokines and sickness behavior: implications from knockout animal models. *Trends in Immunology*, 22, 469–473.
- Jacot, A., Scheuber, H. & Brinkhof, M.W.G. (2004). Costs of an induced immune response on sexual display and longevity in field crickets. *Evolution*, 58, 2280.
- Klasing, K.C. (2004). The costs of immunity. *Acta Zoologica Sinica*, 50, 961–969.
- Lindström, J. (1999). Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 343–348.
- Martin, L.B., Alam, J.L., Imboma, T. & Liebl, A.L. (2010). Variation in inflammation as a correlate of range expansion in Kenyan house sparrows. *Oecologia*, 164, 339–47.

- Martorell, R., Yarbrough, C., Yarbrough, S. & Klein, R.E. (1980). The impact of ordinary illnesses on the dietary intakes of malnourished children. *The American journal of clinical nutrition*, 33, 345–50.
- Matson, K.D., Horrocks, N.P.C., Versteegh, M.A. & Tieleman, B.I. (2012). Baseline haptoglobin concentrations are repeatable and predictive of certain aspects of a subsequent experimentally-induced inflammatory response. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 162, 7–15.
- Mazumder, B., Almond, D., Park, K., Crimmins, E.M. & Finch, C.E. (2010). Lingering prenatal effects of the 1918 influenza pandemic on cardiovascular disease. *Journal of developmental origins of health and disease*, 1, 26–34.
- McDade, T.W. (2003). Life history theory and the immune system: steps toward a human ecological immunology. *American journal of physical anthropology*, Suppl 37, 100–25.
- Merino, S., Mínguez, E., Belliure, B., Mínguez, E. & Belliure, B. (1999). Ectoparasite Effects on Nestling European Storm-Petrels. *Waterbirds*, 22, 297.
- Metcalfe, N.B. & Monaghan, P. (2001). Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 254–260.
- Metcalfe, N.B. & Monaghan, P. (2003). Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology*, 38, 935–940.
- Millet, S., Bennett, J., Lee, K.A., Hau, M. & Klasing, K.C. (2007). Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Developmental and comparative immunology*, 31, 188–201.
- Millon, A., Petty, S.J., Little, B. & Lambin, X. (2011). Natal conditions alter age-specific reproduction but not survival or senescence in a long-lived bird of prey. *Journal of Animal Ecology*, 80, 968–975.
- Monaghan, P. (2008). Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 363, 1635–1645.
- Mousseau, T.A. & Fox, C.W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 403–407.
- Nussey, D.H., Kruuk, L.E.B., Morris, A. & Clutton-Brock, T.H. (2007). Environmental conditions in early life influence ageing rates in a wild population of red deer. *Current biology*, 17, R1000–1.
- Orledge, J.M., Blount, J.D., Hoodless, A.N. & Royle, N.J. (2012). Antioxidant supplementation during early development reduces parasite load but does not affect sexual ornament expression in adult ring-necked pheasants. *Functional Ecology*, 26, 688–700.

- Pihlaja, M., Siitari, H. & Alatalo, R.V. (2006). Maternal antibodies in a wild altricial bird: effects on offspring immunity, growth and survival. *The Journal of animal ecology*, 75, 1154–64.
- Pursall, E.R. & Rolff, J. (2011). Immune Responses Accelerate Ageing: Proof-of-Principle in an Insect Model. *PLoS ONE*, 6, 7.
- R Development Core Team. (2012). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria.
- Reed, T.E., Daunt, F., Kiploks, A.J., Burthe, S.J., Granroth-Wilding, H.M.V., Takahashi, E.A., et al. (2012). Impacts of parasites in early life: contrasting effects on juvenile growth for different family members. *PLoS ONE*, 7, e32236.
- Ricklefs, R.E. & Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 462–468.
- Rowland, M.G., Rowland, S.G. & Cole, T.J. (1988). Impact of infection on the growth of children from 0 to 2 years in an urban West African community. *The American journal of clinical nutrition*, 47, 134–8.
- Rubolini, D., Romano, M., Bonisoli-Alquati, A. & Saino, N. (2006). Early maternal, genetic and environmental components of antioxidant protection, morphology and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1571–1584.
- Sell, S. & Max, E.E. (2001). *Immunology, immunopathology, and immunity*. ASM Press, Washington D.C.
- Sorci, G. & Faivre, B. (2009). Review. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host–parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 71–83.
- Tschirren, B., Rutstein, A.N., Postma, E., Mariette, M. & Griffith, S.C. (2009). Short- and long-term consequences of early developmental conditions: a case study on wild and domesticated zebra finches. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 387–395.
- Villamor, E., Fataki, M., Bosch, R., Mbise, R. & Fawzi, W. (2007). Human immunodeficiency virus infection, diarrheal disease and sociodemographic predictors of child growth. *Acta Paediatrica*, 93, 372–379.
- Zann, R.A. (1996). *The zebra finch: a synthesis of field and laboratory studies*. Oxford University Press. New York.

Table 1. Mixed Cox model for short-term survival analysis (between day 10 and day 60 post-hatching). (a) Full model, (b) minimum adequate model. Full model includes Treatment (LPS or PBS group), Haptoglobin and TBars (log transformed concentrations at day 19 p.h.) and Tarsus Length (at day 10 p.h.).

(a)

Fixed-effects	Coef	S.E. (Coef)	Z-value	P-value
Treatment	-0.45	5.95	-0.08	0.94
log(Haptoglobin)	-0.3	3.72	-0.08	0.93
log(Tbars)	1.89	3.3	0.58	0.57
Tarsus Length	0.25	1.01	0.25	0.8
Treatment x log(Haptoglobin)	0.05	0.83	0.07	0.95
Treatment x log(TBars)	0.91	0.86	1.06	0.29
Treatment x Tarsus Length	-0.29	0.41	-0.71	0.48
Tarsus Length x log(Haptoglobin)	0.02	0.3	0.09	0.92
Tarsus Length x log(TBars)	-0.16	0.27	-0.63	0.53
Random effect	Std. dev.	Variance		
Nest identity	1.72	2.96		

(b)

Fixed-effects	Coef	S.E. (Coef)	Z-value	P-value
Treatment	-0.72	0.43	-1.67	0.094
Tarsus Length	-0.4	0.08	-4.53	<b>&lt;0.001</b>
Random effect	Std. dev.	Variance		
Nest identity	1.77	3.14		

Table 2. Mixed Cox model for long-term survival analysis (between day 10 and end of the experiment). (a) full model, (b) minimum adequate model. Full model includes Treatment (LPS or PBS group), Sex, Haptoglobin and TBars (log transformed concentrations at day 19 p.h.) and Tarsus Length (at day 18 p.h.).

(a)

Fixed-effects	Coef	S.E. (Coef)	Z-value	P-value
Treatment	3.74	3.19	1.17	0.24
Sex	0.33	0.32	1.03	0.3
log(Haptoglobin)	2.25	2.17	1.04	0.3
log(Tbars)	-0.27	2.47	-0.11	0.91
Tarsus Length	-0.52	0.68	-0.76	0.45
Treatment x Sex	-0.98	0.45	-2.14	<b>0.03</b>
Treatment x log(Haptoglobin)	0.27	0.27	1.01	0.31
Treatment x log(TBars)	-0.38	0.29	-1.31	0.19
Treatment x Tarsus Length	-0.11	0.21	-0.56	0.58
Tarsus Length x log(Haptoglobin)	-0.17	0.15	-1.17	0.24
Tarsus Length x log(TBars)	0.02	0.16	0.16	0.87
Random effect	Std. dev.	Variance		
Nest identity	0.29	0.08		

(b)

Fixed-effects	Coef	S.E. (Coef)	Z-value	P-value
Treatment	-0.21	0.2	-1.03	0.31
Tarsus Length	-0.15	0.07	-2	<b>0.046</b>
Random effect	Std. dev.	Variance		
Nest identity	0.86	0.74		



Figure 1. Haptoglobin levels (mg/ml) measured at different dates from day 11 post-hatching (i.e. first day of antigenic exposure) to day 60 post-hatching in treated (blacks bars) and control birds (white bars). The bars represent mean values  $\pm$  S.E.

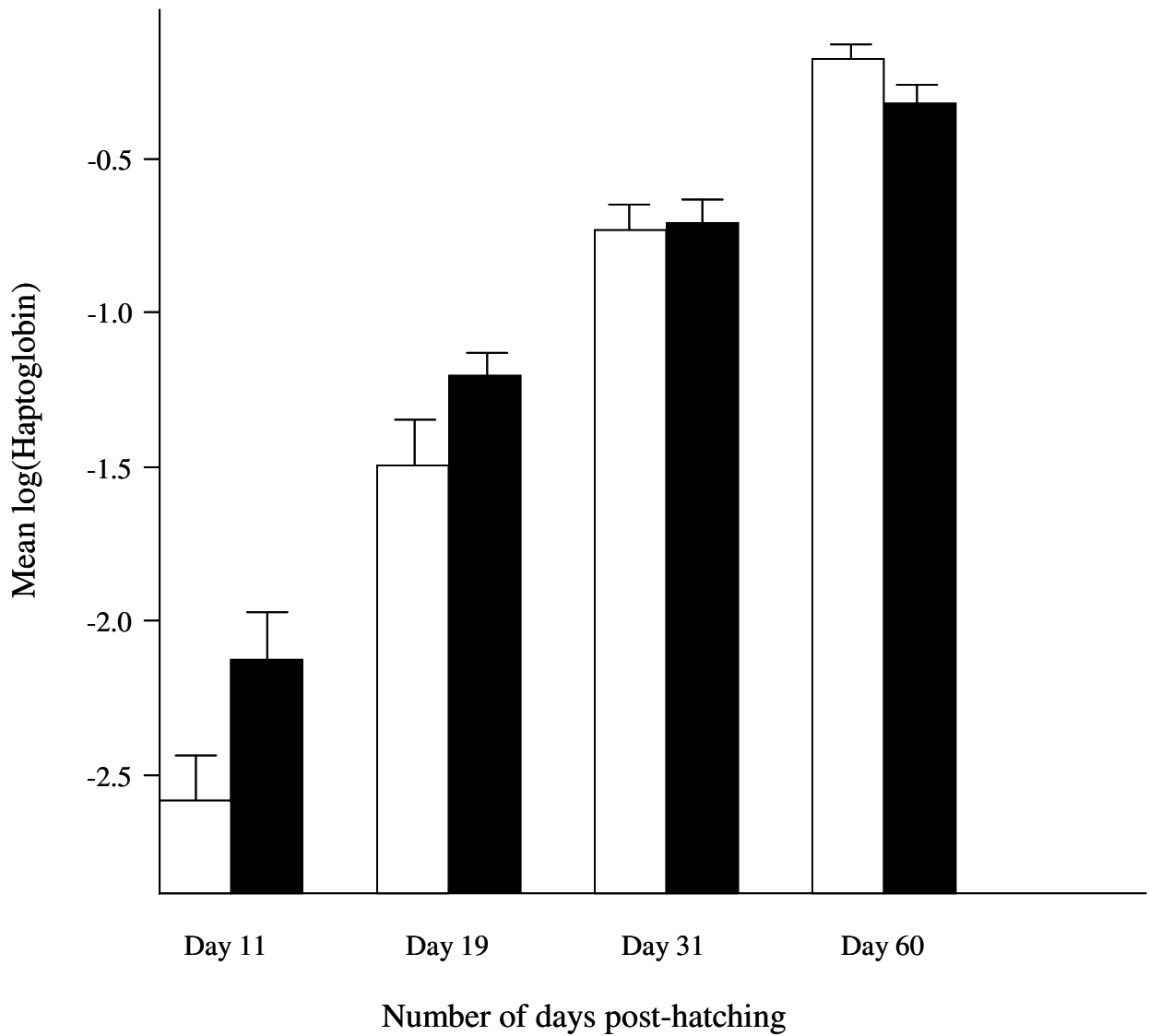


Figure 2. TBars levels ( $\mu\text{M}$ ) measured at different dates from day 11 post-hatching (i.e. first day of antigenic exposure) to day 60 post-hatching (i.e. sexual maturity) in treated (black bars) and control birds (white bars). The bars represent mean values  $\pm$  S.E.

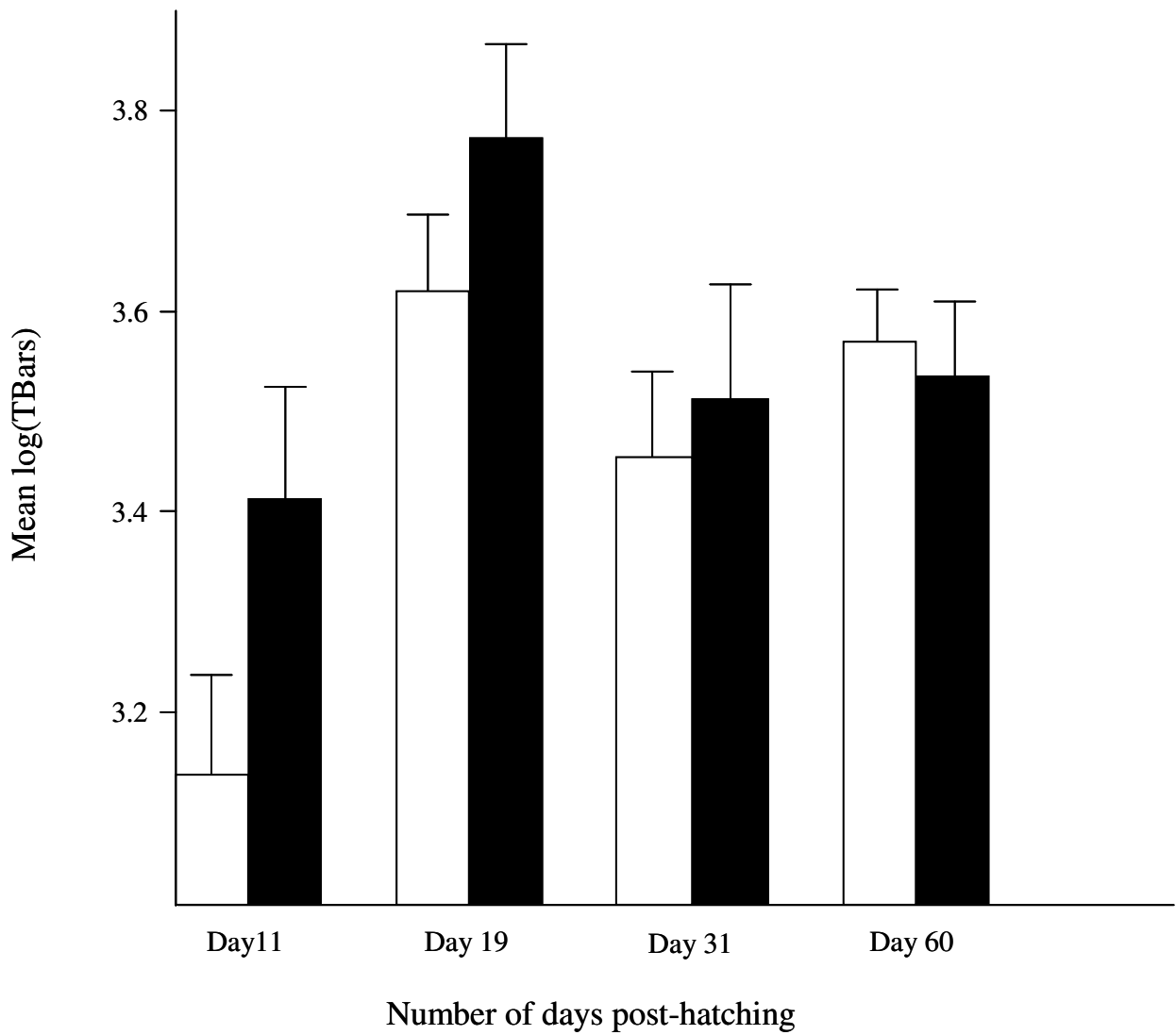


Figure 3. Right tarsus length (mm) measured at different dates from day 11 post-hatching (i.e. first day of antigenic exposure) to day 60 post-hatching (i.e. sexual maturity) in treated (blacks bars) and control birds (white bars). The bars represent mean values  $\pm$  S.E.

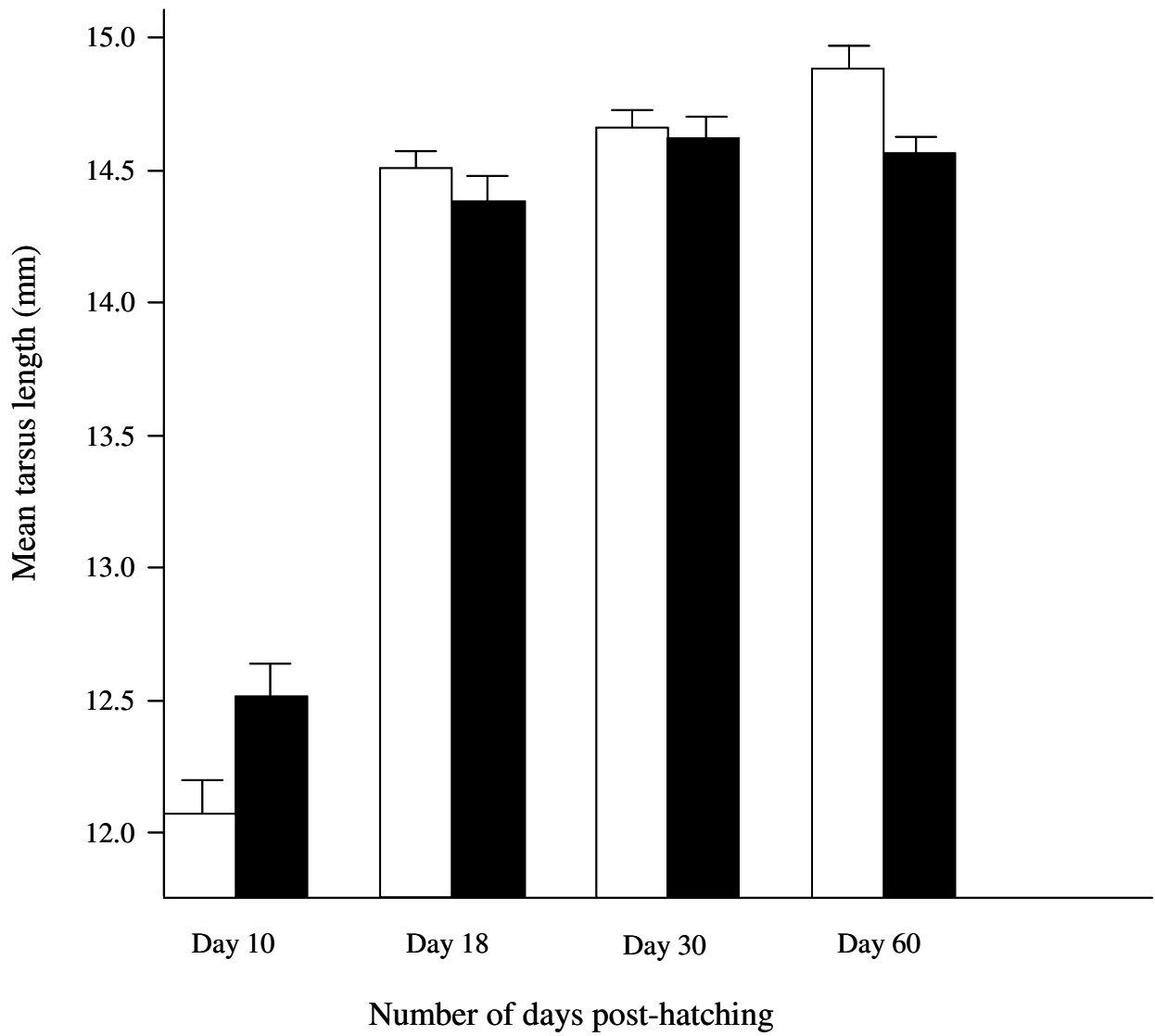
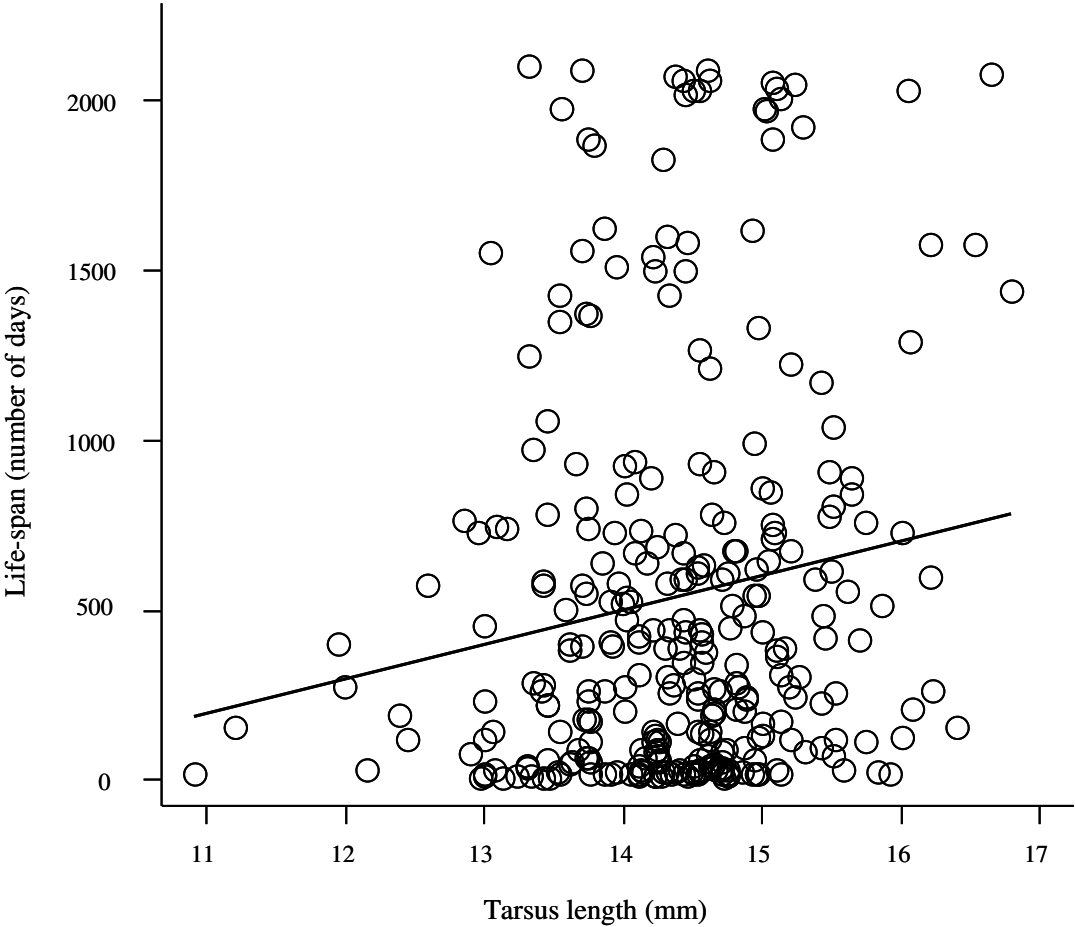


Figure 4. Longevity of cohort birds in relation with their right tarsus length (mm) at day 18 post-hatching. Solid line represents estimated least-squared line for illustration purpose.



## Chapitre V

### Inflammation et longévité : comparaison entre oiseaux et mammifères.

Dans le chapitre précédent, nous avons vu l'importance potentielle des coûts immunopathologiques sur les trajectoires individuelles. Ainsi, les coûts engendrés tôt dans la vie pourraient se répercuter en fin de vie en influençant le vieillissement et en ayant pour conséquences des différences marquées dans les durées de vie inter-individuelles.

A une autre échelle, on peut se demander si ces mêmes mécanismes liés à la réponse immunitaire pourraient être impliqués dans les différences inter-spécifiques de patrons de longévités et de vieillissement. Les différences dans les mécanismes d'activation et de résolution de la réponse entre différents taxa pourraient par exemple être à l'origine d'une sensibilité plus ou moins prononcée aux dégâts occasionnés par la réponse immunitaire qui, par leur accumulation et leurs effets néfastes, pourraient alors contraindre à terme l'évolution de la durée de vie.

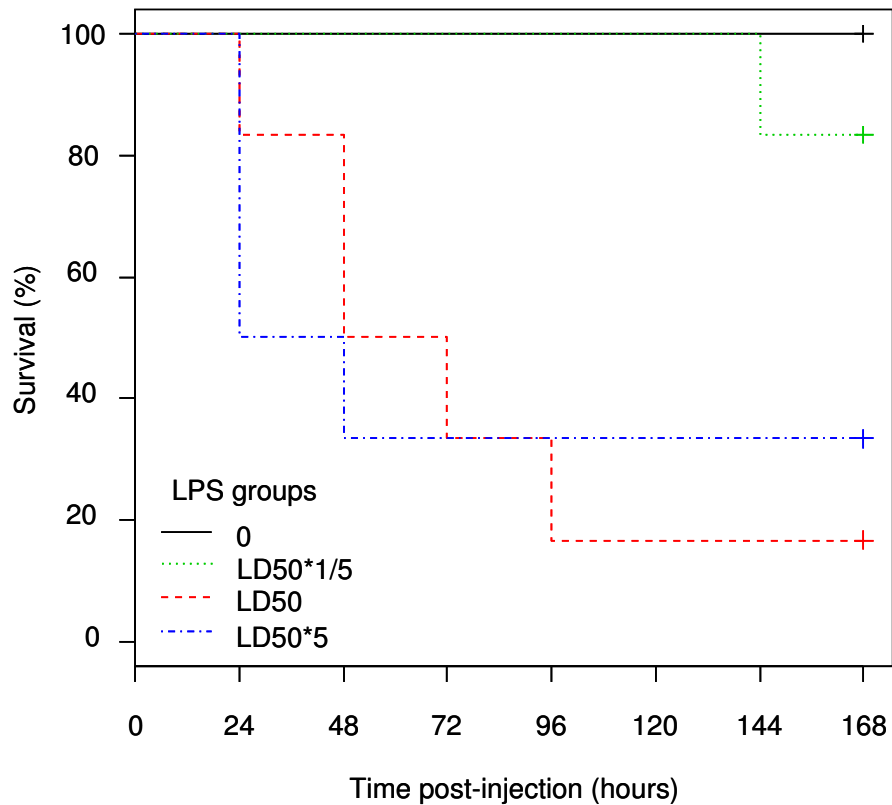
Il existe en effet des écarts de longévité très marqués entre les espèces de différents taxa, voire entre espèces d'un même taxon. A titre d'exemple, la différence de longévité entre deux espèces de mammifères de taille similaire peut excéder de loin les différences de longévité induites par des manipulations génétiques visant à augmenter la longévité ou par des expériences de restriction calorique chez une espèce donnée (Buffenstein 2009).

La compréhension des mécanismes à l'origine de telles différences est un sujet central en biologie du vieillissement et nous avons voulu apporter un éclairage nouveau à cette question en nous intéressant particulièrement aux différences marquées entre la durée de vie élevée chez les oiseaux comparée à celles des mammifères de taille comparable qui relève depuis longtemps de l'intrigue.

Les oiseaux présentent, en effet, en moyenne des durées de vie une fois et demi plus élevées que celles des mammifères de taille comparable et ce malgré des taux métaboliques 3 à 4 fois

supérieurs, des taux de sucre très élevés comparables à des niveaux de diabétiques chez l'Homme (Costantini, 2008; Holmes and Martin, 2009). Des auteurs ont déjà apportés des éléments de compréhension à ce paradoxe apparent en soulignant l'importance potentielle de mécanismes de résistance au stress oxydatif (ex. Montgomery et al., 2011; Hulbert et al., 2007). Mais, comme nous l'avons vu précédemment, les coûts immunopathologiques liés à la réponse immunitaire ont longtemps été ignorés malgré leur incidence sur le taux de vieillissement (Finch and Crimmins, 2004) et présentent donc une piste intéressante pour comprendre les différents facteurs qui peuvent influencer la longévité à l'échelle interspécifique.

Pour explorer cette idée, dans l'étude qui suit, nous avons répété une même expérience sur différentes espèces mammaliennes (souris et hamster) et aviaires (mandarins et canaris). Le but de ces expériences était de comparer l'issue d'une activation immunitaire sur la réponse physiologique et sur la survie à court terme chez ces différentes espèces. Suite au challenge immunitaire, les oiseaux ne présentaient pas de coûts en termes de survie alors que les mammifères survivaient dans les proportions attendues pour les doses imposées, ce qui suggère que les oiseaux sont beaucoup moins sensibles à une activation immunitaire que les mammifères. Les mécanismes en jeu restent cependant à préciser. Ces résultats contrastés pourraient être dus à une moindre activation du système immunitaire chez les oiseaux. Cela pourrait également être dû à l'existence de mécanismes de résolution de la réponse plus rapides et/ou plus efficaces permettant d'éviter les coûts liés l'emballement de la réponse immunitaire (Sell & Max 2001). Ces résultats suggèrent que les oiseaux accumuleraient moins de dégâts liés aux coûts de l'immunité, ce qui pourrait expliquer des durées de vie plus longues et des patrons de vieillissement ralentis par rapport aux mammifères.



**Figure 1a de l'article 2.** Courbe de survie des souris exposées à différentes doses de LPS. « 0 » : groupe contrôle recevant une injection de solution saline (PBS ; ligne noire) ; « LD50\*1/5 » : groupe recevant une injection de LPS correspondant à 1/5<sup>ème</sup> de la dose létale pour 50% de la population (ligne verte) ; « LD50 » : groupe recevant une injection de LPS correspondant à la dose létale pour 50% de la population (ligne rouge) ; « LD50\*5 » : groupe recevant une injection de LPS correspondant à 5 fois la dose létale pour 50% de la population (ligne bleue).

Notez que les oiseaux (mandarins et canaris) ayant reçu les injections correspondant à ces mêmes doses ont tous survécu et se situent donc au même niveau que la ligne des souris du groupe contrôle (ligne noire).

## Article 3

**Low susceptibility to inflammation, a promising new route for the study of longevity in birds.**

**Insights from comparative experiments.**

(En préparation)



# **Low susceptibility to inflammation, a promising new route for the study of longevity in birds.**

**Insights from comparative experiments.**

Romain Guerreiro<sup>1,\*</sup>, Jérôme Bellenger<sup>2</sup>, Juliette Bailly<sup>1</sup>, Gabriele Sorci<sup>1</sup> and Bruno Faivre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BioGéoSciences, CNRS UMR 6282, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

\*E-mail : [romain.guerreiro@u-bourgogne.fr](mailto:romain.guerreiro@u-bourgogne.fr)

<sup>2</sup>Lipides Nutrition Cancer, INSERM UMR 866, Université de Bourgogne, Dijon, France

**Short-title:** Inflammation in birds and mammals.

## **Abstract**

It is now well documented that birds show slower senescence rates and higher longevity than similar sized mammals. These differences have questioned biologists as birds also show higher metabolic rates and higher oxygen expenditure compared to mammals. Recently, researchers found evidence suggesting that these differences could be due to basal oxidative stress resistance mechanisms; but relative importance of these mechanisms is still strongly debated. Another interesting approach to understand differences in longevities between birds and mammals could be to compare capacity to cope with inflammatory harmful effects. Indeed, inflammatory response incurs costs in terms of cellular damage and their accumulation through life can be viewed as a major cause of ageing. We hypothesized that birds' longevity could be linked to higher resistance mechanisms towards these immunopathology costs compared to more susceptible mammals. To explore this idea, we exposed birds of two different species (zebra finches and canaries) and mammals of two different species (mice and hamsters) to a non-proliferating immune challenge (i.e. LPS) with the same experimental design. As expected, we found that birds incurred far less costs following exposure than mammals. Indeed mammals' survival was affected in proportions expected with the LPS doses used whereas no mortality occurred in birds which only showed transient mass loss. Our results suggest that these differences in immune susceptibility are due to less intense or more efficiently down regulated inflammation. Moreover, our work put forward the potential role of inflammatory resistance in damage accumulation through life resulting in contrasted life trajectories between birds and mammals.

**Key words:** longevity; inflammation; birds; mammals; senescence; nitric oxide; lipopolysaccharide; haptoglobin; acute-phase protein; immune response; innate immunity.

## **Introduction**

Extreme longevity of birds is an intriguing issue for both evolutionary and health science biologists. Indeed, birds show a remarkable maximum life-span potential compared to mammals of similar body size (reviewed in Holmes & Martin, 2009), and the recent completions of long-term population monitoring witness the high longevity and slow senescence rate in free ranging populations of birds compared to mammals (Jones et al., 2008; Ricklefs, 2010; Clutton-Brock & Sheldon, 2010). Investigations of ultimate factors and mechanisms at the origin of birds' longevity should provide a comprehensive view of this amazing particularity (Williams, 1957, Partridge & Barton, 1993; Ricklefs, 1998, 2008; Kirkwood & Austad, 2000; Speakman 2005a; Hulbert et al. 2007; Buttemer et al. 2010).

Physiological mechanisms constraining evolution of longevity are still open to debate. Much current research is focused on the relationship between ageing rate and oxidative damage. Indeed, after Pearl's seminal results on correlation between life-span and basal metabolism (Pearl 1928), Harman (1956) hypothesised that metabolism generated damaging free radicals at the origin of aging. Thus, longevity might be constrained by metabolism. However, birds does not exactly fit that theory and figure as exception with on average 1.5 times longer life than similar-sized mammals despite a range of 2-3 higher metabolic rate, and 3-4 (or more) higher lifetime oxygen expenditures (Holmes & Austad 1995a; Speakman 2005; Jones et al. 2008; Ricklefs 2008). In that context, exceptional bird longevity appears quiet paradoxical. Consequently, it has been suggested that birds would have evolved better defenses or reparation abilities against oxidative damage, or reduced production of free radicals (Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species, respectively ROS and RNS) compared to shorter-lived mammals of similar sized and weight (Holmes & Austad, 1995a; Barja, 1998, 2004; Hulbert et al., 2007, Pamplona & Barja 2012).

Most studies devoted to the extreme longevity of birds, compared basal free radical production, oxidative damage, or/and antioxidant defenses between birds and mammals. Lower level of fatty acid unsaturation of cellular membranes in birds appears as a consensual result (reviewed in Barja 2004; Montgomery et al. 2011; Sanchez-Roman et al. 2012). This particularity decrease birds' cell sensitivity to oxidative damage (Pamplona et al. 1999; Hulbert 2003; Hulbert et al. 2007, 2010). However, discrepancies exist between studies depending on tissues and organs under investigation. A large set of works report a higher production of free radicals in mammals compared to birds (Barja et al. 1994; Herrero & Barja 1997; Pamplona et al. 1999, 2006; Lambert et al. 2007), but this view has been recently

challenged because the comparison seems sensitive to the method and tissues that are employed for analyses (Montgomery et al. 2011). Studies focused on antioxidant defenses provided contradictory results that did detect better defenses in birds (Ku & Sohal 1993; Ogburn et al. 1998) or not (Lopez-Torres et al. 1993; Barja et al. 1994; Montgomery et al. 2012).

In addition to studies focused on basal levels for components of oxidative stress, other authors pointed the potential implications of immunity in shaping life-span (Finch & Crimmins, 2004; Finch, 2007, Sorci & Faivre, 2009). Indeed, immune response, and particularly the inflammatory processes are linked to oxidative stress, as ROS and RNS are released by immune cells at infected or injured sites to circumvent infection or injury (Fang 2004; Halliwell 2006). Inflammation and ageing are tightly associated because (i) there is a shift towards a pro-inflammatory status in a wide range of organisms, from *Drosophila melanogaster* (Pletcher et al. 2007) to humans (Giunta 2006), and (ii) there is increasing evidence that inflammation contribute to ageing, age-dependent mortality, and then longevity through its oxidative mechanisms. Indeed, many common age-related diseases, at least in humans and animal models, are the outcomes of inflammation triggered by past infections (Coussens & Werb 2002; Licastro et al. 2005; Sarkar & Fisher 2006; Hollyfield et al. 2008). In addition, epidemiological and demographic surveys strongly suggest that exposure to inflammation in early life contribute to age-related diseases and longevity in humans (Finch & Crimmins 2004; Crimmins & Finch 2006). Finally genetic investigations on centenarians point out that a down-regulated inflammation is associated with extreme longevity (Caruso et al. 2005; Lio et al. 2002).

Despite the line of evidence for the implication of inflammation and its oxidative mechanisms in ageing process and longevity, it has been largely neglected from evolutionary perspectives and comparative studies that attempted to elucidate longevity, and especially bird longevity. We may hypothesize that the extreme bird longevity among homeotherms has an inflammatory component. More specifically, birds may be expected to show reduced production of free radicals and less associated damage, when exposed to an inflammatory insult.

We explored that question by comparing susceptibility to inflammation in two mammal species (mice and hamsters) and two bird species (zebra finches and canaries) with contrasted maximum life-span potential (hamsters: 3.9 years; mice: 4 years versus zebra finches: 14.5 years; canaries: 24 years; AnAge database; De Magalhaes & Costa 2009). Different groups of individuals were exposed to different doses of lipopolysaccharide (LPS), a constituent of cell-

wall of gram-negative bacteria that triggers an acute-phase response (Koutsos et al. 2003; Saito et al. 2003). Doses were set from previous works where LPS was known to provoke lethality in mice (Tateda et al., 1996). We assessed a general inflammatory effector (i.e. nitric oxide, NO) which is known to be released by macrophages at sites of inflammation to counteract infection under highly reactive forms (e.g. peroxynitrite) known to produce much of the free radical damage (Vajdovich, 2008; Victor et al., 2004; see Sild & Horak, 2009 for review). We also measured haptoglobin, an acute-phase protein which is known to bind and remove free haemoglobin released by damaged erythrocytes to dampen its cytotoxic activity (Gutteridge 1987) and considered as a general marker of the inflammatory response following the immune challenge. Cost of the immune activation was measured through body mass loss and, more ultimately, mortality following the LPS injection. We expected shorter-lived mammal species to be more susceptible to inflammatory damage and to pay more costs than longer-lived birds both in terms of body mass loss and mortality. We also expected mammals to show enhanced inflammatory reaction, assessed through NO production and amount of acute-phase proteins compared to birds.

## **Material and methods**

### Ethic statement

The experiment has been conducted in compliance with, and has received the agreement of the Animal Care and Ethical Committee of the Université de Bourgogne (protocol n° C1111).

### General procedure

Experiments with each species were conducted separately and the same general procedure was respected for each experiment.

Twenty four adult C57BL/6 strain mice (12 females and 12 males) and 24 adult golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) (12 females and 12 males) aged of 3 months were purchased from Janvier (Laval, France). Upon arrival at the laboratory, animals were individually housed in Plexiglas cages and kept in an air conditioned room (temperature  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity  $60 \pm 10\%$ ) with a 12-hours light/dark cycle. Pellet food and tap water were provided ad libitum.

Adult canaries (*Serinus canaria*), less than one-year old, were purchased from a French bird breeder and sexed with a molecular technique (see molecular sexing section) to identify 12

males and 12 females. Finally, 24 adult zebra finches (*Taeniopygia guttata*), less than one-year old locally born in our facilities were used in the experiment (12 females and 12 males). The birds were housed in indoor cages (0.6m x 0.4m x 0.4m) with food (canari seed mix for canaries and exotic seed mix for zebra finches, Versele-Laga, Belgium), grit and water provided ad libitum. The temperature was kept constant ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), under a controlled daily light cycles (LD 13:11 h).

#### Treatment procedure

To study susceptibility to inflammation in birds and mammals, individuals of each species were exposed to an inflammatory challenge based on previous works in mice (Tateda et al. 1996; Belloni et al. 2010). Individuals were randomly assigned to one of 3 different groups of 6 individuals (3 females and 3 males) and intra-peritoneally injected with increasing doses of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* lyophilized cell walls (LPS, serotype 055:B5, Sigma, St Louis, MO) diluted in 100  $\mu\text{l}$  of phosphate-buffered saline (PBS): 6 individuals (3 males and 3 females) received 25.6 mg/kg of LPS, a dose shown to kill 50% of C57BL/6 mice (LD50, Tateda et al 1996); 6 individuals received 5.12 mg/kg of LPS (LD50/5); 6 individuals received 128 mg/kg of LPS (LD50x5). Finally, one group of 6 control individuals received only a solution of PBS.

The day before the injection ( $t_0$ ), in the morning, individuals were weighted ( $\pm 0.1\text{g}$ ) and a blood sample (100-200 $\mu\text{l}$  depending on species) were collected. For mammals, blood sample were obtained by retro-orbital puncture under isoflurane anaesthesia. For birds, blood sample were obtained from the brachial vein. After collection, blood samples were rapidly centrifuged (4000rpm, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) and plasma were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until biochemical assay. The next morning, individuals of each group (LD50/5, LD50, LD50x5, Controls) received an intra-peritoneal injection of either LPS or PBS. Eight hours later and 24 hours later, individuals were weighted and bled again for nitric oxide (NO) and haptoglobin measurements. Blood samples were collected, centrifuged and stored as previously described. Survival was monitored everyday and body mass was measured every day during one week post-injection (p.i.).

#### Nitric oxide assessment

In blood, nitric oxide has a half life of few seconds and is quickly oxidized in more stable inorganic nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Different techniques exist to estimate plasma nitric oxide from the total nitrite and nitrate concentrations. The colorimetric Griess Reaction assay

is a classical technique previously used in different studies in birds (e.g. Jarosinski et al., 2002; Bourgeon et al., 2007; Sild & Horak, 2009) and mammals (e.g. Jesch, 1998). The assay is based on the reaction of nitrite with Griess components. Nitrite is treated with a diazotizing reagent (sulphanilamide) in acidic media to form a transient diazonium salt. The intermediate is then allowed to react with a coupling reagent (N-naphtyl-ethylenediamine) to form a coloured stable azo compound.

To avoid the interference of proteins with the Griess Reaction assay, we first added 8.5µl of 75 mM zinc sulphate (ZnSO<sub>4</sub>) solution and 12µl of 55 mM Sodium hydroxide (NaOH) solution to 10µl of plasma sample. Samples were then centrifuged for 10 min at 10000rpm. Afterward, 20 µl of supernatant was collected and mixed with 6.6µl of ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl, 3M, pH=9) and 20µl of glycine buffer (0.2 M, pH=9.7) for next step.

To estimate NO, nitrates were converted into nitrite by treating samples with cadmium (Cd), a chemical reductant. Following Mani et al. (2002), cadmium pellets were activated with 0.1 M sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200µl per pellet). Acid was rinsed from the granules three times with ultra-pure water. Copper sulphate (CuSO<sub>4</sub>) at 0.15 M diluted in glycine buffer was then added (200µl per pellet). The cadmium pellets were shaken in copper sulphate solution for 2 min, then drained and dried over tissue paper before being quickly added to each sample tube. Tubes were shaken 10 min on an electric shaker with maximum force (1,400 rpm).

Twenty five micro-litres of each sample tube were added in a 96-well microplate. To perform the colorimetric reaction, 50µl of Griess reagent (25µl of sulfanilamide mixed with 25µl of N-naphtylethylenediamine) was added to each well. The absorbance of the purple azo compound produced, which is linearly proportional to the nitrite concentration (in µM) of the sample, was measured with a spectrophotometer at 540 nm. Samples were compared with a standard curve ranged from 0 to 200 µM and obtained by diluting 20µl of a stock solution of nitrate (NaNO<sub>2</sub>, 0.1M) in 980µl of ultra-pure water.

#### Haptoglobin assessment

To quantify haptoglobin (mg/ml), we used a commercial assay kit (TP801; Tri-Delta Diagnostics, NJ, USA) extensively used in inflammatory studies (ex. Millet et al. 2007; Cray, et al. 2009; Matson et al. 2012). The principle of the kit remains on the combined peroxidase activity of haemoglobin bound with haptoglobin at low pH. Preservation of the peroxidase activity of haemoglobin is directly proportional to the amount of haptoglobin in the sample (7.5µl) and is colorimetrically quantified by measuring absorbance at 630nm with a spectrophotometer.

### Molecular sexing

Blood samples (~50µl) were stored in 250µl EDTA buffer before DNA extraction. We then used a quick DNA extraction technic adapted from Wang et al. (1993) on whole blood to sex canaries. Two micro-litres of blood sample were added to 120 µl of NaOH (0.3M) and 2µl of PBS. After mixing, sample tubes were heat in boiling water for 2 min and mixed again. Reaction was then stopped with ice. The solution was diluted in 540µl of Tris Hcl buffer (100mM, pH=8). Two micro-litres of the diluted solution were necessary for PCR. We used the primers P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') and P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') to amplify a sex-specific region of the CHD-1 gene on sex chromosomes (Griffiths et al. 1998).

### Statistical analyses

Survival curves were built by computing the Kaplan-Meier estimators which allows analysing observations for which the complete distribution is not known (i.e., censored data). The effect of treatment group, sex and their interaction were tested with a general parametric model. Because in all cases scale parameter was less than 1 indicating that hazard decreased with time, we used Weibull error distribution instead of exponential distribution in the models. Moreover, Weibull distribution ameliorated the fit of the model compared to exponential one in most cases.

Increase of NO between t0 and 8h p.i., increase of haptoglobin between t0 and 24h p.i. and change in body mass, defined as maximum mass loss during the experiment (i.e. minimal mass – initial mass) were analysed using ANOVA after checking for normality and homoscedasticity of residuals. Treatment group, sex, their interaction and the initial covariate were introduced in the full model. Treatment and sex were considered as factors in all models. Post-hoc tests were performed using Tukey multiple pairwise comparisons of means to detect Tukey's honest significant differences (HSD) between treatment groups. Model selection was performed using stepwise backward procedure, removing non-significant terms (i.e. when  $P > 0.05$ ) beginning with the interactions with the largest P-value in each step until reaching the minimum adequate model (i.e. all  $P < 0.05$ ). Changes in sample sizes are due to mortality occurring after LPS challenge over the course of the experiment. All statistics were performed with R software version 2.15.0 (R Development Core Team, 2012).



## Results

Initially, the different species presented similar basal levels of NO but variable basal levels of haptoglobin (table 1). We found no initial effect of sex on basal levels of NO or haptoglobin except for hamsters (ANOVA:  $F_{1,21} = 5.29$ ,  $P = 0.032$ ) and sex dimorphism in body mass was evident in mice ( $F_{1,22} = 347.45$ ,  $P < 0.001$ ) and hamsters ( $F_{1,22} = 5.07$ ,  $P = 0.034$ ) contrary to canaries and zebra finches (all  $P > 0.05$ ; table 1).

Following the LPS challenge, we did not observe any mortality in birds, whereas mortality occurred in mice and hamsters. Ninety percents of non-surviving mice and 82% of non-surviving hamsters were treated at the LD50 or the LD50x5 doses. Only one mouse and 2 hamsters of the LD50/5 groups died and no control individuals died. Most mortality cases occurred before 72 h post-injection in mice (80%) and before 96 h post-injection in hamsters (figure 1). Survival was influenced by LPS injection (Chi<sup>2</sup>:  $P < 0.001$ ) in both species. In addition, hamsters showed a higher mortality in females than in males ( $P = 0.045$ ).

Eight hours after LPS injection, circulating NO increased in treated mice ( $F_{3,19} = 15.79$ ,  $P < 0.001$ ). Post-hoc tests revealed significant differences between control group and treated groups (Tukey HSD: all  $P < 0.05$ ) and among treated groups (LD50 group  $>$  LD50/5 group;  $P = 0.037$ ; figure 2). In birds no treatment effect was detected on NO levels (all  $P > 0.05$ ).

Twenty-four hours after LPS challenge, haptoglobin increased in treated mice ( $F_{3,19} = 10.43$ ,  $P < 0.001$ ; figure 3a) and treated hamsters ( $F_{3,19} = 11.73$ ,  $P < 0.001$ ; figure 3b). Control group was significantly different from all treated groups in both species (all  $P < 0.05$ ). In contrast, no treatment effect was detected on haptoglobin production in birds (all  $P > 0.05$ ).

Over the course of the experiment, LPS challenge caused body mass loss in treated mice ( $F_{3,19} = 5.26$ ,  $P = 0.008$ ) as LD50/5 and LD50 groups, but not LD50\*5 group ( $P = 0.091$ ), lost more body mass than control group ( $P < 0.05$ ; figure 4a). A similar pattern was observed in hamsters, as we found a trend for a treatment effect on body mass loss ( $F_{3,19} = 3.01$ ,  $P = 0.056$ ). LD50 group tended to lose more body mass than control group ( $P = 0.068$ ). No other difference were significant ( $P > 0.05$ ; figure 4b). In birds, LPS challenge also caused a significant body mass loss of treated canaries ( $F_{3,19} = 5.50$ ,  $P = 0.006$ ; figure 4c) and treated zebra finches ( $F_{3,19} = 11.94$ ,  $P = 0.002$ ; figure 4d). Heavily treated groups (i.e. LD50\*5) suffered more than control group ( $P < 0.05$ ) and lighter dose groups (i.e. LD50/5;  $P < 0.05$ ).

## Discussion

The aim of our study was to explore fitness costs of inflammation, and mechanisms that dampen disabling effects of this immune process potentially involved in long life-span in birds compared to mammals. We conducted an *in vivo* approach to assess responses and costs initiated by inflammation in two species of birds and mammals with contrasted maximum life-span potentials. An increasing mortality with LPS dose was found in mammals whereas birds enjoyed a 100 % survival rate whatever the LPS dose. Disabling effect of LPS in birds appeared only through body mass loss, especially under the higher dose of LPS. Mechanisms investigated here revealed a strong contrast between birds and mammals, the later showing a clear production of NO and haptoglobin after LPS injection while there was no evidence for a clear reaction in birds. Therefore, there was an exacerbated sensitivity to LPS in mammals compared to birds, with a strong negative consequence on fitness.

The increase of circulating haptoglobin we observed in mice and hamsters indicates that inflammation has been activated by LPS injection. Disabling effects of an uncontrolled inflammatory response are well known in mammals, and their stronger expressions, severe sepsis and septic shock, still carry an important mortality rate in humans (Martins et al. 2003; Abraham & Singer 2007). Here, mice and hamsters mortality occurred in groups exposed to heavy doses of LPS (LD50 and LD50\*5) in proportions expected according to previous works (Tateda et al. 1996). The short term mortality which occurred in few days following exposure to LPS suggests that severe sepsis and septic shock were the main cause of lethality (Remick et al., 2002; Xiao et al., 2006). There is now considerable immunohistochemical and biochemical evidence demonstrating that oxidative stress is a significant component of inflammatory disorders including under their more severe occurrence (Thiemermann & Vane 1990; Salvemini & Cuzzocrea 2002). More specifically, overproduction of NO contributes to inflammatory damage on a wide range of body structures. Compelling evidence comes from studies that inhibit the NO synthase, an enzyme whose induction triggers the production of NO, and show a reduced injury on organs such as liver (Thiemermann et al. 1995) or cardiovascular and pulmonary systems (Liu et al. 2009) with attenuation of organ failure in rats. In mice, the observed increase of circulating NO with LPS injection was comparable to increases found elsewhere in similar contexts (Tracey et al. 1995; Kaufmann & Kabelitz 2010) and its higher increase with higher doses of LPS suggests that oxidative damage contributed to observed mortality in mice and hamsters in our study (although we have to confirm it with NO assessment in hamsters).

Similar consequences of LPS-induced inflammation were not shown in zebra finches and canaries that seemed not sensitive to the activation of this component of immunity. Birds did not only show a 100% survival whatever the LPS dose injected, they also showed no significant increase in effectors and marker of inflammation we assessed. Obviously, the NO pathway is functioning in birds, as many in vitro and in vivo studies showed an increase of the inducible NO synthase or/and NO levels in a wide range of tissues after LPS injection or experimental infections in chickens (Crippen et al. 2003; Jarosinski et al. 2005; Macchi et al. 2010). Plasma NO also increases few hours after infections or LPS treatment (Takahashi et al. 1999; Jarosinski et al. 2002, 2005), as well as acute phase proteins or haptoglobin 6 to 18 hours post-injection in chickens and pigeons (Adler et al. 2001; Millet et al. 2007; Matson et al. 2012). There are very few studies that investigated NO and haptoglobin production after activation of inflammation in non model species. Cellier-Holzem et al. (2010) found that canaries experimentally infected with *Plasmodium relictum* showed higher levels of haptoglobin after 10 days post-infection compared to control birds. In addition, circulating NO appeared in slightly higher concentration in infected canaries than in controls (Bichet et al. in press). In these studies, birds reacted to real parasites that proliferated into their hosts. This underlines mechanisms, but observed levels and production dynamics reported in these cases can not be extrapolated to an inflammation triggered by non proliferating entities (e.g. LPS from lyophilized membranes of *E.coli*). Two studies activated inflammation using non proliferating agents. The first one showed an increased of haptoglobin in two species of sparrows (*Passer domesticus* and *P. rufocinctus*) 24 hours after injection of complete Freund's adjuvant (Martin et al. 2010), a compound that is used as a booster in vaccinations (Stills & Bailey 1991). The second one failed to detect any increase in haptoglobin 24 hours after exposure to LPS in the Red junglefowl (*Gallus gallus*) (McGraw & Klasing 2006). The absence of any marked increase in inflammatory effectors (nitric oxide) and inflammatory acute-phase protein (haptoglobin) in our case study might be due to very transitory cellular processes that did not allow us to catch peak immune response. More transient effects of immune activation in birds might be a sign of a more efficiently regulated immune response. Regulation of inflammation relies on cellular and molecular effectors and is an important component of immune system that dampens the disabling effects of inflammation (Belkaid 2007), and recent studies strongly suggest that this component is under selection (Belloni et al. 2010; Guerreiro et al. in press). Therefore, the negative effects (including those based on ROS and RNS production) rise not only from the strength of the response, but also depend on the efficiency of the regulation (Sorci & Faivre 2009). How

immune regulation play in our non model species remains to be elucidated, and mechanisms underlying such dynamic are still to be clearly exposed. For example, transfer proteins efficiency, and particularly circulatory phospholipid transfer protein (PLTP) that can rapidly neutralize LPS are promising candidates for future investigations (Gautier et al., 2008; Guyard-Dangremont et al., 1998). However, we might hypothesize that reduced susceptibility to inflammatory born disabling effects and mortality relies on very efficient regulatory processes.

Finally, only body mass loss, which was ranked from lower LPS to higher LPS dose, witnesses that birds were affected by LPS-induced inflammation in birds. This is a classical sign of the sickness behaviour (Inui 2001). In a first glance, body mass loss in mice and hamsters should be surprising because, except the difference between control and LPS groups, dose effect did not appear. However, we have to keep in mind that mortality occurred rapidly in heavily treated mammals that often did not survive longer enough to show body mass change. Therefore, body mass loss is biased by mortality in mammal species, and consequently increasing mass loss with increasing dose of LPS was not as evident as in birds.

Overall, our study clearly showed that, everything being equal, two short-lived mammal species were more susceptible to immune activation costs than two longer-lived bird species. In addition, they suggest that inflammatory mechanisms based on ROS and RNS release might be involved in this differential cost. These results could have direct implication in debate concerning mechanisms involved in excessive longevity of birds compared to relatively sized mammals. Our results are in the same line than studies focused on differences in longevity between birds and mammals and that found a higher rate of metabolic production of ROS (Barja 2004; Sanchez-Roman et al. 2012). However, we go further because we suggest that contrast in longevity between birds and mammals might be partially determined by negative effects of immune activation. Mammals might accumulate damage from less controlled acute and chronic inflammation with delayed effects in terms of reduced longevity. Conversely, birds seem to have evolved mechanism that dampen harmful consequences of inflammation and which can explain a generally better condition late in life and a longer longevity (Finch & Crimmins 2004, Ricklefs, 2008). Exact mechanisms associated with that lower susceptibility to inflammation in birds are still to be elucidated, and the efficiency of immune regulation in birds should deserve attention.

## Acknowledgment

We want to thank Stéphane Garnier for his help during the molecular sexing of the canaries. Thanks to Emilie Arnoux for her useful advice during biochemical analysis. We are also very grateful to Line Prezioso for managing the animal husbandry. BF and GS received financial support from the ANR (EVOREGIM).

## References

- Abraham, E. & Singer, M. (2007). Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Critical Care Medicine*, 35, 2408–2416.
- Adler, K.L., Peng, P.H., Peng, R.K. & Klasing, K.C. (2001). The kinetics of hemopexin and alpha1-acid glycoprotein levels induced by injection of inflammatory agents in chickens. *Avian diseases*, 45, 289–96.
- Barja, G. (1998). Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 854, 224–238.
- Barja, G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical productionDNA damage mechanism? *Biological Reviews*, 79, 235–251.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., López-Torres, M. & Pérez-Campo, R. (1994). A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals. *Comparative biochemistry and physiology Biochemistry and molecular biology*, 108, 501–512.
- Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*, 7, 875–888.
- Belloni, V., Faivre, B., Guerreiro, R., Arnoux, E., Bellenger, J. & Sorci, G. (2010). Suppressing an Anti-Inflammatory Cytokine Reveals a Strong Age-Dependent Survival Cost in Mice. *PLoS ONE*, 5.
- Bichet, C., Cornet, S., Larcombe, S. & Sorci, G. (2012). Experimental inhibition of nitric oxide increases *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) parasitaemia. *Experimental Parasitology*, In press.
- Bourgeon, S., Raclot, T., Lemaho, Y., Ricquier, D. & Criscuolo, F. (2007). Innate immunity, assessed by plasma NO measurements, is not suppressed during the incubation fast in eiders. *Developmental & Comparative Immunology*, 31, 720–728.
- Buttemer, W.A., Abele, D. & Costantini, D. (2010). From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, 24, 971–983.

- Caruso, C., Candore, G., Colonna-Romano, G., Lio, D. & Franceschi, C. (2005). Inflammation and life-span. *Science*, 307, 208–9.
- Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S. & Sorci, G. (2010). Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries. *International Journal for Parasitology*, 40, 1447–53.
- Clutton-Brock, T. & Sheldon, B.C. (2010). Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 562–573.
- Coussens, L.M. & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860–867.
- Cray, C., Zaias, J. & Altman, N.H. (2009). Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59, 517–526.
- Crimmins, E.M. & Finch, C.E. (2006). Infection, inflammation, height, and longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 498–503.
- Crippen, T.L., Sheffield, C.L., He, H., Lowry, V.K. & Kogut, M.H. (2003). Differential nitric oxide production by chicken immune cells. *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 603–610.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews. Microbiology*, 2, 820–32.
- Finch, C.E. (2007). *The Biology of Human Longevity*. Elsevier Ltd, London.
- Finch, C.E. & Crimmins, E.M. (2004). Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science*, 305, 1736–1739.
- Gautier, T., Klein, A., Deckert, V., Desrumaux, C., Ogier, N., Sberna, A.-L., et al. (2008). Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *The Journal of biological chemistry*, 283, 18702–10.
- Giunta, S. (2006). Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? *Immunity Ageing*, 3, 12.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J.G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7, 1071–1075.
- Guerreiro, R., Besson, A.A., Bellenger, J., Ragot, K., Lizard, G., Faivre, B., et al. (2012). Correlational selection on pro- and anti-inflammatory effectors. *Evolution*, In press.
- Gutteridge, J.M. (1987). The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 917, 219–223.
- Guyard-Dangremont, V., Desrumaux, C., Gambert, P., Lallemand, C. & Lagrost, L. (1998). Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate

- species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comparative biochemistry and physiology Part B Biochemistry molecular biology*, 120, 517–525.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*, 11, 298–300.
- Halliwell, B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in biochemical sciences*, 31, 509–15.
- Herrero, A. & Barja, G. (1997). Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mechanisms of Ageing and Development*, 98, 95–111.
- Hollyfield, J.G., Bonilha, V.L., Rayborn, M.E., Yang, X.P., Shadrach, K.G., Lu, L., et al. (2008). Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature Medicine*, 14, 194–198.
- Holmes, D. & Martin, K. (2009). A bird's-eye view of aging: what's in it for ornithologists? *Auk*, 126, 1–23.
- Holmes, D.J. & Austad, S.N. (1995a). The Evolution of Avian Senescence Patterns: Implications for Understanding Primary Aging Processes. *American Zoologist*, 35, 307–317.
- Holmes, D.J. & Austad, S.N. (1995b). Birds as animal models for the comparative biology of aging: a prospectus. *The journals of gerontology Series A Biological sciences and medical sciences*, 50, B59–B66.
- Hulbert, A.J. (2003). Life, death and membrane bilayers. *Journal of Experimental Biology*, 206, 2303–2311.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R. & Buttemer, W.A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews*, 87, 1175–1213.
- Hulbert, A.J., Trzcionka, M. & Buttemer, W.A. (2010). Membrane fatty acid composition and longevity of birds and mammals. In: *Longevity, mitochondria and oxygen free radicals* (eds. Pamplona, R. & Barja, G.). Research Signpost, Kerala, India, pp. 79–93.
- Inui, A. (2001). Cytokines and sickness behavior: implications from knockout animal models. *Trends in Immunology*.
- Jarosinski, K.W., Njaa, B.L., O'connell, P.H. & Schat, K.A. (2005). Pro-inflammatory responses in chicken spleen and brain tissues after infection with very virulent plus Marek's disease virus. *Viral immunology*, 18, 148–61.
- Jarosinski, K.W., Yunis, R., O'Connell, P.H., Markowski-Grimsrud, C.J. & Schat, K.A. (2002). Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Diseases*, 46, 636–649.

- Jesch, N. (1998). Formation of nitric oxide by rat and hamster alveolar macrophages: an interstrain and interspecies comparison. *Toxicology Letters*, 96-97, 47–51.
- Jones, O.R., Gaillard, J.M., Tuljapurkar, S., Alho, J.S., Armitage, K.B., Becker, P.H., et al. (2008). Senescence rates are determined by ranking on the fast-slow life-history continuum. *Ecology Letters*, 11, 664–673.
- Kaufmann, S.H.E. & Kabelitz, D. (2010). *Methods in Microbiology - Immunology of Infection*. Third Edit. Elsevier, Londo, UK.
- Kirkwood, T.B. & Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408, 233–238.
- Koutsos, E.A., Calvert, C.C. & Klasing, K.C. (2003). The effect of an acute phase response on tissue carotenoid levels of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative biochemistry and physiology Part A Molecular integrative physiology*, 135, 635–646.
- Ku, H.H. & Sohal, R.S. (1993). Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 72, 67–76.
- Lambert, A.J., Boysen, H.M., Buckingham, J.A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S.N., et al. (2007). Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging cell*, 6, 607–18.
- Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C., et al. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immunity ageing I A*, 2, 8.
- Lio, D., Scola, L., Crivello, A., Colonna-Romano, G., Candore, G., Bonafe, M., et al. (2002). Gender-specific association between-1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes and immunity*, 3, 30–33.
- Liu, Y.-C., Chang, A.Y.W., Tsai, Y.-C. & Chan, J.Y.H. (2009). Differential protection against oxidative stress and nitric oxide overproduction in cardiovascular and pulmonary systems by propofol during endotoxemia. *Journal of biomedical science*, 16, 8.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S. & Barja, G. (1993). Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and basal and maximum aerobic capacity. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 70, 177–199.
- Macchi, B. de M., Quaresma, J.A.S., Herculano, A.M., Crespo-López, M.E., DaMatta, R.A. & do Nascimento, J.L.M. (2010). Pathogenic action of *Plasmodium gallinaceum* in chickens: brain histology and nitric oxide production by blood monocyte-derived macrophages. *Veterinary parasitology*, 172, 16–22.
- De Magalhaes, J.P. & Costa, J. (2009). A database of vertebrate longevity records and their relation to other life-history traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1770–1774.



- Mani, A.R., Nahavandi, A., Moosavi, M., Safarinejad, R. & Dehpour, A.R. (2002). Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clinical and experimental pharmacology physiology*, 29, 905–908.
- Martin, L.B., Alam, J.L., Imboma, T. & Liebl, A.L. (2010). Variation in inflammation as a correlate of range expansion in Kenyan house sparrows. *Oecologia*, 164, 339–47.
- Martins, G.A., Da Gloria Da Costa Carvalho, M. & Rocha Gattass, C. (2003). Sepsis: a follow-up of cytokine production in different phases of septic patients. *International Journal of Molecular Medicine*, 11, 585–591.
- Matson, K.D., Horrocks, N.P.C., Versteegh, M.A. & Tieleman, B.I. (2012). Baseline haptoglobin concentrations are repeatable and predictive of certain aspects of a subsequent experimentally-induced inflammatory response. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 162, 7–15.
- McGraw, K.J. & Klasing, K.C. (2006). Carotenoids, Immunity, and Integumentary Coloration in Red Junglefowl (*Gallus Gallus*). *The Auk*, 123, 1161.
- Millet, S., Bennett, J., Lee, K.A., Hau, M. & Klasing, K.C. (2007). Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Developmental and comparative immunology*, 31, 188–201.
- Montgomery, M.K., Hulbert, A.J. & Buttemer, W.A. (2011). The long life of birds: the rat-pigeon comparison revisited. *PLoS ONE*, 6, e24138.
- Montgomery, M.K., Hulbert, A.J. & Buttemer, W.A. (2012). Does the oxidative stress theory of aging explain longevity differences in birds? I. Mitochondrial ROS production. *Experimental gerontology*, 47, 203–10.
- Ogburn, C.E., Austad, S.N., Holmes, D.J., Kiklevich, J.V., Gollahon, K., Rabinovitch, P.S., et al. (1998). Cultured renal epithelial cells from birds and mice: Enhanced resistance of avian cells to oxidative stress and DNA damage. *Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical*, 53A, B287–B292.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Sanz, A., Ayala, V., Vasileva, E. & Barja, G. (2006). Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *AGE*, 27, 267–280.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J., Thorpe, S., Herrero, A. & Barja, G. (1999). A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106, 283–296.
- Partridge, L. & Barton, N.H. (1993). Optimality, mutation and the evolution of ageing. *Nature*, 362, 305–311.
- Pearl, R. (1928). *The rate of living*. Knopf, New York.

- Pletcher, S.D., Kabil, H. & Partridge, L. (2007). Chemical complexity and the genetics of aging. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 38, 299–326.
- R Development Core Team. (2012). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria.
- Remick, D.G., Bolgos, G.R., Siddiqui, J., Shin, J. & Nemzek, J.A. (2002). Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*, 17, 463–467.
- Ricklefs, R.E. (1998). Evolutionary Theories of Aging: Confirmation of a Fundamental Prediction, with Implications for the Genetic Basis and Evolution of Life Span. *The American Naturalist*, 152, 24–44.
- Ricklefs, R.E. (2008). The evolution of senescence from a comparative perspective. *Functional Ecology*, 22, 379–392.
- Ricklefs, R.E. (2010). Insights from comparative analyses of aging in birds and mammals. *Aging cell*, 9, 273–84.
- Saito, H., Sherwood, E.R., Varma, T.K. & Evers, B.M. (2003). Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mechanisms of ageing and development*, 124, 1047–1058.
- Salvemini, D. & Cuzzocrea, S. (2002). Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 1173–1185.
- Sanchez-Roman, I., Gómez, A., Pérez, I., Sanchez, C., Suarez, H., Naudí, A., et al. (2012). Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria. *Biogerontology*, 13, 399–411.
- Sarkar, D. & Fisher, P.B. (2006). Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer letters*, 236, 13–23.
- Sild, E. & Horak, P. (2009). Nitric oxide production: an easily measurable condition index for vertebrates. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 959–966.
- Sorci, G. & Faivre, B. (2009). Review. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host–parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 71–83.
- Speakman, J.R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology*, 208, 1717–1730.
- Stills, H.F. & Bailey, M.Q. (1991). The use of Freund’s complete adjuvant. *Lab Animal*, 20, 25–30.
- Takahashi, K., Orihashi, M. & Akiba, Y. (1999). Dietary L-arginine level alters plasma nitric oxide and alpha-1 acid glycoprotein concentrations, and splenocyte proliferation in male

- broiler chickens following *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection. *Comparative biochemistry and physiology Part C - Toxicology & Pharmacology*, 124, 309–314.
- Tateda, K., Matsumoto, T., Miyazaki, S. & Yamaguchi, K. (1996). Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infection and immunity*, 64, 769–774.
- Thiemermann, C., Ruetten, H., Wu, C.C. & Vane, J.R. (1995). The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *British journal of pharmacology*, 116, 2845–2851.
- Thiemermann, C. & Vane, J. (1990). Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *European journal of pharmacology*, 182, 591–5.
- Tracey, W.R., Tse, J. & Carter, G. (1995). Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 272, 1011–5.
- Vajdovich, P. (2008). Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*, 38, 31–123.
- Victor, V.M., Rocha, M. & De La Fuente, M. (2004). Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International Immunopharmacology*, 4, 327–347.
- Wang, H., Qi, M. & Cutler, A.J. (1993). A simple method of preparing plant for PCR. *Methods*, 21, 4153–4154.
- Williams, G.C. (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution*, 11, 398–411.
- Xiao, H., Siddiqui, J. & Remick, D.G. (2006). Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infection and immunity*, 74, 5227–5235.

Table 1. Comparison of initial body mass, basal levels of NO and haptoglobin concentrations of the different species of mammals and birds (Mean  $\pm$  standard error).

Species	Initial Body Mass (g)		Basal NO ( $\mu$ M)		Basal Haptoglobin (mg/ml)	
	Females	Males	Females	Males	Females	Males
Mice	18.69 $\pm$ 0.16	24.12 $\pm$ 0.24	58.36 $\pm$ 1.70	58.8 $\pm$ 1.74	0.033 $\pm$ 0.018	0.034 $\pm$ 0.008
Hamsters	116.58 $\pm$ 1.36	121.03 $\pm$ 1.43	NA	NA	1.07 $\pm$ 0.17	0.63 $\pm$ 0.076
Canaries	20.68 $\pm$ 0.98	20.13 $\pm$ 0.52	58.77 $\pm$ 3.85	54.56 $\pm$ 2.79	0.097 $\pm$ 0.022	0.11 $\pm$ 0.027
Zebra Finches	16.79 $\pm$ 0.46	16.91 $\pm$ 0.63	57.17 $\pm$ 2.07	60.23 $\pm$ 2.10	1.19 $\pm$ 0.10	1.43 $\pm$ 0.11

NA: data not available. Assessment to be done.

Figure 1. Survival curves for mice (a) and hamsters (b).

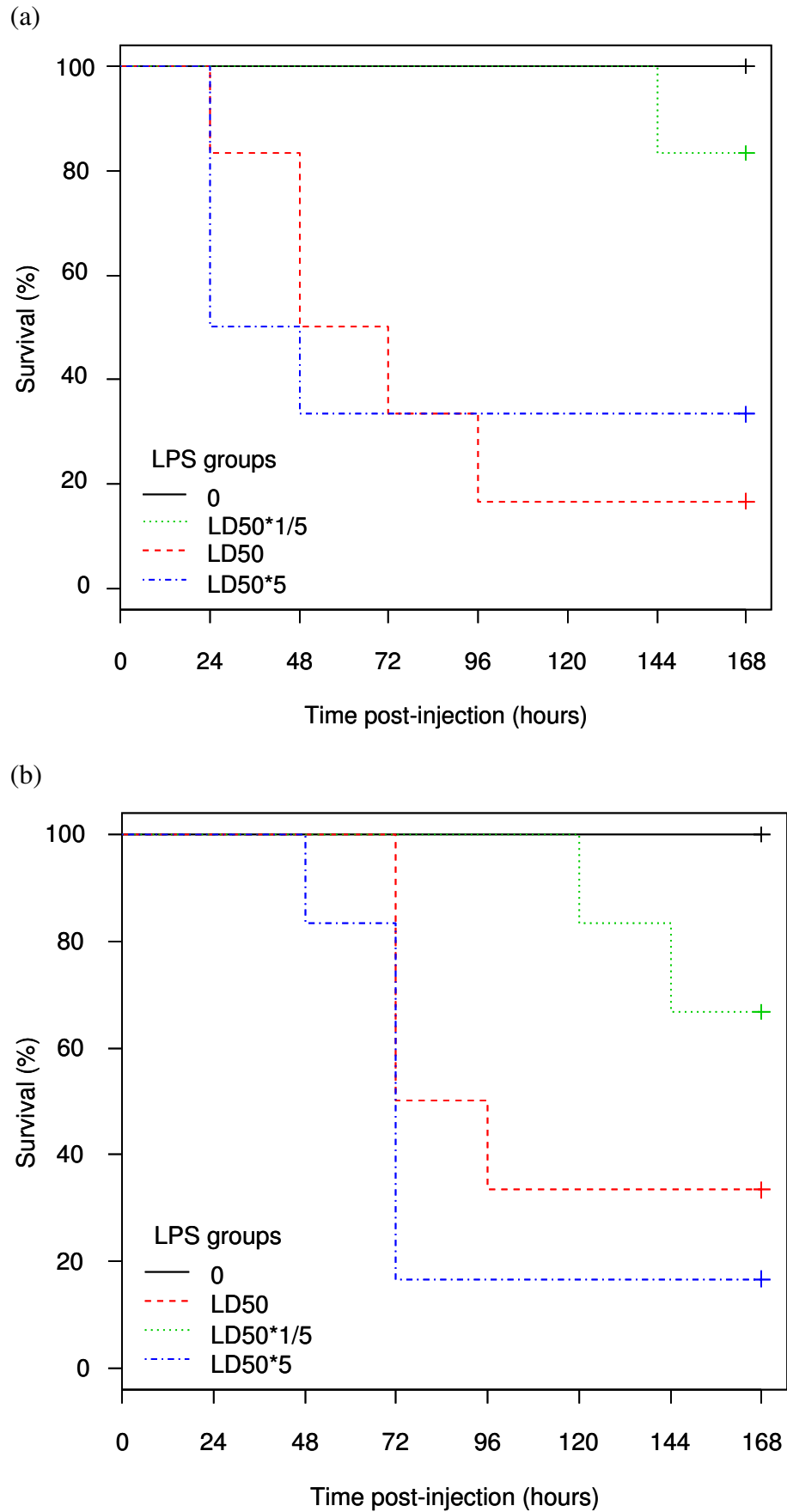


Figure 2. Change in circulating NO between t0 (24 hours before injection) and 8 hours post-injection in mice. Change = value at 8h post-injection – value at t0. The bars represent means values  $\pm$  S.E. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001

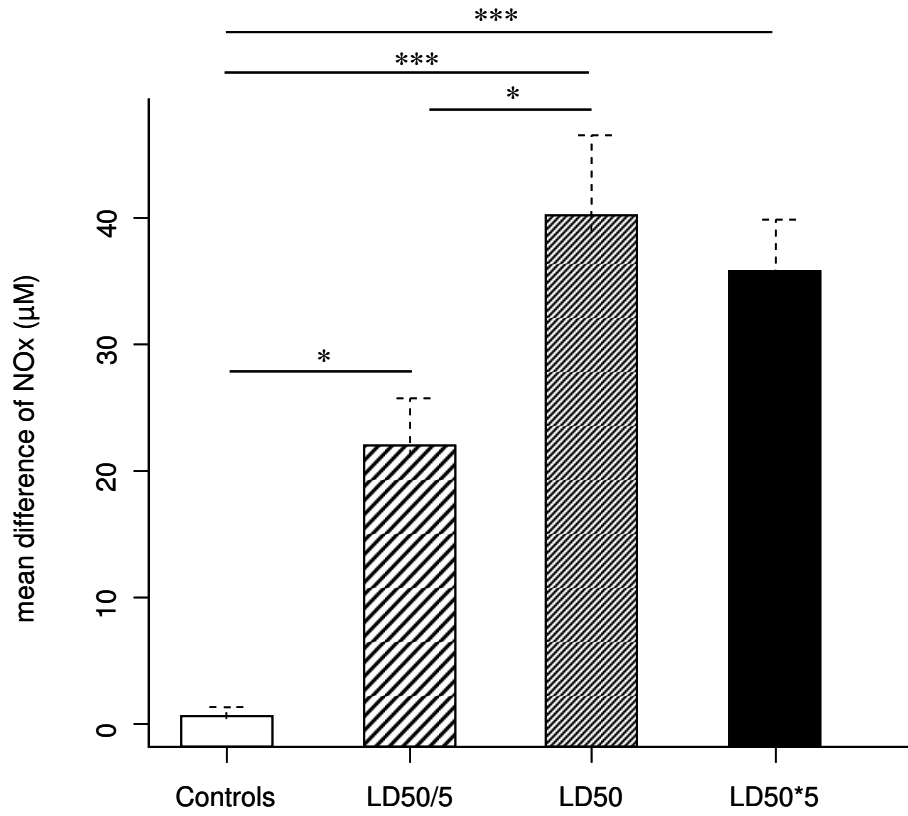


Figure3. Change in haptoglobin production between t0 (24 hours before injection) and 24 hours post-injection in (a) mice, and (b) hamsters. Change = value at 24h post-injection – value at t0. The bars represent mean values  $\pm$  S.E. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

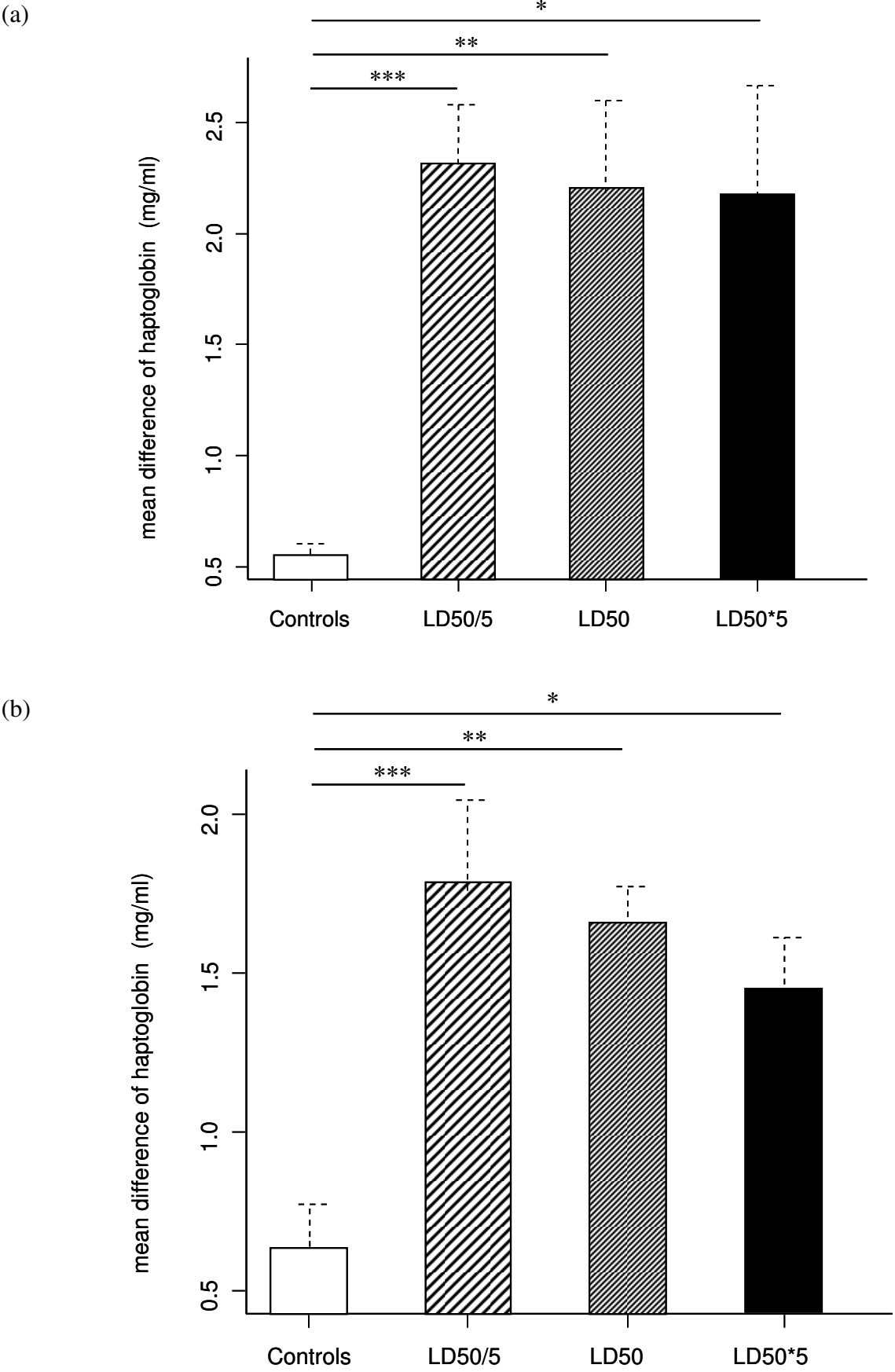
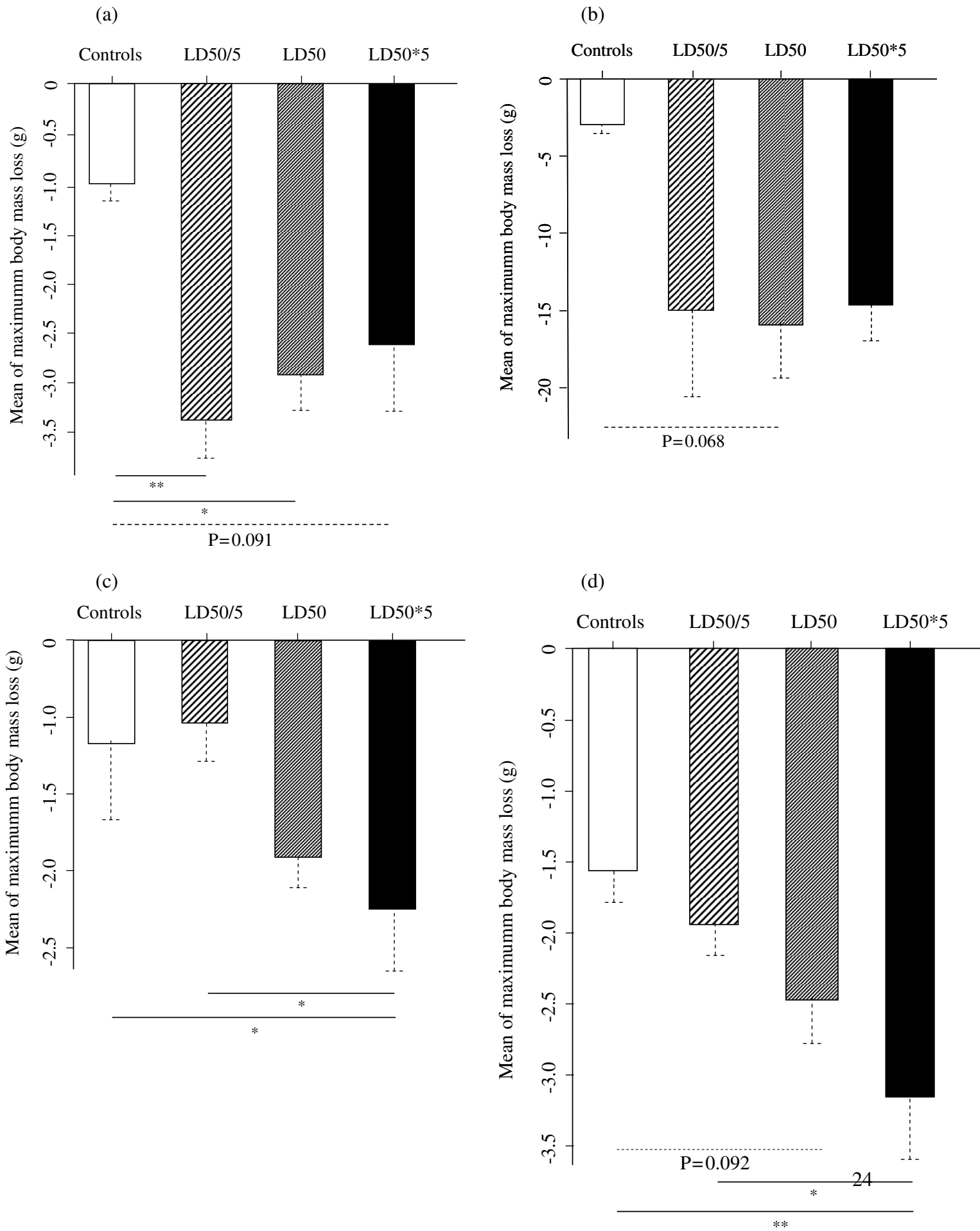


Figure 4. Maximal body mass loss in (a) mice, (b) hamsters, (c) canaries and (d) zebra finches. The bars represent mean values  $\pm$  S.E. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .





## **C**hapitre VI

### **La régulation de l'inflammation : perspectives évolutives**

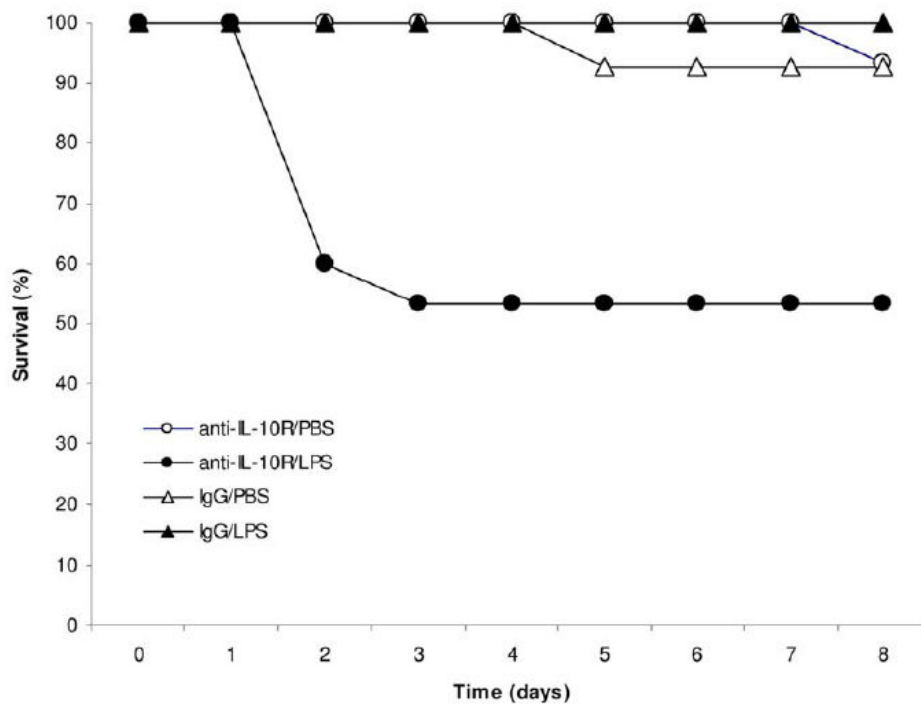
#### **1) Régulation de l'inflammation et âge**

Dans les études précédentes, nous nous sommes intéressés aux coûts de l'activation de la réponse immunitaire sur la longévité intra ou inter-spécifique. Cependant, nous n'avons jusque là pas fait de distinction entre les traits impliqués dans l'activation de la réponse (effecteurs pro-inflammatoires) et ceux impliqués dans la résolution de la réponse (effecteurs anti-inflammatoires). Cela est dû au fait que les outils moléculaires adéquats pour faire cette distinction ne sont pas disponibles à l'heure actuelle chez les modèles centraux qui constituent cette thèse, à savoir les oiseaux. De même, la plupart des études se sont jusqu'à maintenant attachées à mesurer uniquement l'intensité de la réponse et ses conséquences en terme de fitness. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, les conséquences de la réponse sont autant le résultat de l'efficacité à activer une réponse que de celle à réguler le processus qui peut se révéler néfaste pour l'individu en l'absence de résolution. Il est donc important de prendre en compte les mécanismes de régulation de la réponse lorsque l'on veut étudier les conséquences sur la fitness des hôtes et leur coévolution avec les parasites. D'autre part, nous avons également vu que les processus inflammatoires étaient sensibles à l'âge. En effet, l'activation répétée du système immunitaire au cours de la vie entraîne un glissement progressif vers un état pro-inflammatoire chronique avec l'âge, associé au déclenchement de maladies autoimmunes et d'origine inflammatoire qui caractérise le phénomène d'inflaming (Franceschi et al. 2000) et est plus généralement associé au vieillissement. Dans ce contexte, on peut s'attendre à ce que les mécanismes de régulation jouent un rôle majeur pour contrer les effets néfastes des dérèglements de la réponse avec l'âge.

Pour comprendre cet aspect crucial des mécanismes de régulation pour la fitness (survie) des hôtes et leur sensibilité à l'âge, nous avons réalisé une expérience de challenge au LPS chez des souris jeunes et des souris âgées, espèce pour laquelle les mesures d'effecteurs anti-inflammatoires sont disponibles. Nous avons étudié les conséquences de l'inhibition d'une voie de régulation immunitaire majeure (l'interleukine-10) suite à une activation antigénique au LPS. Nous avons ensuite mesuré un marqueur de la réponse aigue (sérum amyloïde A) et nous avons suivi la dynamique de perte de masse ainsi que la survie suite au challenge.

Les résultats indiquent un coût de l'absence de régulation de la réponse en termes de perte de masse chez les jeunes souris alors qu'un coût supplémentaire en termes de survie est enregistré chez les vieilles souris (voir figure 1 de l'article 4 ci-dessous), soulignant la sensibilité à l'âge de la composante de régulation immunitaire.

Ces résultats montrent l'importance de la prise en compte des différentes composantes de la réponse immunitaire pour comprendre leur implication dans la fitness des hôtes. Il reste à savoir si ces traits ont le potentiel pour évoluer sous sélection, et de quelle manière. Ces questions constituent l'objet du prochain chapitre où nous explorerons la forme de la sélection agissant sur des traits pro- et anti-inflammatoires, et des perspectives de cette thèse qui seront évoquées dans la dernière partie.



**Figure 1 de l'article 4.** Courbe de survie des souris vieilles (âgées de 15 mois) des différents groupes de traitements. Les individus des groupes contrôles reçoivent une injection de solution saline (PBS) alors que les traités reçoivent une injection antigénique de LPS. L'inhibition de la régulation immunitaire consiste à injecter des anticorps se liant aux récepteurs à l'IL-10 (anti-IL-10R) alors que les groupes contrôles correspondant reçoivent une autre immunoglobuline (IgG1) non complémentaire des récepteurs à l'IL-10 n'ayant par conséquent aucune action inhibitrice.

## Article 4

### **Suppressing an Anti-Inflammatory Cytokine Reveals a Strong Age-Dependent Survival Cost in Mice**

(Publié dans PLoS ONE (2010) 5: e12940)

# Suppressing an Anti-Inflammatory Cytokine Reveals a Strong Age-Dependent Survival Cost in Mice

Virginia Belloni<sup>1\*</sup>, Bruno Faivre<sup>1</sup>, Romain Guerreiro<sup>1</sup>, Emilie Arnoux<sup>1</sup>, Jérôme Bellenger<sup>2</sup>, Gabriele Sorci<sup>1</sup>

**1** BioGéoSciences, Unité Mixte de Recherche 5561, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Bourgogne, Dijon, France, **2** Physiopathologie des dyslipidémies, Unité Mixte de Recherche U866, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Bourgogne, Dijon, France

## Abstract

**Background:** The central paradigm of ecological immunology postulates that selection acts on immunity as to minimize its cost/benefit ratio. Costs of immunity may arise because the energetic requirements of the immune response divert resources that are no longer available for other vital functions. In addition to these resource-based costs, mis-directed or over-reacting immune responses can be particularly harmful for the host. In spite of the potential importance of immunopathology, most studies dealing with the evolution of the immune response have neglected such non resource-based costs. To keep the immune response under control, hosts have evolved regulatory pathways that should be considered when studying the target of the selection pressures acting on immunity. Indeed, variation in regulation may strongly modulate the negative outcome of immune activation, with potentially important fitness consequences.

**Methodology/Principal Findings:** Here, we experimentally assessed the survival costs of reduced immune regulation by inhibiting an anti-inflammatory cytokine (IL-10) with anti-IL-10 receptor antibodies (anti-IL-10R) in mice that were either exposed to a mild inflammation or kept as control. The experiment was performed on young (3 months) and old (15 months) individuals, as to further assess the age-dependent cost of suppressing immune regulation. IL-10 inhibition induced high mortality in old mice exposed to the mild inflammatory insult, whereas no mortality was observed in young mice. However, young mice experienced a transitory loss in body mass when injected with the anti-IL-10R antibodies, showing that the treatment was to a lesser extent also costly for young individuals.

**Conclusions:** These results suggest a major role of immune regulation that deserves attention when investigating the evolution of immunity, and indicate that the capacity to down-regulate the inflammatory response is crucial for late survival and longevity.

**Citation:** Belloni V, Faivre B, Guerreiro R, Arnoux E, Bellenger J, et al. (2010) Suppressing an Anti-Inflammatory Cytokine Reveals a Strong Age-Dependent Survival Cost in Mice. PLoS ONE 5(9): e12940. doi:10.1371/journal.pone.0012940

**Editor:** Derya Unutmaz, New York University, United States of America

**Received:** May 26, 2010; **Accepted:** August 24, 2010; **Published:** September 23, 2010

**Copyright:** © 2010 Belloni et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Financial support was provided by the Region Bourgogne to VB, BF, and GS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: virginia.belloni@u-bourgogne.fr

## Introduction

Costs and benefits of the immune response have attracted considerable attention in the last years among evolutionary biologists [1–3 for reviews]. Ecological immunology considers the immune response as a trait whose expression should be optimized by natural selection as to maximize fitness. Therefore, the central paradigm of ecological immunology follows an economical perspective and postulates that immune defences are beneficial, but also costly, and that natural selection should minimize the ratio between costs and benefits [2,3]. Costs occur when investment into immune defences is afforded at the expense of other fitness-related functions, generating trade-offs between competing traits [1,2]. Most ecological immunology studies have focused on such resource-based costs of immunity [4,5], and with a few exceptions [6–9], have neglected resource independent costs. This is surprising, given the potentially devastating costs of autoimmunity. Indeed, the immune system can be depicted as a two-edged sword where one edge protects against infectious

diseases and the other edge exposes to the risk of misdirected or over-reacting immune responses [10]. This phenomenon is generally called immunopathology and illustrates the process of immune system attacking self-structures of the host. Classical examples of immunopathology are those due to inflammation, a crucial component of the immune system. Several diseases arise as collateral undesirable short-term or delayed outcomes of acute and chronic inflammation, especially in advanced age [11–14].

Since an over-reacting immune response, or a response failing to make a distinction between self and non-self, potentially generates substantial fitness costs, organisms have evolved regulatory mechanisms based on cells and effectors whose function is to control the immune system and dampen the negative consequences of its activation. Therefore, in addition to the selection pressures acting on the allocation pattern of energy/resources to immune organs and cells, it seems plausible to expect strong selection on the regulatory mechanisms that prevent the system to get out of control. However, in spite of its importance, immune regulation has been neglected in studies devoted to the

evolutionary forces shaping immune functioning. Here, we wished to assess the cost of suppressing the regulatory mechanisms underlying the control of the inflammatory response.

Inflammation is a non-specific process characterized by the delivery of effectors from the blood into infected tissues, and whose function is to fend off invading pathogens. At the systemic level, the inflammatory response induces fever, an increased number of leucocytes recruited for defence, and elevated levels of pro-inflammatory cytokines driving the microbicidal activity of phagocytic cells [10]. This category of immune cells produces cytotoxic compounds such as enzymes, lytic peptides or reactive oxygen and nitrogen species that kill pathogens [15,16]. Inflammation is characterized by its rapidity (it occurs within minutes and hours after the encounter with a pathogen) and endows organisms with potent weapons to cope with infection. The most compelling support to this view is the high sensitivity to infection, and the drastically shortened survival prospect, of organisms with a defective inflammatory response [15]. However, because the compounds delivered during the inflammatory response do not discriminate between host and pathogen structures, they can potentially damage host's cells and tissues. Therefore, an over-expressed or misdirected inflammation may also inflict collateral damage to the host, and there is now extensive evidence showing that the cost of infection may be due to inflammatory-borne damage more than to a direct effect of the pathogen [17,18].

To protect their structures from inflammatory injury, hosts have evolved regulatory mechanisms based on specific cytokines (e.g., interleukin-10, IL-10) controlling the resolution of inflammation. There exists a polymorphism in genes that code for such regulatory mechanisms [19,20] and environmental effects (such as pathogen exposure, individual age) can, as well, shape the pattern of immune regulation.

In this study, we inhibited an anti-inflammatory cytokine in order to assess the cost of reduced immune regulation in mice. We used a full factorial design with three factors: suppression of an anti-inflammatory cytokine [injection of anti-IL-10 receptor antibodies (anti-IL-10R) *vs.* rat IgG1 antibodies (IgG)], stimulation of the inflammatory response [injection of an *E. coli* lipopolysaccharide solution (LPS) *vs.* phosphate buffered solution (PBS) injection], age (3 *vs.* 15 month old).

## Materials and Methods

### Ethics Statement

The experiment has been conducted in compliance and has received the agreement of the Animal Care and Ethical Committee of the Université de Bourgogne, Dijon (protocol # 6904).

### Animals and reagents

Sixty young (3 months old) and sixty old (15 months old) virgin male C57BL/6 mice were purchased from Janvier (Laval, France). Upon arrival at the laboratory, animals were individually housed in Plexiglas cages and kept in an air-conditioned room (temperature  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity  $60 \pm 10\%$ ) with a 12-hours light/dark cycle. Pellet food and tap water were provided *ad libitum*.

### Treatment procedure

Young and old mice were randomly assigned to one of four groups (15 individuals per treatment). At day 0, the group "anti-IL-10R" received an intraperitoneal injection of 20  $\mu\text{g}$  of monoclonal anti-IL-10 receptor antibodies (1B1.3a; BD PharMin-

gen), whereas the group "IgG" received an intraperitoneal injection of 20  $\mu\text{g}$  of rat IgG1 antibodies (Sigma) for control. At day 1, half of the males in each group were intraperitoneally injected with a solution of lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* (serotype 055:B5, Sigma) at a dose of 0.05 mg/kg, whereas the other half were injected with a phosphate buffered solution (PBS) for control. This LPS dose is more than 500-fold and 30-fold lower than the 50% lethal dose of LPS in 2-month and 24 month old mice, respectively [21]. No injection was applied at day 2. This injection scheme was repeated three times, each three days, and the entire experiment covered a 9 day period.

Blood samples were obtained by retroorbital puncture immediately before the first injection (day 0) and 24 hours after the last injection (day 8). Body mass ( $\pm 0.1$  g) was measured at day 0, 2 and 8. Mortality rate was recorded every day for the duration of the experiment.

### Serum amyloid A quantification

Serum amyloid A (SAA), a protein of the acute phase response, was quantified using an immunoassay kit (Mouse SAA, KMA0011, Invitrogen). Coloration of the antibody complexes was measured with a spectrophotometer (spectramax plus 384, molecular device) at 450 nm.

### Statistical Analyses

Differences in survival rate were analyzed with a Log-rank test. We also used a log-linear model where in addition to the treatment we included changes in body mass as a potential predictor of survival rate. Two 15-month old male died during the first injection and were therefore removed from the survival analysis.

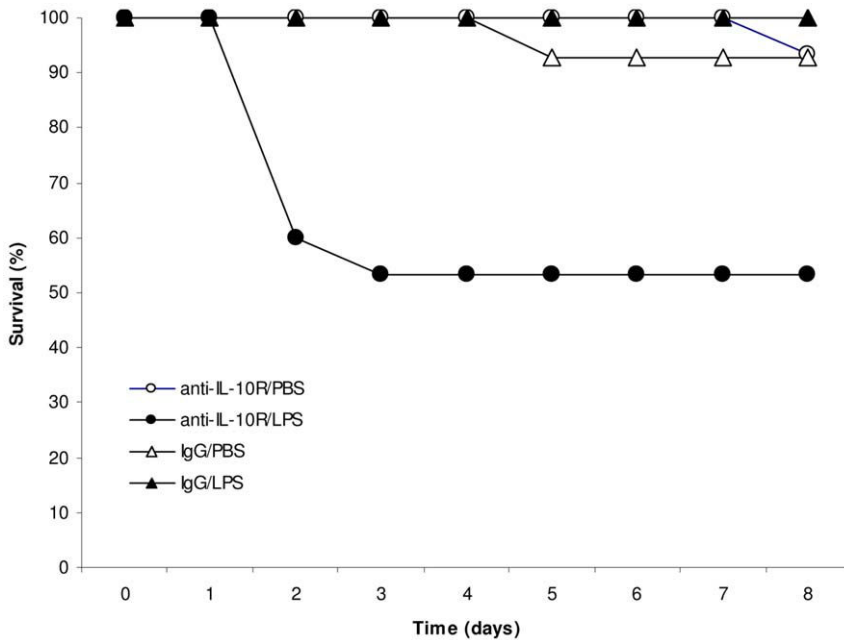
Generalized linear mixed models were used to assess the effect of the treatments and age on changes in body mass and SAA, with individual identity declared as a random variable. We started with the full model and then we dropped all non significant three- and two-way interactions. Degrees of freedom were adjusted using the Satterthwaite method. All the analyses were done with SAS (2001) [22].

## Results

During the course of the experiment no young mice died (0/60), whereas 9 out of 58 old mice died (Fisher exact test,  $P=0.0012$ ). The analysis of the effect of the treatment on the survival was, therefore, restricted to aged mice. Old individuals treated with anti-IL-10R and with LPS suffered a substantially higher mortality rate compared to the other three groups (Log-Rank,  $\chi^2_3 = 17.15$ ,  $P=0.0007$ , Figure 1), with mortality of anti-IL-10R/LPS mice occurring at days 2 and 3. The log-linear model further revealed that the interaction between the two treatments was statistically significant and that changes in body mass during day 0 and 2 did not predict survival prospects (table 1). Overall, these results show a strong effect of the suppression of the anti-inflammatory cytokine in old mice exposed to a mild inflammation, and suggest that mortality was not directly linked to changes in body mass.

Changes in body mass during the course of the experiment depended on the interaction between the two treatments and the interaction between the anti-IL-10R treatment and age (table 2). As expected, LPS injection induced a quite substantial reduction in body mass, mass loss being even greater in the anti-IL-10R group (Fig. 2a). Body mass of PBS injected mice was stable during the course of the experiment (Fig. 2b).

Anti-IL-10R treated young mice suffered from a reduction in body mass, whereas control (IgG injected) individuals had stable body mass (Fig. 3a). On the contrary, the anti-IL-10R treatment



**Figure 1. Survival rate of 15 month old mice during the course of the experiment for the two treatments.** Empty dots: anti-IL-10R/PBS; full dots: anti-IL-10R/LPS; empty triangles: IgG/PBS; full triangles: IgG/LPS. None of the 3 month old mice died during the course of the experiment. doi:10.1371/journal.pone.0012940.g001

had no effect on body mass variation of old mice (Fig. 3b). This result is not the consequence of selective disappearance of old mice with the strongest body mass decrease because i) as shown above, mortality occurred independently from changes in body mass; ii) the same results were obtained when restricting the analysis of body mass variation on day 0 and 2 (i.e., when all mice were still alive).

Both treatments had a strong effect on the production of the serum amyloid A (SAA), a protein of the acute phase response (table 3). The anti-IL-10R injection induced an increased concentration of plasmatic SAA compared to controls (Fig. 4), as did the injection of LPS compared to PBS (Fig. 5). Interestingly, however, age did not modulate the SAA production in response to the two treatments (table 3).

**Discussion**

Here, we explored the fitness consequences of inhibiting an anti-inflammatory cytokine both under a mild inflammatory challenge and control conditions. Our findings show that suppressing the

anti-inflammatory regulation leads to high mortality. Interestingly, however mortality only occurred in conjunction with the activation of the inflammatory response and in aged individuals. Although the treatment was repeated three times during the course of the experiment, mortality of LPS/anti-IL-10R treated mice only occurred following the first injection, suggesting that the treatment selected individuals with a particular pro- vs. anti-inflammatory profile [23]. Young individuals also suffered from the suppression of the immune regulation, since they experienced a reduction of body mass. However, this body mass loss was transitory and did not lead to any mortality.

**Table 1. Log-linear model reporting the effect of the experimental treatments and body mass variation (percent variation in body mass between day 0 and day 2) on the survival rate of 15 months old mice.**

Source of variation	df	$\chi^2$	P
Percent variation in body mass	1	0.13	0.7162
Anti-IL-10R vs. IgG (Tr1)	1	4.07	0.0435
LPS vs. PBS (Tr2)	1	0.231	0.6332
Tr1 x Tr2	1	4.28	0.0386

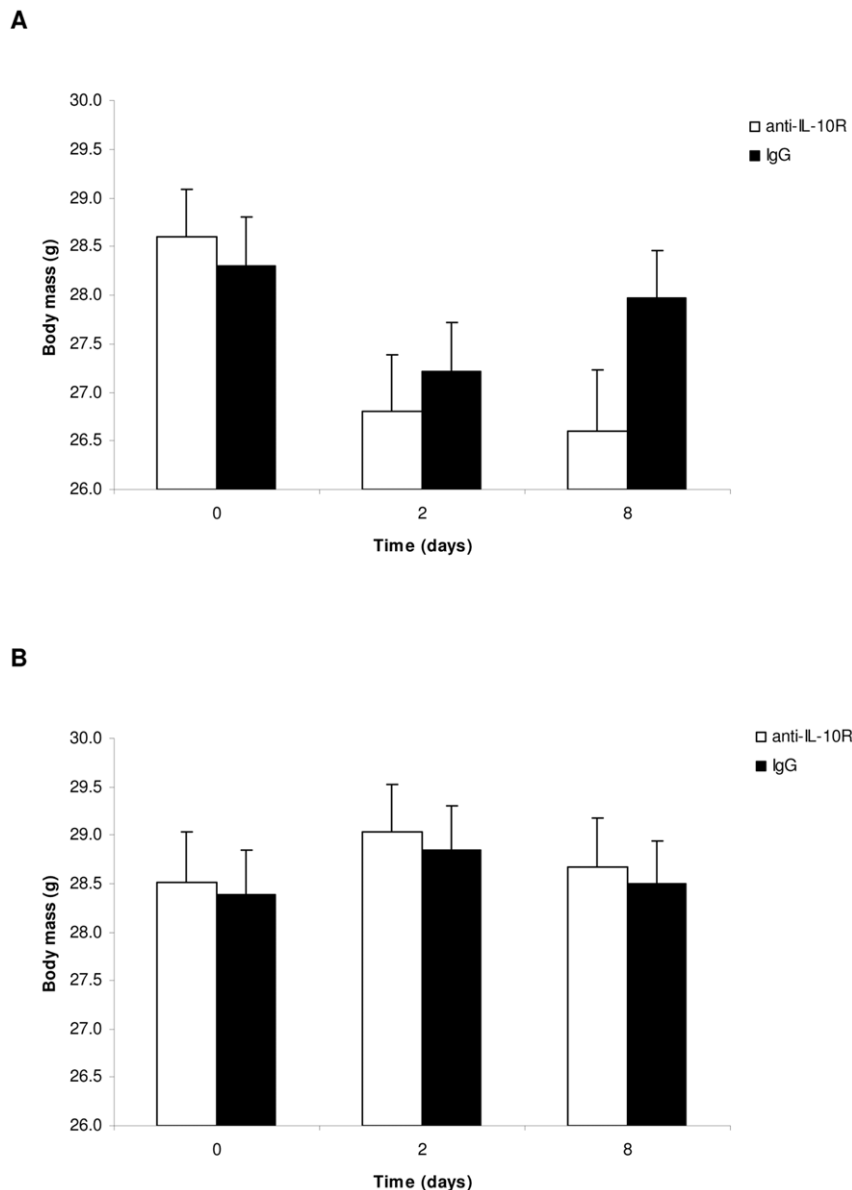
doi:10.1371/journal.pone.0012940.t001

**Table 2. Generalized linear mixed model reporting the effect of the experimental treatments and age on the temporal variation in body mass (day 0, 2, 8).**

Source of variation	df	F	P
Time	2,216	10.41	<0.0001
Anti-IL-10R vs. IgG (Tr1)	1,114	0.06	0.8048
LPS vs. PBS (Tr2)	1,114	12.21	0.0007
Age	1,114	213.84	<0.0001
Tr1 x Time	2,216	3.09	0.0476
Tr2 x Time	2,216	41.52	<0.0001
Age x Time	2,216	1.24	0.2919
Tr1 x Tr2	1,114	0.73	0.3939
Tr1 x Age	1,114	0.86	0.3552
Tr1 x Tr2 x Time	2,216	4.36	0.0140
Tr1 x Age x Time	2,216	3.81	0.0236

Mouse identity was fitted into the model as a random factor as to take into account the repeated nature of the data.

doi:10.1371/journal.pone.0012940.t002



**Figure 2. Temporal change in body mass of mice treated with anti-IL-10R antibodies or IgG.** (A) LPS; (B) PBS. The bars represent the mean  $\pm$  SE.

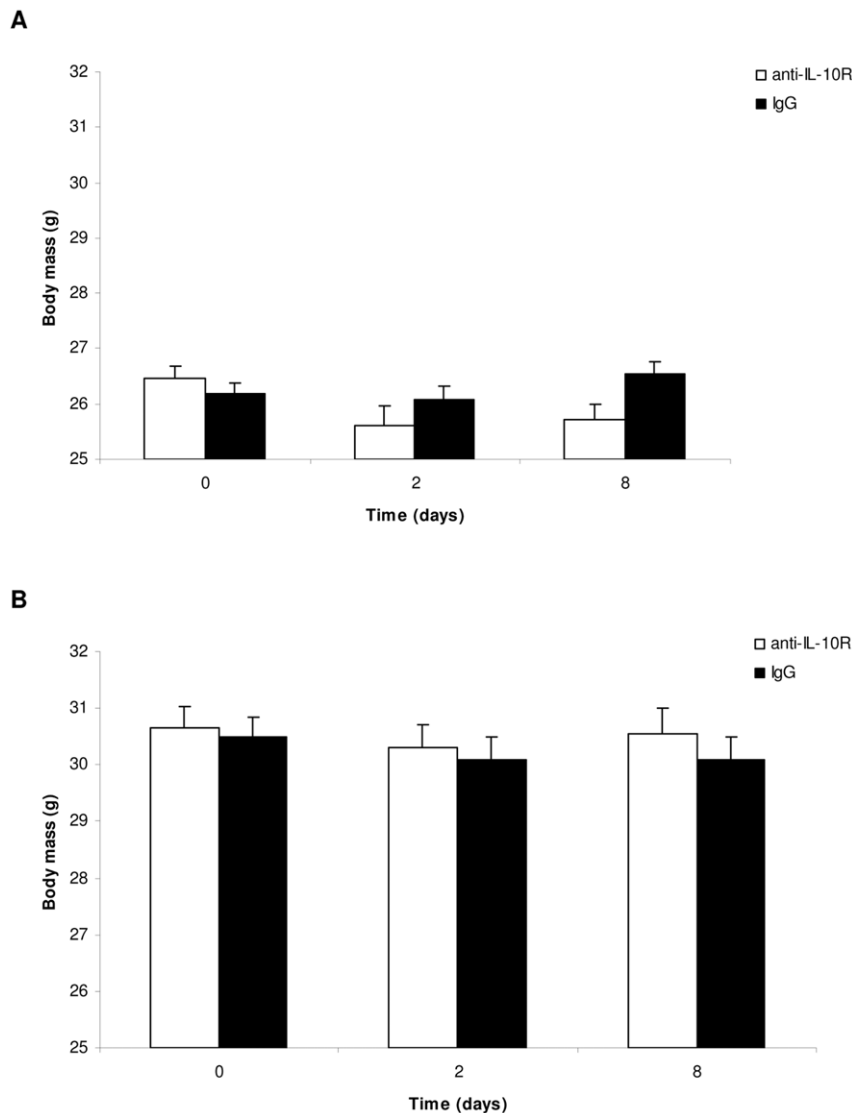
doi:10.1371/journal.pone.0012940.g002

While most ecological immunology studies implicitly assumed that evolution has shaped immune defences through resource-based trade-offs with other competing crucial traits [2,3], our findings show that immunopathology can generate substantial costs, directly impairing survival prospects. Previous work has already put forward the potential role of autoimmune disorders in the evolution of immune defences [6–8,24]. However, to our knowledge, this is the first study showing strong age-dependent survival cost of immune regulation suppression. This finding corroborates the view that immune regulation is a key process that should be considered when investigating the outcome of immune activation and its effects on host fitness.

Our results show that age is a very important factor affecting the cost of inhibiting immune regulation. Immunosenescence refers to the age-associated changes in immune functioning that are observed in humans and animal models [25,26]. Immunosenes-

cence does not necessarily describe a decline in immune performance but rather a series of changes in immune effectors that can finally impair immune protection. Longitudinal studies of elderly humans have shown that some immune markers can be reliably used as predictor of short term (2-year) mortality [27]. These markers define the Immune Risk Phenotype (IRP) which is characterized by a depletion of CD95- virgin T cells and the expansion of CD28- T cells, resulting in an overall reduced T cell repertoire in old ages [28]. The IRP is, however, also characterized by an increase of pro-inflammatory cytokines (such as IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and a low grade, chronic inflammation [29]. Our finding that old mice paid a severe cost when the regulation of the inflammatory response was experimentally impaired is in agreement with these previous results and further stresses that increased susceptibility to inflammation is a reliable marker of immunosenescence.





**Figure 3. Changes in body mass of mice treated with anti-IL-10R antibodies or IgG.** (A) young individuals; (B) old individuals. The bars represent the mean  $\pm$  SE.  
doi:10.1371/journal.pone.0012940.g003

**Table 3.** Generalized linear mixed model reporting the effect of the experimental treatments and age on the temporal variation (day 0, and 8) in the plasma concentration of the serum amyloid A.

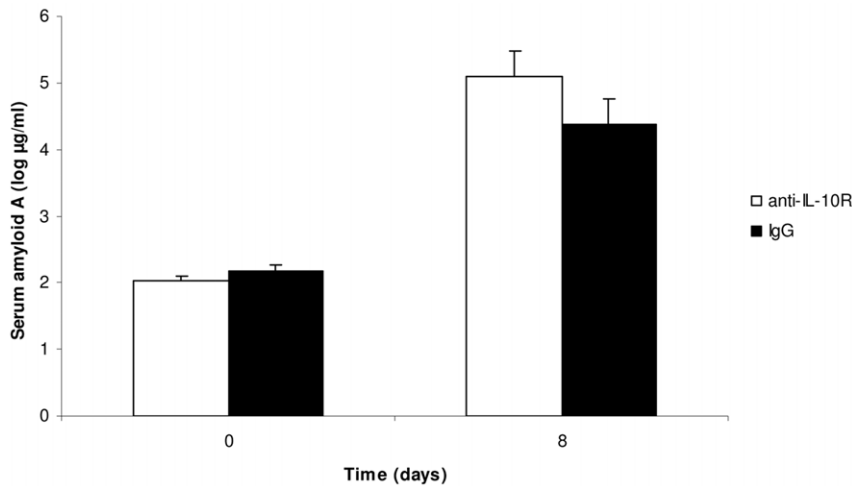
Source of variation	df	F	P
Time	1,151	203.88	<0.0001
Body mass	1,151	0.54	0.4628
Anti-IL-10R vs. IgG (Tr1)	1,151	3.086	0.0814
LPS vs. PBS (Tr2)	1,151	73.55	<0.0001
Age	1,151	0.36	0.5488
Tr1 x Time	1,151	5.88	0.0165
Tr2 x Time	1,151	93.24	<0.0001

Body mass at day 0 and 8 was also included as a covariate in the model. Mouse identity was fitted into the model as a random factor as to take into account the repeated nature of the data.

doi:10.1371/journal.pone.0012940.t003

One of the central tenets of ecological immunology is that natural selection shapes the optimal investment into immune defences as to maximize fitness. Over investment into immune defences might be maladaptive if this diverts resources from other vital functions; similarly, a too small investment might make hosts too vulnerable to parasite exploitation. We think that another dimension has to be added to this simple trade-off. In addition to the total investment into immunity, selection is likely to strongly act on how well this function is regulated. Ignoring immune regulation might, therefore, provide a misleading picture on the real target of selection. For instance, an individual with a low total investment into immunity but with poor regulation might pay higher cost of immune activation than an individual with a huge allocation into immune defences and a very effective immune regulation. Clearly, ecological immunology needs to explicitly take into account immune regulation to better assess the selection forces acting on immunity.

Cost of reduced immune regulation, as shown in this study, suggests that natural selection has the potential to mold this trait.



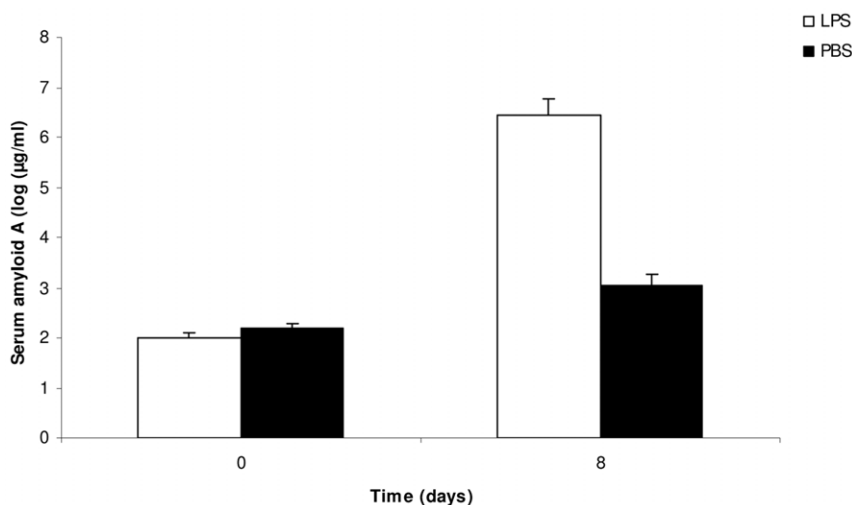
**Figure 4. Effect of the anti-IL-10R treatment on the production of plasmatic serum amyloid A.** The bars represent the mean  $\pm$  SE. doi:10.1371/journal.pone.0012940.g004

However, the strength of natural selection progressively declines with age, because the fraction of old individuals in a given population is much smaller than of young animals. We used for our study young adults (3 month old) and old (15 month old) mice. Fifteen month old mice can be considered old [30], but still not fully senescent individuals since animals that survived the experiment were still able to successfully reproduce (Belloni et al. unpublished). In addition to mortality cost paid by old individuals, young mice suffered from a transitory loss of body mass. Although all of them successfully recovered from the body mass reduction, it should be kept in mind that this occurred in a benign lab environment with no predators and food ad libitum. Therefore, overall, we believe that our results indicate that natural selection likely act on immune regulation.

In this study we focused on one anti-inflammatory cytokine (IL-10). IL-10 has been extensively studied during the last decade [31]. On one hand, IL-10 plays a crucial role in the resolution of inflammation and as such reduces the risk of immunopathology when organisms face an infectious disease. On the other hand, IL-

10 can impede parasite clearance by down-regulating the inflammatory response. This antagonistic action of IL-10 has been demonstrated in several studies where experimental suppression of IL-10 results in better parasite clearance and increased immune-borne damage [31]. For instance, mice infected with the malaria parasite *Plasmodium chabaudi* and whose IL-10 was experimentally neutralized experienced shorter time to death compared to infected/IL-10<sup>+</sup> controls, showing that immunopathology substantially contributes to the overall cost of infection in this system [32]. On the contrary, IL-10 deficient mice infected with the West Nile virus are better protected from the infection and enjoy a better survival than control, WNV infected mice [33]. These two examples illustrate how the costs and benefits of immune regulation are largely affected by the specific pathogens involved and how the immune system responds to them. However, to our knowledge, how age modulates the fitness costs and benefits of immune regulation has been largely overlooked.

To conclude, we report here experimental evidence showing that immune regulation is crucial for survival in aged individuals



**Figure 5. Effect of the LPS treatment on the production of plasmatic serum amyloid A.** The bars represent the mean  $\pm$  SE. doi:10.1371/journal.pone.0012940.g005

under a mild inflammatory challenge. To our view, this result opens a novel area of research on the fitness consequences of inter-individual variation in immune regulation.

## References

- Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: costly parasite defences and trade offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 11: 317–321.
- Zuk M, Stoehr AM (2002) Immune defense and host life history. *Am Nat* 160: S9–S22.
- Viney ME, Riley EM, Buchanan KL (2005) Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol Evol* 20: 665–669.
- Martin LB, Scheuerlein A, Wikelski M (2002) Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc R Soc B* 270: 153–158.
- Eraud C, Duriez O, Chastel O, Faivre B (2005) The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energetic trade-off. *Funct Ecol* 19: 110–118.
- Räberg L, Grahm M, Hasselquist D, Svensson E (1998) On the adaptive significance of stress induced immunosuppression. *Proc R Soc B* 265: 1637–1641.
- Räberg L, Vestberg M, Hasselquist D, Holmdahl R, Svensson E, et al. (2002) Basal metabolic rate and the evolution of the adaptive immune system. *Proc R Soc B* 269: 817–821.
- Graham AL, Allen JE, Read AF (2005) Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36: 373–397.
- Eraud C, Jacquet A, Faivre B (2009) Survival cost of an early soliciting in nature. *Evolution* 63: 1036–1043.
- Sell S (2001) Immunology, immunopathology, and immunity. Washington, DC: ASM Press.
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860–867.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365: 63–78.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, et al. (2008) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7: 256–269.
- Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, et al. (2008) Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med* 14: 194–198.
- Fang FC (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2: 820–832.
- Swindle EJ, Metcalfe DD (2007) The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory process. *Immunol Rev* 217: 185–205.
- Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, et al. (2007) Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 445: 319–323.
- Zampieri CA, Sullivan NJ, Nabel GJ (2007) Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat Immunol* 8: 1159–1164.
- Miteva L, Stanilova S (2008) The combined effect of interleukin (IL)-10 and IL-12 polymorphisms on induced cytokine production. *Hum Immunol* 69: 562–566.
- Kolla VK, Madhavi G, Reddy BP, Babu BMVS, Yashovanthi J, et al. (2009) Association of tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and interleukin 10 gene polymorphism with peripheral neuropathy in South Indian patients with type 2 diabetes. *Cytokine* 47: 173–177.
- Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K (1996) Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun* 64: 769–774.
- SAS Institute (2001) SAS/STAT Software. Version 9.1 SAS Publishing, North Carolina.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, et al. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908: 244–254.
- Sorci G, Faivre B (2009) Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Phil Trans R Soc B* 364: 71–83.
- Pawalec G (2006) Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol* 41: 1239–1242.
- Pawalec G, Larbi A, Derhovanessian E (2010) Senescence of the human immune system. *J Comp Path* 142: S39–S44.
- Pawalec G, Ouyang Q, Colonna-Romano G, Candore G, et al. (2002) Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for ‘immunologically risk phenotypes’. *Trends Immunol* 23: 330–332.
- Sansonni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biosini C, Zanni F, et al. (2008) The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol* 43: 61–65.
- Wikby A, Nilsson B-O, Forsley R, Thompson J, Strindhall J, et al. (2006) The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study of very late life functioning. *Mech Ageing Dev* 127: 695–704.
- Frasca D, Riley RL, Blomberg BB (2005) Humoral immune response and B-cell functions including immunoglobulin class switch are downregulated in aged mice and humans. *Seminars in Immunology* 17: 378–384.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180: 5771–5777.
- Long GH, Chan BHK, Allen JE, Read AF, Graham AL (2008) Experimental manipulation of immune-mediated disease and its fitness costs for rodent malaria parasites. *BMC Evol Biol* 8: 128.
- Bai F, Town T, Qian F, Wang P, Kamanaka M, et al. (2009) IL-10 signalling blockade controls murine West Nile virus infection. *PLoS Path* 5: 10.

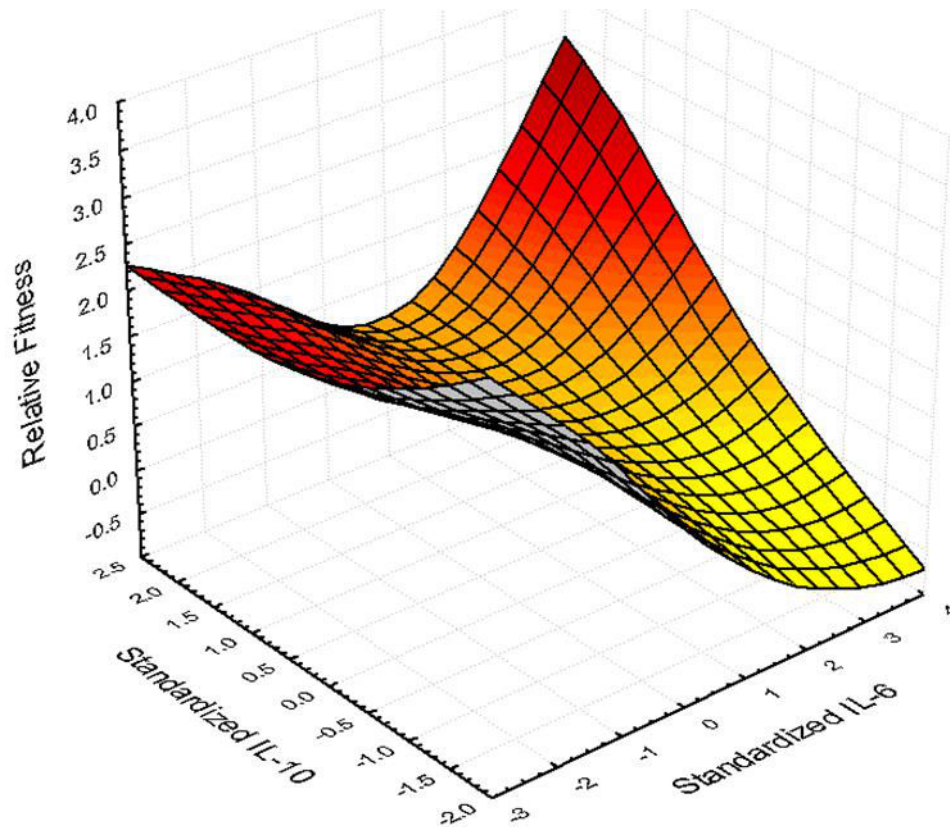
## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VB BF GS. Performed the experiments: VB BF RG EA JB GS. Analyzed the data: VB BF GS. Wrote the paper: VB BF GS.

## 2) Etude de la forme de la sélection agissant sur des traits immunitaires

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la régulation de la réponse immunitaire est cruciale pour éviter les dégâts d'une réponse devenue incontrôlable, en particulier pour certaines catégories d'âges, même lorsque la réponse inflammatoire est faiblement stimulée. Cependant, étant donnée la pression permanente exercée par les parasites sur les hôtes, l'efficacité de la réponse va dépendre à la fois de sa mise en place grâce à des effecteurs pro-inflammatoires pour éliminer les intrus mais également de sa résolution par des effecteurs anti-inflammatoires pour éviter les dommages collatéraux de la réponse. Ainsi, on peut s'attendre à ce que la pression de sélection agisse de concert sur les traits pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.

Nous avons voulu tester cette idée en étudiant la forme de la sélection agissant sur ces traits immunitaires. Pour ce faire, nous avons exposé des souris à une inflammation, cette fois assez sévère, par l'injection de LPS puis nous avons étudié à l'aide de méthodes statistiques adaptées (voir « material and methods » de l'article 5) la forme de la sélection agissant sur les traits immunitaires. Nous attendions une sélection corrélationnelle, c'est-à-dire une interaction entre réponse pro- (IL-6) et anti-inflammatoire (IL-10) sur la fitness en termes de survie suite au challenge. Nous avons en effet observé que les souris qui survivaient dans les meilleures proportions étaient celles qui présentaient des niveaux d'effecteurs de la réponse pro- et anti-inflammatoire simultanément élevés. Cela indique que c'est l'équilibre entre l'activation de la réponse et sa résolution qui permet une meilleure fitness dans un contexte infectieux, et suggère la prise directe avec la sélection de l'association de ces deux traits. Cependant, pour mieux étudier la réponse à la sélection de tels traits, il faut pouvoir répéter l'expérience sur plusieurs générations et utiliser des outils de génétique quantitative adaptés à ces questions. Nous discuterons des perspectives de ces travaux dans la dernière partie ci-dessous.



**Figure 3b de l'article 5.** Paysage adaptatif représentant la survie (« Relative Fitness ») en fonction de la réponse pro-inflammatoire (« Standardized IL-6 ») et de la réponse anti-inflammatoire (« Standardized IL-10 ») suite à un challenge immunitaire au LPS sur des souris. La surface de fitness illustre la sélection corrélacionnelle agissant de manière non-linéaire sur l'association des deux effecteurs pro- et anti-inflammatoires. On remarque en particulier que la fitness est maximale pour les valeurs maximales d'effecteurs pro- (IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10), traduisant le fait qu'une réponse équilibrée est déterminante pour la fitness. En l'absence d'une réponse régulée suite à son activation, la valeur de fitness diminue drastiquement (pour plus de détails, voir l'article 5 ci-dessous).

## Article 5

### **Correlational selection on pro- and anti-inflammatory effectors**

(Publié dans *Evolution* (2012) in press)

# CORRELATIONAL SELECTION ON PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTORS

Romain Guerreiro,<sup>1,2</sup> Anne A. Besson,<sup>1</sup> Jérôme Bellenger,<sup>3</sup> Kévin Ragot,<sup>4</sup> Gérard Lizard,<sup>4</sup> Bruno Faivre,<sup>1</sup> and Gabriele Sorci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biogéosciences, CNRS UMR 6282, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France*

<sup>2</sup>*E-mail: romain.guerreiro@u-bourgogne.fr*

<sup>3</sup>*Physiopathologie des dyslipidémies, INSERM UMR 866, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France*

<sup>4</sup>*Biochimie Métabolique et Nutritionnelle, INSERM UMR 866, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France*

Received November 30, 2011

Accepted April 22, 2012

Data Archived: Dryad: doi:10.5061/dryad.rb89t

Parasites impose a permanent threat for hosts. As a consequence, immune defenses are important for host fitness. However, the immune response can also produce self-damage and impair host fitness if not properly regulated. Effectors that up- and downregulate the immune response should, therefore, evolve in concert, and be under the action of correlational selection. To address this issue, we assessed the shape of the selection operating on pro- and anti-inflammatory effectors following an inflammatory challenge in laboratory mice. We found that selection acts on the combination of these two traits as individuals that produced large amount of pro-inflammatory cytokines could achieve relatively high fitness (survival) only if also producing a large amount of anti-inflammatory effectors. To our knowledge, this is the first study providing evidence for correlational selection on immunity.

**KEY WORDS:** Cytokines, Darwinian medicine, evolutionary immunology, IL-6, IL-10, immunopathology, inflammation, survival.

Parasites and pathogens are permanent threats for their hosts, and as such have promoted the evolution of defense mechanisms, including the immune system. Once infected, organisms deploy a complex array of physiological effectors whose ultimate function is to clear the infection (Kaufmann et al. 2002). Nevertheless, immune protection does not come without costs. During the last decade, the study of costly immune defenses has flourished. Ecological immunology has put immune defenses into the classical economical context that has been successfully applied to life-history traits (Sheldon and Verhulst 1996). Because immune functioning confers benefits in terms of parasite clearance but also incurs costs, natural selection is expected to minimize the ratio between costs and benefits (Zuk and Stoehr 2002; Schmid-Hempel 2003; Viney et al. 2005). The nature of the cost of immune defenses has been largely explored (Schmid-Hempel and Ebert 2003). Several studies have attempted to measure the metabolic

cost of immune activation with somehow mixed results (e.g., Martin et al. 2003; Eraud et al. 2005), whereas others have looked at the trade-off between immune activation and other fitness components, such as reproduction or growth (e.g., Bonneaud et al. 2003; Soler et al. 2003).

Recently, however, it has become clear that, in addition to these metabolic costs, the immune response can potentially impair host fitness if it targets host cells and tissues. Even though immunopathology and autoimmunity are the object of a main focus in biomedical research (Sell and Max 2001), their ecology and evolution has been mostly overlooked (Graham et al. 2005). In this context, the immune system can be seen as a double-edged sword. One edge allows to get rid of the parasite and contribute to health. The other edge is the consequence of an uncontrolled immune response that could partly damage and ultimately kill the host or reduce its life span (Belloni et al. 2010).



Because of its nonspecific nature, the inflammatory process is particularly relevant as a source of immunopathology. Indeed, several diseases arise as collateral undesirable short-term or delayed outcomes of acute and chronic inflammation, especially in advanced age (Coussens and Werb 2002; see also Sorci and Faivre 2009, for a recent review). Inflammation is a general defense mechanism that involves the recruitment of cells (e.g., leucocytes) at the site of injury. Upon recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors expressed on the surface of immune cells, the inflammatory response is initiated with the production of pro-inflammatory cytokines (i.e., TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6) that further contribute to the recruitment and activation of macrophages and granulocytes (Sell and Max 2001). The overproduction of these effectors can be a threat to organismal homeostasis, because cytokine storms are the main determinants of symptoms associated with many infectious diseases and septic shock (Annane et al. 2005; Graham et al. 2005). To keep the inflammatory response at bay, monocytes and regulatory T-cells produce anti-inflammatory cytokines (i.e., IL-10) whose function is to resolve inflammation (Ouyang et al. 2011).

Pro- and anti-inflammatory effectors have been extensively studied in the context of health sciences (Antonelli 1999); their role during sepsis and particularly their ability to predict survival in response to an infectious threat have already been emphasized (Dinarello 1997; Osuchowski et al. 2006; Yende et al. 2008). However, to the best of our knowledge, there is no study that has attempted to measure the shape of selection acting on these immune traits. When facing an infection, the final outcome in terms of host fitness is likely to depend on the balance between pro- and anti-inflammatory responses, rather than on single traits. An imbalance toward an anti-inflammatory response would insufficiently control the pathogen, whereas an imbalance toward a pro-inflammatory response would lead to harmful immunopathological effects. This leads to the clear-cut prediction that selection should operate on character combinations, instead of acting on each trait separately. Selection for optimization of character combination is often referred to as correlational selection (Blows and Brooks 2003).

We conducted an experiment on mice to assess the shape of selection acting on pro- and anti-inflammatory cytokines produced in response to a severe inflammatory insult. We challenged mice with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). LPS is a PAMP recognized by toll-like receptor 4, which leads to a strong but short and nonprogressive systemic inflammation (Saito et al. 2003). This experimental design allows assessing the fitness consequences of immune effectors produced in response to the challenge without the potential confounding effect of replicating parasites. This procedure has been often adopted in ecological

immunology studies (Bonneaud et al. 2003; Velando et al. 2006; Palacios et al. 2011).

## Material and Methods

### GENERAL PROCEDURE

One hundred and fifty adult virgin SWISS mice (50 males and 100 females) were used for this study. Fifty of them were purchased from Janvier (Laval, France), whereas the remaining mice were born in the animal facility at the Université de Bourgogne, produced by mice gathered from the same provider, and issued from 26 full-sibling families. Male mice were housed individually, whereas females were housed in groups of four in Plexiglas cages and kept under standardized conditions (temperature  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity  $60 \pm 10\%$ ) with a 12-h light/dark cycle. Pellet food and tap water were provided ad libitum.

### INFLAMMATORY CHALLENGE

When three-month old, mice were exposed to an inflammatory challenge. At day 0, in the morning, mice were weighed ( $\pm 0.1$  g) and a blood sample (100–150  $\mu\text{l}$ ) was collected by retroorbital puncture under isoflurane anesthesia and kept at  $4^\circ\text{C}$ . Blood was rapidly centrifuged (4000 rpm, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) and plasma was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until cytokine assay (see next section). At day 1, female mice received an intraperitoneal injection of *E. coli* LPS (16.7 mg/kg in 100  $\mu\text{l}$  of PBS) (LPS, serotype 055:B5, Sigma, St. Louis, MO) (Tateda et al. 1996). Given that males are known to be more sensitive to septic shock (Marriott and Huet-Hudson 2006), we injected them with a slightly smaller dose (13.9 mg/kg in 100  $\mu\text{l}$  of PBS). Three hours after the LPS injection (corresponding to the peak of circulating IL-6 and IL-10; Tateda et al. 1996), mice were weighed and bled again. Blood sampling took place in the morning as for day 0. Blood samples were centrifuged and plasma stored as mentioned above. Survival was monitored every 12 h and body mass measured every day during one week postinjection.

To make sure that any mortality and increase in cytokine production was due to the inflammatory challenge, we used an additional group of 24 mice as a control. These individuals were treated as the experimental mice with the exception that they were injected with 100  $\mu\text{l}$  of PBS, instead of LPS.

Three mice that did not respond to the LPS challenge (both in terms of change in body mass and circulating levels of IL-6 and IL-10), possibly because of injection failure, were excluded from the analyses.

The experiment has been conducted in compliance with and has received the agreement of the Animal Care and Ethical Committee of the Université de Bourgogne, Dijon (protocol B1510).



### CYTOKINE QUANTIFICATION WITH FLOW CYTOMETRIC BEAD-BASED ASSAY

We quantified plasma levels of two cytokines, IL-6 and IL-10. IL-6 is a good marker of infectious stress and is particularly important during severe septic shock. It is also often used as a marker for systemic activation of the inflammatory response (Barton 1997). IL-10 is an anti-inflammatory cytokine involved in the resolution of inflammation (Barsig et al. 1995; Couper et al. 2008). Circulating IL-6 and IL-10 were quantified by flow cytometry (Demas et al. 2011) using the Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Cytokine Flex Set kit (BD Biosciences, San Diego, CA) according to manufacture instructions and following previous work (Prunet et al. 2006). IL-6 and IL-10 kits consist of beads (diameter: 7.5  $\mu\text{m}$ ; excitation and emission wavelengths at 488 and above 600 nm [FL3], respectively) dyed to two different fluorescence intensities. Each particle is coupled to antibodies binding a specific cytokine (IL-6 or IL-10) and represents a discrete population, unique in its FL3 intensity. The captured cytokines are detected via a direct immunoassay using a specific antibody coupled to PE emitting at 585 nm (FL2). Data were acquired with FlowMax software (Partec, Munster, Germany) on a GALAXY flow cytometer (Partec) equipped with a laser emitting at 488 nm, and analyzed using BD CBA software (BD-Biosciences). Forward versus side scatter gating was employed to exclude any sample particle other than the 7.5  $\mu\text{m}$  beads. Data were displayed as two color dot plots (FL2 [PE]: band pass 580  $\pm$  10 nm vs. FL3 [beads]: long pass 665 nm) so that the discrete FL3 microparticle dye intensities were distributed along the y-axis. Ten point standard curves ranging from 20 to 5000 pg/mL were obtained by serial dilution of the reconstituted lyophilized standard. The lower limits of detection were 1.4 pg/mL for IL-6 and 9.6 pg/mL for IL-10.

### STATISTICAL ANALYSES

We used a well-established statistical framework to estimate the strength and mode of selection (linear and nonlinear selection) and to visualize it (Brodie et al. 1995; Blows and Brooks 2003). This multiple regression approach has been extensively used in evolutionary ecology studies (Kingsolver et al. 2001).

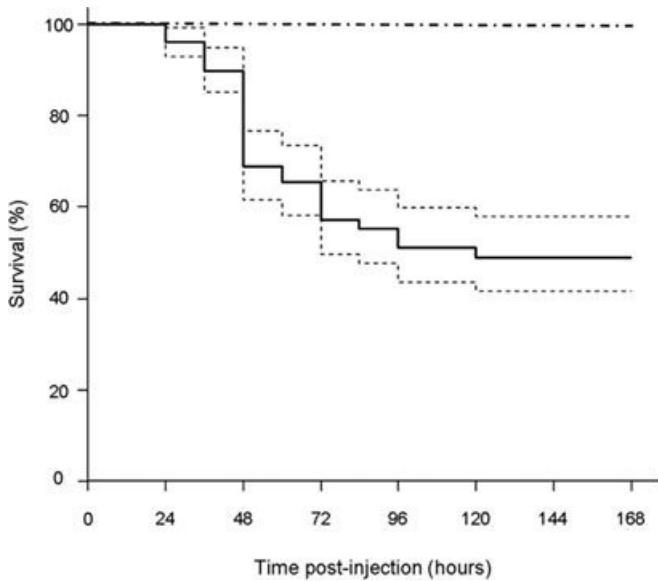
Following Lande and Arnold (1983), we regressed relative fitness (the individual survival divided by the mean survival of the LPS-injected population) on standardized log-transformed cytokines (mean = 0 and standard deviation = 1). Lande and Arnold (1983) defined the selection gradients as the “slope of the straight line that best describes the dependence of relative fitness on character  $z_i$ , after removing the residual effects of other character on fitness.” The slopes of the linear multiple regression provides the selection gradients, whatever the distribution of the fitness measurement and the measured traits (Lande and Arnold 1983).

To assess selection gradients, we used a mixed model that included linear, quadratic, and interaction terms as described in equation (1) (Blows and Brooks 2003)

$$w = \alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i z_i + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \gamma_{ij} z_i z_j, \quad (1)$$

where  $w$  is relative fitness,  $\alpha$  is the intercept,  $z_i$  are metric traits, and  $\beta_i$ ,  $\gamma_{ii}$ ,  $\gamma_{ij}$  are linear, quadratic, and correlational gradients. Quadratic selection gradients were doubled as recommended by Stinchcombe et al. (2008). In addition to the two cytokines, the initial model also included body mass at day 0, sex, and the origin of the mice (locally born or purchased from a provider), whereas family identity was declared as a random effect.

In many cases, however, fitness measurements are based on data with nonnormal distribution (binomial for survival or mating success, Poisson for lifetime reproductive success) and the  $P$ -values associated with the slopes of the linear regression are unreliable. For this reason, it is a common procedure to use models with the appropriate distribution of errors to infer the statistical significance of the selection gradients provided by the linear regression model (see for instance Råberg and Stjernman 2003). We therefore used a generalized linear mixed model with a binomial distribution of errors, a logit link function, and family identity declared as a random factor, to assess the  $P$ -values associated with the selection gradients. Nonsignificant terms (sex, initial body mass, origin of the mice) were removed until reaching the minimal adequate model. We used Wald  $Z$  and likelihood ratio test to infer the statistical significance of fixed and random effects, respectively (Bolker et al. 2009). We also checked for the overdispersion because Wald  $Z$  should be used only if data are not overdispersed. We computed the ratio between residual deviance and residual degrees of freedom (Crawley 2007) and found a ratio close to one (1.07), suggesting that the data were not overdispersed. Nevertheless, we also ran the model using a quasi-binomial distribution of errors and found consistent results, further suggesting that data overdispersion did not bias the statistical significance. In addition, to further assess if the error distribution of the data was correctly modeled, and to detect any departure from the model assumptions, we used a diagnostic procedure described by Zuur et al. (2009). The procedure consists in the graphical examination of the quantile–quantile plot (Zuur et al. (2009). The quantile–quantile plot is the graph of quantiles of residuals assuming the fitted model is the true model, against the actual quantiles of the residuals from the fitted model (Zuur et al. 2009). In the absence of major deviations from the model assumptions, fitted and simulated quantiles should lie on the equality slope (1:1). In agreement with this, we found that fitted and simulated quantiles were very close to the 1:1 line and within the simulated 95% pointwise confidence



**Figure 1.** Time course of mouse mortality after an LPS challenge (solid line). Dashed lines around the solid line represent 95% confidence interval. Most of the mortality occurred during the first three days after the inflammatory challenge. Mice injected with PBS (broken line) had a 100% survival during the same time period, showing that LPS was the specific cause of the observed mortality.

interval (see Fig. S1). This suggests that our logistic mixed model correctly fitted the data with no major departures from the model assumptions.

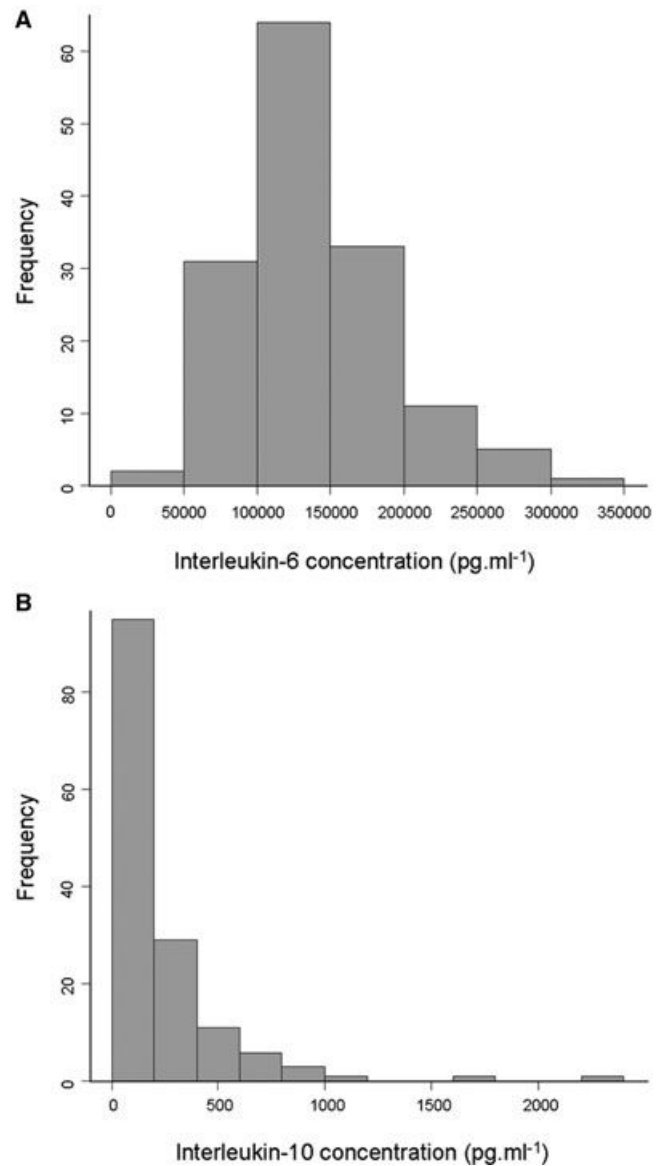
Changes in body mass during the course of the experiment were analyzed using a mixed model with a normal distribution of errors. Time postinjection, squared time, treatment (LPS vs. PBS), and sex were included as fixed factors, whereas mice identity and family were declared as random factors. This analysis only included mice that were still alive at the end of the experiment (one week postinjection) to avoid a possible effect of selective disappearance.

All the statistical analyses were performed using R software version 2.13.1 (R Development Core Team 2011). Three-dimensional visualization of the fitness surface was done using a cubic spline fitting function with the software STATISTICA (StatSoft 1999).

## Results

Over the course of the experiment 51% of the mice died. Eighty four percent of the total mortality occurred during the 72 h that followed the LPS injection (Fig. 1).

Baseline levels of IL-6 and IL-10 were very low and below the detection threshold of the flow cytometer, indicating that none of the individuals used for this study suffered from inflammatory



**Figure 2.** Frequency distribution of IL-6 (A) and IL-10 (B) titers.

disorders prior to the immune challenge. Three hours postinjection mean ( $\pm$  SE) plasma levels of IL-6 and IL-10 were  $139.94 \pm 4.36$  ng/mL and  $188.4 \pm 25.2$  pg/mL, respectively. IL-6 titers closely approximated a normal distribution, whereas the distribution of IL-10 was skewed to the right (Fig. 2). Controls mice that received an injection of PBS did not show any increase in IL-6 and IL-10 as the concentrations 3 h postinjection were all below the detection threshold. None of the PBS-injected mice died during the course of the experiment (Fig. 1).

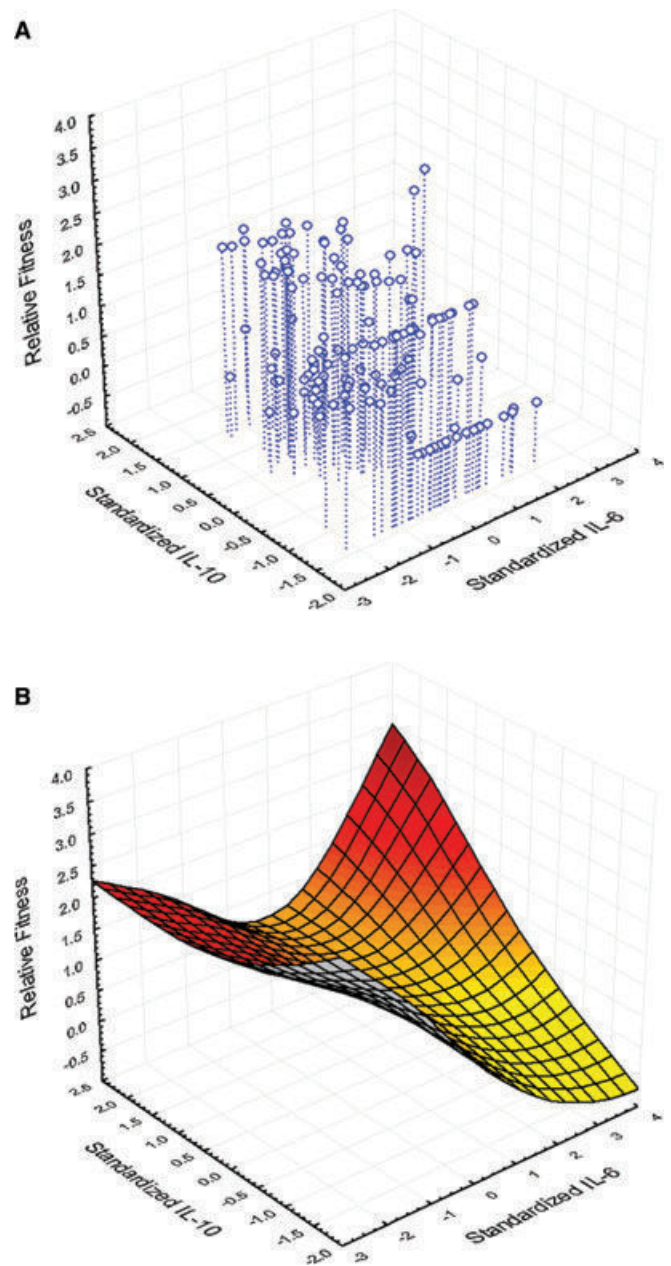
The analysis of selection gradients indicated that relative fitness was a negative linear function of IL-6 production ( $\beta \pm$  SE =  $-0.40 \pm 0.076$ ,  $P < 0.001$ , Table 1). Neither the linear nor the quadratic gradients for IL-10 reached statistical

**Table 1.** Generalized linear mixed model with a binomial distribution of errors exploring the association between survival after an LPS challenge and pro- (IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines (linear, squared, interaction terms), sex, body mass at the day of LPS challenge and the origin of the mice. Family identity was included as a random factor. The table reports the initial model as well as the simplified one after removal of the nonsignificant sex, body mass, and origin terms. The significance of the random factor was assessed using a likelihood ratio test. Sample size is 147 mice.

Source of variation	df	Wald Z	<i>P</i>
<b>Initial model</b>			
IL-6	1	-4.51	<0.001
IL-10	1	-1.09	0.276
Squared IL-6	1	-0.006	0.995
Squared IL-10	1	0.66	0.511
IL-6 × IL-10	1	2.17	0.030
Sex	1	0.77	0.441
Body mass	1	-0.62	0.536
Mice origin	1	-1.06	0.270
Random effect	df	$\chi^2$	<i>P</i>
Family	1	7.06	0.008
<b>Final model</b>			
IL-6	1	-4.43	<0.001
IL-10	1	0.73	0.466
Squared IL-6	1	-0.37	0.710
Squared IL-10	1	1.57	0.116
IL-6 × IL-10	1	2.06	0.039
Random effect	df	$\chi^2$	<i>P</i>
Family	1	7.20	0.007

significance (all *P*s > 0.1, Table 1). However, the correlational selection gradient was statistically significant, suggesting that selection operates on the combinations of the two traits ( $\gamma' \pm SE = 0.15 \pm 0.078$ , *P* = 0.039; Table 1). To visualize the correlational selection, we drew the cubic spline fitness surface for the two cytokines (Fig. 3).

LPS-injected mice lost body mass during the first days postinjection (mean variation in body mass  $\pm SE = -16.30\% \pm 2.5\%$ ) compared to PBS-individuals (mean  $\pm SE = -2.70\% \pm 0.48\%$ ). However, this effect was transitory since at the end of the experimental one-week period LPS-mice had almost recovered to their initial body mass (mean  $\pm SE = -3.86\% \pm 0.85\%$ ). This resulted in a highly significant interaction between treatment (LPS vs. PBS) and squared time postinjection (mixed model:  $t_{1,563} = -10.09$ ; *P* < 0.001). There was also a highly significant interindividual variation in body mass change (likelihood ratio test,  $\chi^2_1 = 520.91$ , *P* < 0.0001), whereas the family effect only approached significance (likelihood ratio test,  $\chi^2_1 = 2.95$ , *P* = 0.086).



**Figure 3.** Adaptive landscape for IL-6 and IL-10 produced in response to an LPS challenge in mice. (A) Raw data; (B) the fitness surface (cubic spline) illustrates the nonlinear, correlational selection acting on the two cytokines.

## Discussion

This study aimed at experimentally assessing the shape of the selection acting on immune traits involved in the promotion and resolution of inflammation. To this purpose, we measured both pro- (IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) effectors and investigated the fitness (survival) consequences of variable investment into the two functions in mice exposed to an inflammatory challenge.

Our experimental design was successful in eliciting an inflammatory response since values for both cytokines raised 3 h after the LPS challenge, whereas for control mice injected with PBS, cytokine levels remained low (below the detection threshold of the flow cytometer). Incidentally, it should be noted that baseline (preinjection) cytokine levels were virtually equal to zero, further indicating that mice did not suffer from any inflammatory disorder before the challenge. In addition to this, the majority of the mortality occurred within the first three days following the exposure, in agreement with the view that mortality was due to cytokine storms and septic shock (Remick et al. 2002; Xiao et al. 2006). Overall, these findings corroborate our assumption that mice exposed to LPS mounted an inflammatory response comparable to the one observed during a severe bacterial infection causing sepsis (Osuchowski et al. 2006).

LPS-injected mice lost body mass during the first days postinjection, whereas PBS controls did not show any time-related change in body mass. Body mass loss was, however, transitory since by the end of the one-week experimental period, LPS mice had almost recovered their initial body mass. Because this analysis was restricted to animals that were still alive at the end of the experiment, it cannot be due to selective mortality. Anorexia and weight loss are well-known symptoms induced by exposure to LPS and contribute to the definition of the so-called sickness behavior (Inui 2001).

Using the statistical framework put forward by Lande and Arnold (1983), we found that relative fitness was a negative linear function of the pro-inflammatory IL-6. Mice that produced high amount of IL-6 had a very poor survival prospect. This result confirms previous work conducted on humans and rodents showing that plasma IL-6 is a very good predictor of survival during sepsis (Casey et al. 1993; Remick et al. 2002; Osuchowski et al. 2006; Bozza et al. 2007). Interestingly, the linear selection gradient for IL-10 was not statistically significant, neither were the quadratic gradients for the two cytokines. These results suggest that selection does not operate on IL-10 independently of other traits and that intermediate levels of IL-6 and IL-10 are not associated with improved fitness (absence of stabilizing selection), under the specific conditions used for our experiment. On the contrary, we found evidence for a correlational selection gradient. The visual inspection of the adaptive landscape, based on a spline function, revealed first that maximum fitness was achieved for minimum values of IL-6 and IL-10. Second, when IL-10 production was low, any increase in IL-6 dramatically reduced fitness. A valley in the adaptive landscape was indeed reached for individuals with high IL-6 response and low IL-10 production. Third, the condition to achieve high fitness when overproducing IL-6 was to massively produce IL-10 as well. Therefore, under the specific conditions of our experimental design, our results suggest that

selection might operate as to optimize the combined response of pro- and anti-inflammatory effectors.

For the sake of simplicity, we used LPS as a proxy of bacterial infection. Of course, using replicating parasites would make the picture more complex, because a robust pro-inflammatory response could confer a benefit in terms of parasite clearance. In this case, maximum fitness would not be achieved for the lowest IL-6 level. Using live parasites might, however, also confound the pattern because in addition to the mortality due to a dysregulated inflammatory response, live pathogens might have induced some immune-independent mortality (due to a direct spoliation effect). Obviously, the next step would be to replicate the present study using live bacteria. It is also important to fully acknowledge that the use of LPS is not the only artificial aspect of our study. We used laboratory mice kept under controlled conditions and assessed fitness as the short-term survival following the LPS challenge. Future work should definitely extend this approach to natural populations of both short- and long-lived species, integrating both viability and reproductive fitness. As mentioned above, because we did not use live pathogens, we could not assess the benefits of the inflammatory response in terms of parasite clearance. Nevertheless, we believe that our study still fits into a cost-benefit framework, as we investigated the cost of the inflammatory response and the benefits of a proper immune regulation.

In spite of using laboratory mice under controlled environmental conditions, we found some interindividual variation in the response variables. SWISS mice are relatively outbred compared to other laboratory mouse strains and it is therefore possible that standing genetic variation contributes to explain some of this phenotypic variation. In addition to genetic sources, other environmentally based sources of variation can persist even though temperature, food quality, and availability were identical for all individuals. This is a general remark that applies to all studies involving congenic strains of mice where interindividual variation in phenotypic traits persists in spite of presumed low genetic variation. Incidentally, even though our experiment was not designed to explore the sources of phenotypic variation, we found that the response to the LPS injection had a highly significant family effect for survival and a marginally nonsignificant effect for changes in body mass. Because mice were produced by full-sibling family and shared the same maternal environment, we cannot identify the precise sources of this among-sibling resemblance.

Currently available evidence is in agreement with the results reported here and suggests that correlational selection probably acts on pro- and anti-inflammatory effectors, even though such evidence mostly comes from studies on humans. Previous work on human malaria already supported the idea that cytokine balance, and particularly the balance between IL-6 and IL-10 (Day et al. 1999), is important for resolving infections without severe pathology (Othoro et al. 1999; Angulo and Fresno 2002;

Dodoo et al. 2002; Artavanis-tsakonas et al. 2003). Other clinical studies also reported a link between high ratio of pro- and anti-inflammatory effectors and poor outcomes in patients with systemic inflammatory response syndrome (Taniguchi et al. 1999; Loisa et al. 2003). Recently, signs of selection acting on cytokine genes have been reported by Kuningas et al. (2009). They looked at the occurrence of *IL10* haplotypes across age classes in a population living in an agricultural area of the Upper-East region of Ghana. This area is endemic for several infectious diseases (including malaria, typhoid fever, and helminth infections), and therefore selection for parasite resistance is supposed to be strong. In agreement with this prediction, the authors found that *IL10* haplotypes associated with a high pro- to anti-inflammatory cytokine ratio were enriched among elderly, suggesting a positive selection for pro-inflammatory defenses in a context of serious infectious threat. Interestingly, however, people who had access to safe water sources had an opposite trend, with pro-inflammatory *IL10* haplotypes being less represented in old age classes. Overall, these lines of evidence are in agreement with the idea that selection acts in concert on pro- and anti-inflammatory effectors, with the environmental infectious risk having a major modulatory effect.

Correlational selection is supposed to be a widespread force acting on metric traits, even though it has been a difficult task to assess it in natural settings, the need of large sample size to have enough statistical power to detect interactive effects being probably one of the major constraints (Blows and Brooks 2003). Previous studies that have addressed the shape of selection acting on immunity have focused on single traits and have overlooked the complex interactions between up- and downregulatory effectors. Interestingly, the majority of these studies have reported significant positive directional selection on immune traits: antibody production (Råberg and Stjernman 2003), encapsulation rate (Rantala et al. 2011), phenoloxidase activity (Rolff and Siva-Jothy 2004), and *E. coli* bacterial killing capability (Wilcoxon et al. 2010). Evidence for stabilizing selection has been reported by a single study on blue tits (*Cyanistes caeruleus*) where individuals with intermediate primary antibody responsiveness to a diphtheria vaccine had the best survival prospect (Råberg and Stjernman 2003).

A particularly interesting result has been reported by Svensson et al. (2001) who measured antibody responsiveness in female side-blotched lizards (*Uta stansburiana*) immunized against the tetanus toxoid. They found that the shape of the selection on antibody production did depend on the phenotype of the female, with the immune response of yellow-throated females being positively and directionally selected, whereas the directional selection gradient for orange-throated was negative. Svensson et al. (2001) reported therefore significant correlational selection between color morphs and antibody responsiveness. Given that color morphs in this lizard species are associated with a wide range of behav-

ioral, physiological, and life-history traits (Sinervo et al. 2001), it is possible that this correlational selection also involves other immune traits.

Correlational selection should promote the evolution of linkage disequilibrium and epistatic interactions, finally favoring the emergence of genetic correlations between traits (Sinervo and Svensson 2002). Current evidence, indeed, suggests that epistatic interactions exist between *IL6*- and *IL10*-related single-nucleotide polymorphism on the incidence of inflammatory diseases (i.e., Alzheimer's disease) (Combarros et al. 2009). Correlational selection can thus be a powerful engine maintaining genetic variation at loci involved in immune regulation, and perhaps can contribute to explain some of the long-lasting unsolved questions in immunology, such as the evolution of the Th1/Th2-polarized cells.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Line Prezioso for managing the animal husbandry. We are also grateful to the associate Editor A. Read and two anonymous referees for their valuable comments and suggestions. This work has received financial support from the Région Bourgogne to AAB, BF, and GS and from the ANR (Program EVOREGIM) to BF and GS.

#### LITERATURE CITED

- Angulo, I., and M. Fresno. 2002. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:1145–1152.
- Annane, D., E. Bellissant, and J.-M. Cavaiillon. 2005. Septic shock. *Lancet* 365:63–78.
- Antonelli, M. 1999. Sepsis and septic shock: pro-inflammatory or anti-inflammatory state? *J. Chemother.* 11:536–540.
- Artavanis-tsakonas, K., J. E. Tongren, and E. M. Riley. 2003. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.* 133:145–152.
- Barsig, J., S. Küsters, K. Vogt, H.-D. Volk, G. Tieg, and A. Wendel. 1995. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur. J. Immunol.* 25:2888–2893.
- Barton, B. E. 1997. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 85:16–20.
- Belloni, V., B. Faivre, R. Guerreiro, E. Arnoux, J. Bellenger, and G. Sorci. 2010. Suppressing an anti-inflammatory cytokine reveals a strong age-dependent survival cost in mice. *PLoS One* 5:e12940.
- Blows, M. W., and R. Brooks. 2003. Measuring nonlinear selection. *Am. Nat.* 162:815–820.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., and J.-S. S. White. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 24:127–135.
- Bonneaud, C., J. Mazuc, G. Gonzalez, C. Haussy, O. Chastel, and G. Sorci. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* 161:367–379.
- Bozza, F. A., J. I. Salluh, A. M. Japiassu, M. Soares, E. F. Assis, R. N. Gomes, M. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2007. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care* 11:R49.
- Brodie, E. D., A. J. Moore, and F. J. Janzen. 1995. Visualizing and quantifying natural selection. *Trends Ecol. Evol.* 10:313–318.

- Casey, L. C., R. A. Balk, and R. C. Bone. 1993. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Intern. Med.* 119:771–778.
- Combarros, O., C. M. van Duijn, N. Hammond, O. Belbin, A. Arias-Vásquez, M. Cortina-Borja, M. G. Lehmann, Y. S. Aulchenko, M. Schuur, H. Kölsch, et al. 2009. Replication by the epistasis project of the interaction between the genes for IL-6 and IL-10 in the risk of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflamm.* 6:22–22.
- Couper, K. N., D. G. Blount, and E. M. Riley. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 180:5771–5777.
- Coussens, L. M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860–867.
- Crawley, M. J. 2007. *The R book*. Wiley-Interscience, West Sussex, England.
- Day, N. P. J., T. T. Hien, T. Schollaardt, P. P. Loc, L. V. Chuong, T. T. H. Chau, N. T. H. Mai, N. H. Phu, D. X. Sinh, N. J. White, et al. 1999. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J. Infect. Dis.* 180:1288–1297.
- Demas, G. E., D. A. Zysling, B. R. Beechler, M. P. Muehlenbein, and S. S. French. 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *J. Anim. Ecol.* 80:710–730.
- Dinarello, C. A. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112:321S–329S.
- Dodoo, D., F. M. Omer, J. Todd, B. D. Akanmori, K. A. Koram, and E. M. Riley. 2002. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 185:971–979.
- Eraud, C., O. Duriez, O. Chastel, and B. Faivre. 2005. The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Funct. Ecol.* 19:110–118.
- Graham, A. L., J. E. Allen, and A. F. Read. 2005. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:373–397.
- Inui, A. 2001. Cytokines and sickness behavior: implications from knockout animal models. *Trends Immunol.* 22:469–473.
- Kaufmann, S. H. E., A. Sher, and R. Ahmed. 2002. *Immunology of infectious diseases*. ASM Press, Washington, DC.
- Kingsolver, J. G., H. E. Hoekstra, J. M. Hoekstra, D. Berrigan, S. N. Vignieri, C. E. Hill, A. Hoang, P. Gibert, and P. Beerli. 2001. The strength of phenotypic selection in natural populations. *Am. Nat.* 157:245–261.
- Kuningas, M., L. May, R. Tamm, D. van Bodegom, A. H. J. van den Biggelaar, J. J. Meij, M. Frölich, J. B. Ziem, H. E. D. Suchiman, A. Metspalu, et al. 2009. Selection for genetic variation inducing pro-inflammatory responses under adverse environmental conditions in a Ghanaian population. *PLoS One* 4:e7795.
- Lande, R., and S. J. Arnold. 1983. The Measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37:1210–1226.
- Loisa, P., T. Rinne, S. Laine, M. Hurme, and S. Kaukinen. 2003. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 47:319–325.
- Marriott, I., and Y. M. Huet-Hudson. 2006. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol. Res.* 34:177–192.
- Martin, L. B., A. Scheuerlein, and M. Wikelski. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:153–158.
- Osuchowski, M. F., K. Welch, J. Siddiqui, and D. G. Remick. 2006. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J. Immunol.* 177:1967–1974.
- Othoro, C., A. A. Lal, B. Nahlen, D. Koech, A. S. S. Orago, and V. Udhayakumar. 1999. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J. Infect. Dis.* 179:279–282.
- Ouyang, W. J., S. Rutz, N. K. Crellin, P. A. Valdez, and S. G. Hymowitz. 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29:71–109.
- Palacios, M. G., D. W. Winkler, K. C. Klasing, D. Hasselquist, and C. M. Vleck. 2011. Consequences of immune system aging in nature: a study of immunosenescence costs in free-living Tree Swallows. *Ecology* 92:952–966.
- Prunet, C., T. Montagne, A. Vejux, A. Laubriet, J. F. Rohmer, J. M. Riedinger, A. Athias, S. Lemaire-Ewing, D. Neel, J. M. Petit, et al. 2006. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytom. Part A* 69A:359–373.
- Råberg, L., and M. Stjernman. 2003. Natural selection on immune responsiveness in blue tits *Parus caeruleus*. *Evolution* 57:1670–1678.
- Rantala, M. J., J. Honkavaara, D. W. Dunn, and J. Suhonen. 2011. Predation selects for increased immune function in male damselflies, *Calopteryx splendens*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 278:1231–1238.
- R Development Core Team. 2011. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Remick, D. G., G. R. Bolgos, J. Siddiqui, J. Shin, and J. A. Nemzek. 2002. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock* 17:463–467.
- Rolf, J., and M. T. Siva-Jothy. 2004. Selection on insect immunity in the wild. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271:2157–2160.
- Saito, H., E. R. Sherwood, T. K. Varma, and B. M. Evers. 2003. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech. Ageing Dev.* 124:1047–1058.
- Schmid-Hempel, P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:357–366.
- Schmid-Hempel, P., and D. Ebert. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends Ecol. Evol.* 18:27–32.
- Sell, S., and E. E. Max. 2001. *Immunology, immunopathology, and immunity*. ASM Press, Washington, DC.
- Sheldon, B. C., and S. Verhulst. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11:317–321.
- Sinervo, B., and E. Svensson. 2002. Correlational selection and the evolution of genomic architecture. *Heredity* 89:329–338.
- Sinervo, B., C. Bleay, and C. Adamopoulou. 2001. Social causes of correlational selection and the resolution of a heritable throat color polymorphism in a lizard. *Evolution* 55:2040–2052.
- Soler, J. J., de Neve, L. Pérez-Contreras, T. Soler, M. and Sorci, G. 2003. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:241–248.
- Sorci, G., and B. Faivre. 2009. Review. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 364:71–83.
- StatSoft. 1999. *STATISTICA for windows*. StatSoft, Tulsa, OK.
- Stinchcombe, J. R., A. F. Agrawal, P. A. Hohenlohe, S. J. Arnold, and M. W. Blows. 2008. Estimating nonlinear selection gradients using quadratic regression coefficients: double or nothing? *Evolution* 62:2435–2440.
- Svensson, E., B. Sinervo, and T. Comendant. 2001. Density-dependent competition and selection on immune function in genetic lizard morphs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12561–12565.
- Taniguchi, T., Y. Koido, J. Aiboshi, T. Yamashita, S. Suzaki, and A. Kurokawa. 1999. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* 27:1262–1264.

- Tateda, K., T. Matsumoto, S. Miyazaki, and K. Yamaguchi. 1996. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect. Immun.* 64:769–774.
- Velando, A., H. Drummond, and R. Torres. 2006. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond. B* 273:1443–1448.
- Viney, M. E., E. M. Riley, and K. L. Buchanan. 2005. Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol. Evol.* 20:665–669.
- Wilcoxon, T. E., R. K. Boughton, and S. J. Schoech. 2010. Selection on innate immunity and body condition in Florida scrub-jays throughout an epidemic. *Biol. Lett.* 6:552–554.
- Xiao, H., J. Siddiqui, and D. G. Remick. 2006. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect. Immun.* 74:5227–5235.
- Yende, S., G. D'Angelo, J. A. Kellum, L. Weissfeld, J. Fine, R. D. Welch, L. Kong, M. Carter, and D. C. Angus. 2008. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177:1242–1247.
- Zuk, M., and A. M. Stoehr. 2002. Immune defense and host life history. *Am. Nat.* 160(Suppl. 4):S9–S22.
- Zuur, A. F., E. N. Ieno, N. J. Walker, Saveliev, A. A., and Smith, G. M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R.* Springer, New York.

Associate Editor: A. Read

### *Supporting Information*

The following supporting information is available for this article:

**Figure S1.** Quantile–quantile plot with 95% pointwise confidence bounds.

Supporting Information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## **Chapitre VII**

### **Synthèse, conclusion et perspectives**

#### **1) Résumé et synthèse des principaux résultats**

Un des buts de l'écologie moderne est de préciser les bases physiologiques des traits d'histoire de vie (Ricklefs and Wikelski, 2002). Dans ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement attachés à explorer différents mécanismes susceptibles d'influencer la longévité et le vieillissement des populations et d'apporter des éléments de compréhension nouveaux dans une perspective évolutive.

Nous avons étudié l'importance de facteurs proximaux tels que le stress oxydant, notamment impliqué dans la réponse immunitaire innée chez les oiseaux et les mammifères de manière à pouvoir confronter nos résultats avec les théories évolutives du vieillissement (voir chapitre I « introduction générale »).

Ainsi, à l'aide d'une cohorte reconstituée, nous avons d'abord pu mettre en évidence un phénomène de sénescence reproductive chez des femelles mandarins âgées (voir chapitre III). En revanche, nous n'avons pas trouvé de preuve d'un investissement terminal comme prédit par certains modèles d'optimisation des traits d'histoire de vie (Williams, 1966). Selon ces modèles, en effet, l'investissement dans la reproduction augmente avec la diminution de la valeur reproductive résiduelle, au détriment de la survie et des fonctions de maintenance somatique. Or, notre expérience n'a pas mis en évidence de tels effets. Bien que les limites de l'approche transversale ne permettent pas de conclusions catégoriques, on peut tout de même noter que cela vient confirmer d'autres observations de l'absence d'un investissement terminal (ex. Weladji et al., 2010; Billing et al., 2007). De plus, récemment, d'autres travaux théoriques ont critiqué l'hypothèse d'investissement terminal en mettant l'accent sur les contraintes physiologiques croissantes avec l'âge (McNamara et al. 2009). Selon ces auteurs,



la prise en compte de la détérioration somatique des individus liée à leur histoire passée devraient conduire à des patrons de diminution de l'investissement dans la fonction reproductive, compatible avec les trajectoires déclinantes observées dans de nombreuses études.

Ces travaux sur cohorte reconstituée ont également permis de souligner l'importance des antioxydants comme ressources clés face aux coûts de la reproduction, particulièrement chez les individus âgés car nous avons vu que leur disponibilité pouvait contribuer à gommer en partie des effets de la sénescence reproductive, notamment les coûts reproductifs. Ces résultats sont discutables dans le cadre de la théorie du soma jetable (Kirkwood and Austad, 2000), puisque les antioxydants, en tant que ressources limitantes, ne peuvent être alloués simultanément à des fonctions coûteuses telles que la reproduction et la maintenance somatique face aux dommages du stress oxydatif (voir figure 4 ci-dessous).

Nous avons également mis en évidence des patrons de sénescence affectant la réponse immunitaire (voir chapitre VI) puisque la suppression de la capacité de régulation de la réponse inflammatoire a induit des conséquences critiques sur la survie des souris âgées comparés aux bien moindres coûts subis par les jeunes souris.

Grâce au suivi d'une cohorte longitudinale, nous avons constaté que l'activation de la réponse immunitaire en début de vie pouvait compromettre le développement et indirectement affecter la longévité des individus (chapitre IV). Ainsi, la surexpression précoce de l'inflammation dont dépend la résistance, et donc la survie à court terme face aux infections causées par les pathogènes de l'environnement semble pouvoir engendrer des coûts différés en impactant le développement et à plus long terme en réduisant indirectement la durée de vie. Ces résultats semblent compatibles avec l'hypothèse de pléiotropie antagoniste (Williams, 1957) qui postule que des traits avantageux tôt dans la vie vont être sélectionnés même si des coûts en termes de dégâts engendrés se répercutent plus tard dans la vie. La plupart des études sur la pléiotropie antagoniste s'étaient focalisées sur les effets à long terme des coûts liés à la reproduction (Péron et al., 2010; Charmantier et al., 2006), négligeant les traits impliqués dans la survie. Cette hypothèse transparait également à travers des travaux basés sur des études épidémiologiques de cohortes humaines (Finch et Crimmins 2004, Crimmins & Finch 2006). Ici, nous apportons des résultats expérimentaux qui ont tendance à soutenir ce principe en ce qui concerne l'inflammation.

Si l'activation précoce de l'inflammation peut avoir des conséquences négatives à long terme chez les oiseaux (voir ci-dessus), cette composante de l'immunité semble pourtant bien moins "autodestructrice" au sein de ce groupe que chez les mammifères par exemple. Une de nos

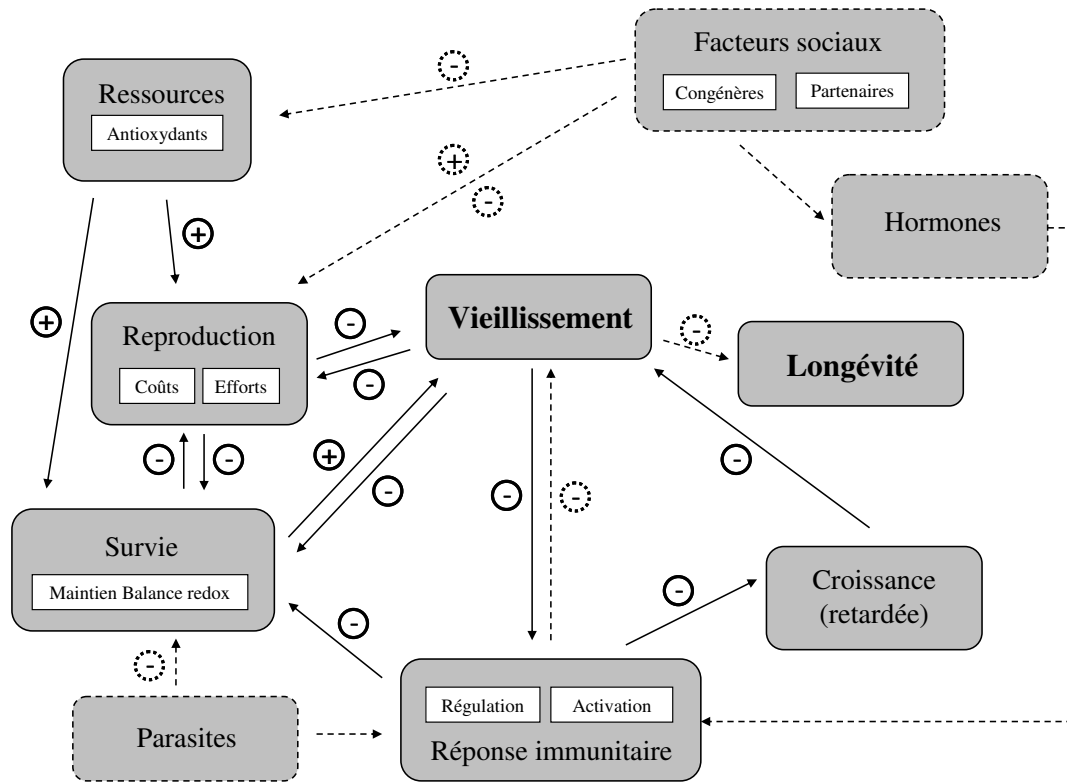
expériences montre très bien cette moindre sensibilité des oiseaux aux dégâts de l'inflammation et suggère des mécanismes mieux contrôlés (chapitre V). Au vu de l'implication de l'immunité dans le processus de sénescence, ceci explique peut être la moindre sensibilité apparente des oiseaux au vieillissement et leur remarquable longévité. Cependant, les mécanismes en jeu restent à préciser et sont une des perspectives à ces travaux (voir chapitre VII partie « perspectives » ci-dessous).

L'équilibre entre activation et régulation de la réponse semble une piste intéressante car, comme nous avons pu le constater, cet équilibre est déterminant pour la fitness des hôtes et par conséquent, donne prise à la sélection (chapitre VI). Il reste cependant à explorer la réponse à la sélection de ces traits et leur potentiel évolutif.

Dans leur ensemble, nos résultats expérimentaux soulignent l'importance des contraintes physiologiques sur divers traits d'histoire de vie des organismes comme les patrons de vieillissement, de longévité et de reproduction à diverses échelles (inter-individuelles mais aussi inter-espèces).

De plus, le stress oxydant apparaît comme un mécanisme fondamental impliqué à la fois dans des compromis entre fonctions reproductives et de maintenance somatique à travers l'importance de la disponibilité de ressources clés que sont les antioxydants, mais aussi à travers le rôle des dégâts engendrés par la réponse immunitaire sur divers aspects de la fitness des individus (survie, croissance, longévité).

Enfin, nous avons vu que les processus évolutifs pouvaient agir simultanément sur diverses composantes des mécanismes physiologiques dont la balance assurait l'homéostasie des organismes. C'est le cas de la balance redox ou de la balance entre réponse pro- et anti-inflammatoire. Il est donc important de prendre en compte simultanément ces diverses composantes pour comprendre sur quelles combinaisons de traits et dans quel espace de contraintes la sélection naturelle agit. L'émergence de cette vision antagoniste des processus à l'œuvre a l'avantage de nous questionner sur les dangers de la vision adaptationniste en biologie évolutive (Gould & Lewontin 1979) qui est longtemps resté focalisé sur l'optimisation des traits phénotypiques au détriment des contraintes inhérentes aux fonctions physiologiques des organismes.



**Figure 4.** Schéma de synthèse des différents facteurs liés au vieillissement abordés dans cette thèse (traits continus) ou présentant des perspectives possibles (traits discontinus). Cette représentation met en partie en évidence les liens multiples entre facteurs et les nombreux rétro-contrôles (majoritairement négatifs) existants.

- Dans le chapitre III, nous avons abordé les compromis entre reproduction et survie avec une dimension âge, mettant en évidence l'importance du vieillissement sur ces composantes.
- Dans le chapitre IV, nous avons mis en évidence les effets négatifs de l'activation de la réponse inflammatoire sur la croissance et les liens indirects à plus long terme sur la longévité.
- Dans le chapitre V, nous avons également abordé l'importance potentielle de la composante inflammatoire de la réponse immunitaire dans les patrons de longévité inter-spécifique. Les liens entre les différents mécanismes restent cependant à préciser (traits discontinus).
- Enfin, dans le chapitre VI, nous avons étudié plus particulièrement le rôle de la régulation immunitaire dans les changements associés à l'âge des fonctions immunitaires. De plus, nous avons mis en évidence le rôle crucial de la balance entre réponse pro- et anti-inflammatoire pour la fitness des hôtes en termes de survie et son rôle potentiel dans les processus évolutifs et les interactions avec les parasites (perspectives, traits discontinus).

## 2) Limites des approches de cette thèse

L'ensemble des travaux présentés dans le cadre de cette thèse ont été réalisés à l'aide d'une approche expérimentale dans des conditions de captivité. Cette méthodologie a le double avantage de permettre de contrôler de nombreuses variables confondantes. Par exemple, les conditions de captivité permettent de s'affranchir de causes majeures de mortalité extrinsèque comme la prédation ou certains parasites, facteurs confondants influençant la longévité, pour se concentrer sur les causes intrinsèques du vieillissement. Cependant, nous gardons à l'esprit que tous les facteurs confondants ne sont pas complètement contrôlables. A titre d'exemple, la prise alimentaire ou les interactions sociales ne sont pas prises en compte dans ce travail et pourraient faire l'objet de travaux spécifiques. De plus, nous restons prudents quant à la généralisation de nos résultats à des situations in natura puisque, par définition, nous opérons dans un cadre artificiel (ex. cycle nyctéméral fixe, nourriture ad libitum), loin des conditions rencontrées dans la nature. Ainsi, les conditions de captivité, beaucoup moins contraignantes que les conditions naturelles, peuvent gommer certains coûts. Un récent travail a par exemple montré que l'investissement dans la reproduction n'influait pas la longévité d'oiseaux et de mammifères vivants en captivité (Ricklefs & Cadena, 2007).

Concernant plus particulièrement l'étude des souches domestiques de diamants mandarins (*Taenopygia guttata*), nous devons évidemment être prudents quant à la généralisation de nos résultats à d'autres populations sauvages ou domestiques. Cependant, la bonne connaissance de sa biologie et la facilité à aborder son étude en captivité en font un bon modèle d'étude (Zann 1996). De plus, certaines études tendent tout de même à dédramatiser ces critiques, en offrant des résultats concordants entre populations domestiquées et populations sauvages (ex. Tschirren et al., 2009).

De même, l'étude des souches de souris de laboratoire (chapitres V et VI) reste exploratoire et demanderait des comparaisons avec des populations naturelles. En effet, dans le cadre de l'étude des défenses immunitaires, on peut s'attendre à ce que l'environnement parasitaire naturel, plus riche et plus complexe, soit susceptible de plus solliciter la réponse immunitaire. De surcroît, les ressources étant plus limitées, des compromis plus drastiques entre différentes fonctions devraient apparaître. Enfin, les souches de laboratoires, généralement issues de croisements consanguins, présentent un fond génétique réduit par rapport aux populations naturelles. Cependant, face à cette dernière remarque, nos résultats montrent tout de même qu'une sélection peut opérer un tri au sein d'une population présentant différentes

associations de traits immunitaires (pro- et anti-inflammatoires ; chapitre VI), suggérant qu'une certaine variabilité génétique subsiste. Cela demande cependant confirmation par des études de génétique quantitative. Certains travaux ont d'ailleurs d'ores et déjà comparé différents traits immunitaires chez des souris sauvages ou de laboratoire (ex. Abolins et al., 2011). Ces auteurs ont pu montrer que les souris sauvages présentaient des niveaux de réponse plus élevés et plus variables que les souches de laboratoire, présageant un rôle de l'environnement dans ces différences.

L'approche transversale adoptée dans le chapitre III, où des femelles mandarins de différents âges ont été rassemblées dans une cohorte reconstituée et comparées entre elles, bien que très commode pour aborder rapidement diverses questions, présente également des limites qui ont déjà été évoquées plus haut. En effet, les trajectoires des individus sont peu connues et des processus de sélection différentiels peuvent donner lieu à un tri non-aléatoire des phénotypes les plus âgés (van de Pol & Verhulst, 2006). Par conséquent, les patrons observés à l'échelle de la population peuvent être influencés entre autres par la présence d'individus âgés survivants de bonne qualité<sup>5</sup>, ce qui aura tendance à diminuer les phénomènes de sénescence, ou au contraire par la présence d'individus âgés de moins bonne qualité (moins bons reproducteurs mais plus longévifs), ce qui aura tendance à accentuer le phénomène de sénescence. L'approche longitudinale, où le suivi des trajectoires des individus d'une cohorte (chapitre IV) permet de mettre en évidence des patrons de sénescence « vrais », reste donc plus puissante. Cette dernière approche permet également de dépasser la simple étude de l'effet « âge » en donnant l'occasion d'étudier des patrons de changements âge-indépendants. Par exemple, dans une étude récente, Martin et Festa-Bianchet (2011) ont mis en évidence des patrons de sénescence reproductive indépendants de l'âge à la mort chez une espèce de mouflon (*Ovis Canadensis*). Ce genre d'analyses constitue une perspective intéressante aux travaux sur la cohorte de mandarins (voir partie « perspectives » ci-dessous).

Enfin, le faible nombre de traits physiologiques mesurés dans nos travaux constitue une autre limite à notre approche. En effet, mesurer un effecteur ou un marqueur d'inflammation en particulier ne permet pas d'avoir une idée d'une réponse complexe. Ceci est essentiellement lié à des raisons de coûts, mais également à des raisons pratiques, lorsque la quantité d'échantillons de plasma ne permet pas de multiplier les mesures ou lorsque les

---

<sup>5</sup> On entend par individus de bonne qualité, des individus en succès présentant une bonne aptitude, c'est-à-dire préférés dans les choix de partenaires, ayant une bonne condition, un taux élevé de succès reproducteur tout au cours de la vie (« life-time reproductive success »), etc. ; globalement présentant donc une meilleure fitness que les autres.

différentes cinétiques des effecteurs de la réponse immunitaire ne permettent pas leur mesure simultanée par exemple. Les techniques de mesures multiplexées utilisant la cytométrie en flux (voir chapitre II), en permettant de mesurer simultanément différents effecteurs, répondent donc en partie à ces difficultés mais restent confrontées au problème des diverses cinétiques de la réponse cytokinique.

Dans le cadre des comparaisons entre espèces, nous sommes également confrontés à ce problème de manque de diversité des marqueurs utilisés, car certains marqueurs inflammatoires peuvent se révéler opérants chez certaines espèces et beaucoup moins chez d'autres (Murata et al. 2004). Par exemple, les protéines C-réactives (CRP) sont des bons marqueurs d'inflammation chez l'Homme, et chez d'autres animaux comme les chiens, mais s'avère un marqueur mineur chez les souris. Ainsi, on pourrait de manière profitable mesurer des marqueurs généraux chez toutes les espèces, par exemple l'haptoglobine ou la glycoprotéine acide 1-alpha (AGP), et mesurer en parallèles des marqueurs plus spécifiques et peut-être plus performants chez les espèces concernées, par exemple l'ovotransferrine chez les oiseaux (Horrocks et al. 2011). Les différentes cinétiques de réponse inflammatoire entre espèces restent également une difficulté qui appelle des travaux complémentaires. Une approche plus complète consisterait en effet à répéter les mêmes expériences en se basant sur la dynamique temporelle de la réponse chez chaque espèce (nécessitant donc des expériences pilotes pour déterminer les pics de réponses suite aux challenges immunitaires).

### **3) Perspectives et pistes de recherches futures**

Ces travaux de thèse ouvrent sur de nouveaux questionnements et laissent entrevoir de nombreuses perspectives sur l'étude des patrons de vieillissement et les mécanismes physiologiques associés dans un contexte évolutif. En particulier, la prise en compte de mécanismes fins comme la régulation immunitaire dans l'étude de l'évolution des patrons de vieillissement et les patrons de longévité à l'échelle des populations d'oiseaux mais aussi à des échelles inter-taxonomiques (ex. oiseaux versus mammifères) reste une piste majeure mise en avant par nos travaux. De plus, l'étude de l'importance de ces mécanismes dans un contexte d'interaction hôtes-parasites n'en est qu'à ses débuts et constitue également une perspective intéressante. Enfin, l'étude rassemblée de ces éléments, à savoir les bases physiologiques, leur interaction avec les éléments de l'environnement (ex. parasites, congénères, partenaires) et les processus micro-évolutifs en jeu (ex. bases génétiques,

épigénétiques, réponse à la sélection) pourraient être au cœur d'une science évolutive vraiment intégrative.

### **3.1) Stress oxydant, inflammation et patrons de sénescence chez les oiseaux**

Concernant la sénescence reproductive, nous l'avons abordé uniquement à l'aide d'une approche transversale. Ceci pourrait être étudié de manière complémentaire avec une approche longitudinale grâce au suivi de la cohorte évoqué dans le chapitre IV où nous avons uniquement envisagé les conséquences sur la survie à long terme d'un fort niveau d'activation de l'inflammation à un stade très précoce, laissant de côté les conséquences sur la fonction reproductive. Ainsi, on peut s'attendre à ce que les individus qui ont subi un stress antigénique présentent un déclin reproductif plus prononcé que les individus du groupe contrôle. Le déclin reproductif pourrait être étudié en comparant deux occurrences reproductives. L'effet du sexe sur les performances reproductives en fonction du traitement pourra également être envisagé.

Un autre aspect de la sénescence chez les oiseaux qui pourrait s'avérer pertinent serait l'étude du vieillissement des fonctions cognitives, à l'aide d'expériences chez les mandarins (Healy et al. 2010). L'étude du vieillissement des capacités cognitives des oiseaux est un sujet encore peu développé. Le vieillissement cognitif pourrait résulter en l'altération des capacités de recherche alimentaire, d'orientation dans l'espace ou de perception du danger et pourrait facilement être abordé à l'aide de dispositifs expérimentaux relativement simples (Haggis 2010; Fisher et al., 2006).

D'autre part, les aspects hormonaux de la sénescence constituent une autre perspective et notamment dans l'étude des facteurs de stress à l'origine du vieillissement au même titre que le stress oxydant et les coûts immunitaires. Les interactions entre ces différents facteurs sont d'ailleurs multiples et encore peu étudiées expérimentalement.

Par ailleurs, nous avons jusqu'à maintenant considéré uniquement les effets liés à l'âge, mais il serait également intéressant d'étudier les changements indépendants de l'âge. Par exemple, certains changements physiologiques sont de bons prédicteurs de survie chez l'Homme, comme certains marqueurs d'inflammation tels que les protéines C-réactives (Crimmins & Finch, 2006). A l'aide des données de cohorte, il serait intéressant d'étudier les marqueurs physiologiques mesurés (dégâts oxydatifs, marqueur inflammatoire) avant la mort pour savoir s'ils sont également associés aux causes de mortalité chez les oiseaux.

Concernant plus particulièrement les bases évolutives des mécanismes en jeu, des travaux sont encore nécessaires pour comprendre et distinguer le déterminisme environnemental du déterminisme génétique de traits tels que la capacité antioxydante. Une première étude chez les Goélands pontiques (*Larus cachinnans*) a réussi, grâce à des adoptions croisées, a montré que la résistance au stress oxydatif était en effet héritable chez les poussins (Kim et al. 2010), résultat qui reste à confirmer ou infirmer chez d'autres espèces. Cela pourrait être effectué à l'aide d'expériences d'adoptions croisées comme dans l'étude sus citée, ou en obtenant des mesures d'adultes de deux générations de manière à effectuer des régressions parents-enfants. Cela permettrait de s'intéresser à la capacité antioxydante adulte plutôt que celle des jeunes qui est probablement encore soumise à des processus de maturation physiologique et donc le reflet potentiellement imparfait de la capacité adulte.

Concernant toujours le stress oxydant, l'étude des antioxydants comme ressources clés impliquées dans divers compromis d'allocations différentielles sensibles à l'âge est un sujet qui a été à peine effleuré dans cette thèse et du reste pas assez étudié ailleurs (Catoni et al. 2008). En particulier, l'allocation des antioxydants dans diverses fonctions pourrait être étudiée de manière plus poussée en utilisant des antioxydants marqués. L'utilisation d'isotopes stables de la vitamine A (Furr et al. 1989; Haskell et al. 1997) ou de la vitamine B12 marquée au Cobalt 58 (Cooper & Paranchych, 1961) sont des exemples de techniques qui pourraient être employées pour suivre le transfert dans différents compartiments comme la circulation sanguine, les organes et tissus (ex. le foie, le bec) ou le transfert dans les œufs et ainsi comprendre les « vrais » compromis dans différentes fonctions (ex. maintenance somatique versus reproduction).

Par ailleurs, le suivi longitudinal d'oiseaux soumis à un stress périnatal d'origine inflammatoire (chapitre V) a aussi consisté à mesurer régulièrement plusieurs traits physiologiques (défenses et capacité antioxydante, dégâts oxydatifs, marqueur inflammatoire) tout au long de leur vie. Cela donne l'occasion d'étudier la question de la répétabilité de tels traits au cours de la vie. En effet, tout comme on étudie la répétabilité de traits comportementaux, on peut se demander si les traits physiologiques mesurés sont des caractéristiques propres des individus indépendamment du fait qu'ils varient ou non au cours du temps (Matson et al. 2012) et quels sont les facteurs qui influencent éventuellement ces variations (ex. sénescence, inflamaging, etc.).



Enfin, à une échelle inter-spécifique, nous avons abordé dans le chapitre V, la question de la sensibilité des mammifères aux coûts immunitaires par rapport aux oiseaux. Cela semble une piste intéressante pour comprendre les différences de longévité et de patrons de sénescence marqués entre ces deux taxa. En particulier, la moindre capacité de régulation immunitaire des mammifères et/ou la meilleure capacité relative de régulation des oiseaux pourraient être en cause dans ces différences. Malheureusement, à l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure d'établir des quantifications *in vivo* des effecteurs anti-inflammatoires impliqués dans la régulation chez les oiseaux non modèles, mais l'étude de l'importance de ces mécanismes reste une perspective intéressante, pas seulement pour l'étude des patrons de vieillissement mais aussi dans le cadre des interactions avec les parasites comme nous le verrons dans la partie suivante.

### **3.2) Evolution de la régulation immunitaire et interactions hôtes-parasites**

Il est maintenant de plus en plus admis que les coûts immunitaires ne sont pas le seul fait de l'exploitation des ressources par les hôtes (ou par les parasites) au détriment d'autres fonctions vitales, mais bien plus encore de coûts en termes de dégâts cellulaires liés au métabolisme (« oxidative burst ») et à la réponse elle-même via la production de molécules réactives (ex. oxyde nitrique) (Graham et al., 2005; Sorci and Faivre, 2009). De plus en plus de travaux, dont la présente thèse, soulignent ainsi l'importance des coûts dits « immunopathologiques », notamment associés à l'âge et au vieillissement (voir chapitre VI). Cependant, dans l'absolu, ce n'est pas seulement l'intensité de la réponse qui dicte les coûts immunitaires, mais aussi la capacité à réguler la réponse de manière à circonscrire les dommages, comme nous l'avons vu dans les **articles 4 et 5**. La composante de régulation immunitaire, principalement en action dans les processus inflammatoires, a été, jusqu'à maintenant, largement négligée dans les travaux de biologie évolutive, malgré son rôle potentiel dans les interactions avec les parasites et dans la réponse à leurs pressions de sélection.

Ainsi, nous avons pu montrer que la sélection pouvait agir sur des combinaisons de traits dictant l'activation et la résolution de la réponse inflammatoire (**article 5**). Il reste cependant à étudier la réponse à la sélection et l'héritabilité de ces traits pour comprendre leur potentiel évolutif. Pour ce faire, des expériences de challenge sur plusieurs générations sont possibles afin d'étudier l'évolution des traits sous sélection.

En plus de comprendre les bases de la variabilité de la réponse des hôtes lors d'un challenge immunitaire, il serait intéressant d'intégrer les effets du parasite dans ses interactions avec l'hôte. En effet, la capacité de l'hôte à réguler sa réponse peut avoir des conséquences directes sur les caractéristiques du parasite et notamment sur l'évolution de sa virulence. Par exemple, une forte régulation de l'hôte entraînera une moindre pression immunitaire sur les parasites, ce qui pourra avoir pour conséquence une sélection pour des taux de multiplication plus élevés chez les parasites (voir par ex. Bichet et al. 2012). On peut donc imaginer intégrer l'étude des traits des parasites (ex. taux de multiplication) aux conséquences de l'expression de l'immunité pour la fitness de l'hôte. De même, on peut imaginer complexifier le système hôte-parasites en intégrant plusieurs parasites dont certains auraient la capacité d'interférer avec le système de régulation de la réponse immunitaire des hôtes, comme certaines espèces de nématodes (Maizels et al. 2004). Enfin, certaines études ont montré que les souris sauvages présentaient une réponse immunitaire exacerbée et plus variable que celle de souches de laboratoire (Abolins et al. 2011). Des répliques de nos travaux sur la forme de la sélection agissant sur les traits permettant l'activation et la régulation de la réponse avec des phénotypes sauvages permettraient de discuter plus largement du potentiel évolutif de ces traits dans des situations naturelles.

### **3.3) Vers une approche intégrative**

Enfin, en complément des travaux expérimentaux, une approche comparative permettrait d'étudier de manière intégrative les traits immunitaires en lien avec les traits d'histoire de vie et les hypothèses évolutives. Par exemple, on pourrait s'attendre à ce que les espèces insulaires soient moins soumises à une diversité parasitaire plus réduite que les espèces continentales, et donc potentiellement à une moindre pression. Par conséquent, on s'attend à ce que les espèces insulaires investissent moins dans les fonctions immunitaires au détriment d'autres traits liés à la fitness (ex. reproduction et/ou longévité) que les espèces continentales. De même que l'hypothèse de relâchement de la pression de prédation en milieu insulaire prédit l'évolution vers des longévités accrues (Wasser & Sherman 2010), le relâchement des pressions parasitaires pourrait ainsi s'accompagner d'une extension de longévité chez les espèces insulaires. Cette hypothèse pourrait faire l'objet d'une étude comparative mais demanderait également à être testée expérimentalement.

## Bibliographie

- Abolins, S.R., Pocock, M.J.O., Hafalla, J.C.R., Riley, E.M. & Viney, M.E. (2011). Measures of immune function of wild mice, *Mus musculus*. *Molecular Ecology*, 20, 881–892.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783–801.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., et al. (2006). An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution*, 60, 1913–1924.
- Ancet, P., Mazen, N.-J., Mourey, F. & Pfitzenmeyer, P. (2009). Vieillir dans la dignité.
- Angelier, F., Weimerskirch, H., Dano, S. & Chastel, O. (2006). Age, experience and reproductive performance in a long-lived bird: a hormonal perspective. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61, 611–621.
- Annane, D., Bellissant, E. & Cavaillon, J.-M. (2005). Septic shock. *Lancet*, 365, 63–78.
- Archer, S. (1993). Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB Journal*, 7, 349–360.
- Augustyniak, A., Ostrowska, J. & Skrzydlewska, E. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 55, 1495–1502.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547–581.
- Bertrand, S., Criscuolo, F., Faivre, B. & Sorci, G. (2006). Immune activation increases susceptibility to oxidative tissue damage in Zebra Finches. *Functional Ecology*, 20, 1022–1027.
- Best, A., Long, G., White, A. & Boots, M. (2012). The implications of immunopathology for parasite evolution. *Proceedings of the Royal Society B- Biological Sciences.*, 279, 3234–40.
- Bichet, C., Cornet, S., Larcombe, S. & Sorci, G. (2012). Experimental inhibition of nitric oxide increases *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) parasitaemia. *Experimental parasitology*. in press.
- Billing, A.M., Rosenqvist, G. & Berglund, A. (2007). No terminal investment in pipefish males: only young males exhibit risk-prone courtship behavior. *Behavioral Ecology*, 18, 535–540.
- Bischoff, K., Pichner, J., Braselton, W.E., Counard, C., Evers, D.C. & Edwards, W.C. (2002). Mercury and selenium concentrations in livers and eggs of common loons (*Gavia immer*) from Minnesota. *Environmental Monitoring and Assessment*, 42, 71–76.

- Bronikowski, A.M. & Promislow, D.E.L. (2005). Testing evolutionary theories of aging in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 271–273.
- Brunet-Rossinni, A. & Austad, S.N. (2006). Senescence in wild population of mammals and birds. In: *Handbook of the Biology of Aging*. Academic Press, Burlington, Massachusetts, pp. 243–266.
- Bryant, M.J. & Reznick, D. (2004). Comparative studies of senescence in natural populations of guppies. *The American naturalist*, 163, 55–68.
- Buffenstein, R. (2009). Exploiting Natural Variation in Life Span to Evaluate Mechanisms of Aging. In: *Life-span extension: single-cell organisms to man* (eds. Sell, C., Lorenzini, A. & Brown-Borg, H.). Humana Press, New York, USA, pp. 133–139.
- Bulet, P., Stöcklin, R. & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 169–184.
- Burley, N. (1985). Leg-band Color and Mortality Patterns in Captive Breeding Populations of Zebra Finches. *Auk*, 102, 647–651.
- Catoni, C., Peters, A. & Schaefer, H.M. (2008). Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Animal Behaviour*, 76, 1107–1119.
- Charcot, J.-M. (1868). *Leçons sur les maladies des vieillards et les maladies chroniques*. Adrien Delahaye, Paris.
- Charlesworth, B. (1994). *Evolution in age-structured populations*. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Charmantier, A., Perrins, C., McCleery, R.H. & Sheldon, B.C. (2006). Quantitative genetics of age at reproduction in wild swans: support for antagonistic pleiotropy models of senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 6587–92.
- Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., et al. (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing research reviews*, 8, 18–30.
- Clutton-Brock, T. & Sheldon, B.C. (2010). Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 562–573.
- Clutton-Brock, T.H. (1984). Reproductive Effort and Terminal Investment in Iteroparous Animals. *The American Naturalist*, 123, 212–229.
- Cohen, A., Klasing, K. & Ricklefs, R. (2007). Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 147, 110–121.

- Cohen, A.A., McGraw, K.J., Wiersma, P., Williams, J.B., Robinson, W.D., Robinson, T.R., et al. (2008). Interspecific associations between circulating antioxidant levels and life-history variation in birds. *American Naturalist*, 172, 178–193.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., et al. (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325, 201–204.
- Comfort, A. (1979). *The biology of senescence*. Churchill Livingstone, London.
- Cooper, B.A. & Paranchych, W. (1961). Selective Uptake of Specifically Bound Cobalt-58 Vitamin B12 by Human and Mouse Tumour Cells. *Nature*, 191, 393–395.
- Cooper, M.D. & Alder, M.N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124, 815–22.
- Costantini, D. (2008). Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters*, 11, 1238–1251.
- Costantini, D., Monaghan, P. & Metcalfe, N.B. (2012). Early life experience primes resistance to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 215, 2820–2826.
- Costantini, D., Rowe, M., Butler, M.W. & McGraw, K.J. (2010). From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology. *Functional Ecology*, 24, 950–959.
- Cote, J., Arnoux, E., Sorci, G., Gaillard, M. & Faivre, B. (2010). Age-dependent allocation of carotenoids to coloration versus antioxidant defences. *Journal of Experimental Biology*, 213, 271–277.
- Crimmins, E.M. & Finch, C.E. (2006). Infection, inflammation, height, and longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 498–503.
- Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso, M. del M., Bouillaud, F., Ricquier, D., Miroux, B. & Sorci, G. (2005). Mitochondrial uncoupling proteins: new perspectives for evolutionary ecologists. *The American naturalist*, 166, 686–99.
- Criscuolo, F., Monaghan, P., Nasir, L. & Metcalfe, N.B. (2008). Early nutrition and phenotypic development: “catch-up” growth leads to elevated metabolic rate in adulthood. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 275, 1565–1570.
- Darwin, C.R. (1859). *The origin of species on the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, 1102–1115.

- Dobryszczyka, W. (1997). Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 35, 647–654.
- Eraud, C. (2007). *Ecologie des défenses immunitaires : coût et limitation chez l'oiseau*. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.
- Fagoonee, S., Gburek, J., Hirsch, E., Marro, S., Moestrup, S.K., Laurberg, J.M., et al. (2005). Plasma Protein Haptoglobin Modulates Renal Iron Loading. *American Journal of Pathology*, 166, 973–983.
- Faivre, B. (1992). *Coexistence et écologie des deux espèces jumelles d'Hippolais*. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews. Microbiology*, 2, 820–32.
- Finch, C.E. & Crimmins, E.M. (2004). Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science*, 305, 1736–1739.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247.
- Fisher, M.O., Nager, R.G. & Monaghan, P. (2006). Compensatory growth impairs adult cognitive performance. *PLoS Biology*, 4, e251.
- Fisher, R. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A. & Harrison, D.E. (2001). Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6736–41.
- Forslund, P. & Pärt, T. (1995). Age and reproduction in birds - hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 374–378.
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., et al. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254.
- Fukagawa, N.K. (1999). Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine New York NY*, 222, 293–298.
- Furr, H.C., Amedee-Manesme, O., Clifford, A.J., Bergen, H.R., Jones, A.D., Anderson, D.P., et al. (1989). Vitamin A concentrations in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans. *The American journal of clinical nutrition*, 49, 713–6.

- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. & Fenn, W.O. (1954). Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science*, 119, 623–626.
- Gompertz, B. (1820). A Sketch of an Analysis and Notation Applicable to the Estimation of the Value of Life Contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 110, 214–294.
- Gompertz, B. (1825). On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 115, 513–583.
- Gompertz, B. (1862). A Supplement to Two Papers Published in the Transactions of the Royal Society, “On the Science Connected with Human Mortality;” The One Published in 1820, and the Other in 1825. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 152, 511–559.
- Gould, S.J. & Lewontin, R.C. (1979). The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A Critique of the Adaptationist Programme. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 205, 581–598.
- Grady, C.L. & Craik, F.I. (2000). Changes in memory processing with age. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 224–231.
- Graham, A.L., Allen, J.E. & Read, A.F. (2005). Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 373–397.
- Graham, A.L., Shuker, D.M., Pollitt, L.C., Auld, S.K.J.R., Wilson, A.J. & Little, T.J. (2010). Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Functional Ecology*, 25, 5–17.
- Griffith, S.C. & Buchanan, K.L. (2010). The Zebra Finch: the ultimate Australian supermodel. *Emu*, 110, V–xii.
- Grotewiel, M.S., Martin, I., Bhandari, P. & Cook-Wiens, E. (2005). Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Research Reviews*, 4, 372–397.
- Grégoire, A. (2003). Démographie et différenciation chez le Merle noir *Turdus merula* : liens avec l'habitat et les relations hôtes-parasites. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.
- Guarente, L. & Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, 408, 255–262.
- Gutteridge, J.M. (1987). The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 917, 219–223.
- Haggis, O. (2010). Effects of sex steroids on spatial cognition in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). PhD, University of Edinburgh.
- Haldane, J.B.S. (1941). *New paths in genetics*. Allen & Unwin, London.

- Hamilton, W.D. (1966). The moulding of senescence by natural selection. *Journal of Theoretical Biology*, 12, 12–45.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*, 11, 298–300.
- Harman, D. (1981). The Aging Process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 7124–7128.
- Harman, D. (1996). Aging and disease: extending functional life span. *Experimental Gerontology*, 78, 321–336.
- Hartley, R.C. & Kennedy, M.W. (2004). Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 353–354.
- Haskell, M.J., Handelman, G.J., Peerson, J.M., Jones, A.D., Rabbi, M.A., Awal, M.A., et al. (1997). Assessment of vitamin A status by the deuterated-retinol-dilution technique and comparison with hepatic vitamin A concentration in Bangladeshi surgical patients. *The American journal of clinical nutrition*, 66, 67–74.
- Hasty, P., Campisi, J., Hoeijmakers, J., van Steeg, H. & Vijg, J. (2003). Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science*, 299, 1355–9.
- Hausmann, M.F., Winkler, D.W., O'Reilly, K.M., Huntington, C.E., Nisbet, I.C.T. & Vleck, C.M. (2003). Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proceedings of The Royal Society B-Biological sciences*, 270, 1387–92.
- Hayflick, L. (1998). How and why we age. *Experimental Gerontology*, 33, 639–653.
- Healy, S.D., Haggis, O. & Clayton, N.S. (2010). Zebra Finches and cognition. *Emu*, 110, 242.
- Holmes, D. & Martin, K. (2009). A bird's-eye view of aging: what's in it for ornithologists? *Auk*, 126, 1–23.
- Horn, T., Robertson, B.C. & Gemmill, N.J. (2010). The use of telomere length in ecology and evolutionary biology. *Heredity*, 105, 497–506.
- Horrocks, N.P.C., Irene Tieleman, B. & Matson, K.D. (2011). A simple assay for measurement of ovotransferrin - a marker of inflammation and infection in birds. *Methods in Ecology and Evolution*, 2, no–no.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R. & Buttemer, W.A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews*, 87, 1175–1213.
- Huntoon, K.M., Wang, Y., Eppolito, C.A., Barbour, K.W., Berger, F.G., Shrikant, P.A., et al. (2008). The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 84, 170–181.



- Janeway, C.A. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197–216.
- Jazwinski, S.M. (1996). Longevity, genes, and aging. *Science*, 273, 54–59.
- Jesch, N. (1998). Formation of nitric oxide by rat and hamster alveolar macrophages: an interstrain and interspecies comparison. *Toxicology Letters*, 96-97, 47–51.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–9.
- Kim, S.Y., Noguera, J.C., Morales, J. & Velando, A. (2010). Heritability of resistance to oxidative stress in early life. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 769–775.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624–626.
- Kirkwood, T.B. & Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408, 233–238.
- Kirkwood, T.B. & Holliday, R. (1979). The evolution of ageing and longevity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 205, 531–546.
- Kovács, T. (2004). Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. *Ageing Research Reviews*, 3, 215–232.
- Lavoie, E.T. (2005). Avian immunosenescence. *Age*, 27, 281–285.
- Lizard, G. (2003). Cytométrie en flux, nanobilles et microbilles : vers l'émergence de techniques multiplexées prometteuses pour l'établissement de profils moléculaires à partir de petits échantillons. *Pathologie Biologie*, 51, 416–417.
- Long, G.H., Chan, B.H.K., Allen, J.E., Read, A.F. & Graham, A.L. (2008). Experimental manipulation of immune-mediated disease and its fitness costs for rodent malaria parasites. *BMC Evolutionary Biology*, 8.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S. & Barja, G. (1993). Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and basal and maximum aerobic capacity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 70, 177–199.
- De Magalhaes, J.P. & Costa, J. (2009). A database of vertebrate longevity records and their relation to other life-history traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1770–1774.
- Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D. & Allen, J.E. (2004). Helminth parasites--masters of regulation. *Immunological reviews*, 201, 89–116.
- Malaguarnera, L., Ferlito, L., Imbesi, R.M., Gulizia, G.S., Di Mauro, S., Maugeri, D., et al. (2001). Immunosenescence: a review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 32, 1–14.

- Martin, J.G.A. & Festa-Bianchet, M. (2011). Age-independent and age-dependent decreases in reproduction of females. *Ecology Letters*, 14, 576–581.
- Matson, K.D., Horrocks, N.P.C., Versteegh, M.A. & Tieleman, B.I. (2012). Baseline haptoglobin concentrations are repeatable and predictive of certain aspects of a subsequent experimentally-induced inflammatory response. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 162, 7–15.
- Maynard Smith, J. (1982). *Evolution and the Theory of Games*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maynard-Smith, J. (1978). Optimization Theory in Evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 9, 31–56.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049–6055.
- McGraw, K.J., Cohen, A.A., Costantini, D. & H?rak, P. (2010). The ecological significance of antioxidants and oxidative stress: a marriage between mechanistic and functional perspectives. *Functional Ecology*, 24, 947–949.
- McNamara, J.M., Houston, A.I., Barta, Z., Scheuerlein, A. & Fromhage, L. (2009). Deterioration, death and the evolution of reproductive restraint in late life. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 276, 4061–4066.
- Medawar, P.B. (1952). *An unsolved problem of biology*. H.K. Lewis & Co., London.
- Medvedev, Z.A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews*, 65, 375–398.
- Metcalf, N.B. & Monaghan, P. (2003). Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology*, 38, 935–940.
- Millet, S., Bennett, J., Lee, K.A., Hau, M. & Klasing, K.C. (2007). Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Developmental and comparative immunology*, 31, 188–201.
- Moller, A.P. & De Lope, F. (1999). Senescence in a short-lived migratory bird: age-dependent morphology, migration, reproduction and parasitism. *Journal of Animal Ecology*, 68, 163–171.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D.H. & Ricklefs, R.E. (2008). The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology*, 22, 371–378.
- Monaghan, P., Heidinger, B.J., D’Alba, L., Evans, N.P. & Spencer, K.A. (2012). For better or worse: reduced adult lifespan following early-life stress is transmitted to breeding partners. *Proceedings of the Royal Society B-Biological sciences*, 279, 709–14.

- Monaghan, P., Metcalfe, N.B. & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12, 75–92.
- Montgomery, M.K., Hulbert, A.J. & Buttemer, W.A. (2011). The long life of birds: the rat-pigeon comparison revisited. *PLoS ONE*, 6, e24138.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A. & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 477–503.
- Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168, 28–40.
- Nisbet, I.C. (2001). Detecting and measuring senescence in wild birds: experience with long-lived seabirds. *Experimental Gerontology*, 36, 833–843.
- Nolan, J.P. & Mandy, F. (2006). Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69, 318–25.
- Nussey, D.H., Coulson, T., Festa-Bianchet, M. & Gaillard, J.M. (2008). Measuring senescence in wild animal populations: towards a longitudinal approach. *Functional Ecology*, 22, 393–406.
- Nussey, D.H., Kruuk, L.E.B., Donald, A., Fowlie, M. & Clutton-Brock, T.H. (2006). The rate of senescence in maternal performance increases with early-life fecundity in red deer. *Ecology Letters*, 9, 1342–1350.
- Oeppen, J. & Vaupel, J.W. (2002). Demography. Broken limits to life expectancy. *Science*, 296, 1029–31.
- Paganelli, R., Quinti, I., Fagiolo, U., Cossarizza, A., Ortolani, C., Guerra, E., et al. (1992). Changes in circulating b-cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clinical and experimental immunology*, 90, 351–354.
- Partridge, L. (2001). Evolutionary theories of ageing applied to long-lived organisms. *Experimental Gerontology*, 36, 641–650.
- Pearl, R. (1928). *The rate of living*. Knopf, New York.
- Philip, A.P.W. (1834). On the Nature of Death. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 124, 167–198.
- Pianka, E.R. & Parker, W.S. (1975). Age-specific reproductive tactics. *The American Naturalist*, 109, 453–464.
- van de Pol, M. & Verhulst, S. (2006). Age-dependent traits: a new statistical model to separate within- and between-individual effects. *The American naturalist*, 167, 766–73.

- Poubelle, P., Chaintreuil, J., Bensadoun, J., Blotman, F., Simon, L. & Crastes De Paulet, A. (1982). Plasma lipoperoxides and aging. Critical assessment of the thiobarbituric acid method for the measurement of lipoperoxides and malondialdehyde. *Biomedicine pharmacotherapy*, 36, 164–166.
- Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Laubriet, A., Rohmer, J.F., Riedinger, J.M., et al. (2006). Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry Part A*, 69A, 359–373.
- Péron, G., Gimenez, O., Charmantier, A., Gaillard, J.-M. & Crochet, P.-A. (2010). Age at the onset of senescence in birds and mammals is predicted by early-life performance. *Proceedings of the Royal Society B-Biological sciences*, 277, 2849–56.
- Ribera-Casado, J.M. (1999). Ageing and the cardiovascular system. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie Organ der Deutschen Gesellschaft für Gerontologie und Geriatrie*, 32, 412–419.
- Ricklefs, R.E. & Cadena, C.D. (2007). Lifespan is unrelated to investment in reproduction in populations of mammals and birds in captivity. *Ecology Letters*, 10, 867–872.
- Ricklefs, R.E. & Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 462–468.
- Ronce, O., Clobert, J. & Massot, M. (1998). Natal dispersal and senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 600–605.
- Rose, M.R. (1991). *Evolutionary biology of aging*. Oxford University Press, New York.
- Savinov, V.M., Gabrielsen, G.W. & Savinova, T.N. (2003). Cadmium, zinc, copper, arsenic, selenium and mercury in seabirds from the Barents Sea: levels, inter-specific and geographical differences. *Science of the Total Environment*, 306, 133–158.
- Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y. & Siva-Jothy, M.T. (2009). Introduction. *Ecological immunology*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364, 3–14.
- Sell, S. & Max, E.E. (2001). *Immunology, immunopathology, and immunity*. ASM Press, Washington D.C.
- Sheldon, B.C. & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 317–321.
- Sild, E. & Horak, P. (2009). Nitric oxide production: an easily measurable condition index for vertebrates. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 959–966.
- Sorci, G. & Faivre, B. (2009). Review. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host–parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 71–83.

- Stearns, S.C. (1992). The evolution of life histories. In: *The Evolution of Life Histories*. Chapman and Hall, New York.
- Surai, P.F. (2002). *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Thomas, F., Lefèvre, T. & Raymond, M. (2010). *Biologie évolutive*. De Boeck Université, Paris.
- Tinbergen, N. (1963). On aims and methods of ethology. *Zeitschrift Für Tierpsychologie*, 20, 410–433.
- Torres, R. & Velando, A. (2007). Male reproductive senescence: the price of immune-induced oxidative damage on sexual attractiveness in the blue-footed booby. *Journal of Animal Ecology*, 76, 1161–1168.
- Tschirren, B., Rutstein, A.N., Postma, E., Mariette, M. & Griffith, S.C. (2009). Short- and long-term consequences of early developmental conditions: a case study on wild and domesticated zebra finches. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 387–395.
- Wasser, D.E. & Sherman, P.W. (2010). Avian longevities and their interpretation under evolutionary theories of senescence. *Journal of Zoology*, 280, 103–155.
- Weismann, F.L.A. (1893). *Germ-Plasm, a theory of Heredity*. Charles Scribner's sons, New York.
- Weladji, R.B., Holand, Ø., Gaillard, J.-M., Yoccoz, N.G., Mysterud, A., Nieminen, M., et al. (2010). Age-specific changes in different components of reproductive output in female reindeer: terminal allocation or senescence? *Oecologia*, 162, 261–271.
- Westendorp, R.G. & Kirkwood, T.B. (1998). Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature*, 396, 743–6.
- Williams, G.C. (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution*, 11, 398–411.
- Williams, G.C. (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Zann, R.A. (1996). *The zebra finch: a synthesis of field and laboratory studies*. Oxford University Press, New York.

## Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail de thèse. Merci au Professeur Alberto Velando (Universidad de Vigo, España), au docteur François Criscuolo (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg) et au docteur Vincent Staszewski (Laboratoires Merial, Lyon). Merci au docteur Gabriele Sorci (Biogéosciences, Université de Bourgogne) d'avoir accepté de présider ce jury.

Ma reconnaissance va en second lieu à mon directeur de thèse, Bruno Faivre, pour avoir encadré ce travail aussi humainement que possible du début à la fin.

Merci aux directeurs de l'Ecole doctorale Environnements Santé, Alain Pugin et Thierry Rigaud pour l'ensemble de leur travail.

Je voudrais également remercier Pascal Neige, directeur de l'UMR BioGéoSciences, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire, et tous les autres membres avec qui j'ai pu interagir ces dernières années, en particulier les autres membres de l'axe « traits d'histoire de vie » au sein duquel j'ai réalisé mon travail : Emilie Arnoux, Juliette Bailly, Coraline Bichet, Elise Cellier-Holzem et Stéphane Garnier ; les post-doctorants de l'équipe, ces oiseaux de passage, pour leurs contributions directes ou indirectes à cette thèse : Julien Cote, Steve Larcombe, Brian Preston, Adriana Valarino et en particulier Virginia Belloni et Anne Besson ; ce travail leur doit beaucoup.

Je tiens à remercier d'autre part, ceux qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse, à savoir les personnels administratifs, pour leur patience et leur dévouement : Annie Marchand, Cindy Pers en son temps et Isabelle Santacroce pour le secrétariat de l'UMR ; Josette Thery et Corinne Aquilina de l'école doctorale Environnements Santé ; Agnès Pinte et les autres membres du secrétariat de l'UFR. Je remercie également les personnels des services techniques de l'Université de Bourgogne et particulièrement Jean-Marc Yons, qui permettent aux structures de fonctionner, et pour les nombreux dépannages sur le site délocalisé de Bretenières où nous maintenons nos oiseaux.

Parce que la base de notre travail repose d'abord sur la gestion sérieuse et durable des animaleries, je voudrais remercier Line Prezioso pour son travail de maintien et d'élevage des animaux.

Un grand merci également à nos collègues physiologistes et immunologues des laboratoires INSERM U-866 et de l'Université de Bourgogne pour leur aide précieuse dans nos collaborations. Merci spécialement à Jérôme Bellenger, Kévin Ragot, Thomas Nury et Gérard Lizard pour les discussions théoriques et la mise en pratique.

Je tiens à saluer également la joyeuse bande de l'Expérimentarium, notamment Lionel Maillot, Candice Chailloux en son temps, Elise, mais aussi Cyril, Marion et Ronan pour leur soutien, leur bonne humeur et l'ensemble de leur œuvre. J'espère qu'un jour l'Université de Bourgogne et ses chercheurs prendront pleinement la mesure de votre mission et l'ampleur de votre travail dédié au partage des connaissances et à la diffusion de la culture scientifique.

Merci aux organisateurs toulousains du Petit Pois Dérivé 2011 pour avoir égaillé ma bibliothèque et mes papilles. Une dédicace spéciale à Benoit Pujol et Pierre-Jean Malé pour leur accueil.

Je ne peux pas refermer ces remerciements de thèse sans évoquer la Plume! et ses nombreux membres dispersés aux quatre vents mais rassemblés sous la même ferveur plumesque : Arthur, Carol Ann, François, Vincent, Violette, l'antenne toulousaine (dont PiJi, Juliane, Victor), l'antenne dijonnaise (particulièrement Julie et Jean-So) ; une mention spéciale pour Aimeric, pour son soutien sans faille. Mes amis, nous avons encore de belles pages à écrire ensemble.

Enfin, je tiens à remercier le dernier cercle, ma famille, et particulièrement mes parents et mes frères pour leur soutien moral et financier tout au long de mes longues études, et notamment pendant ces dernières années de thèse. Je mesure la chance que j'ai d'être si bien entouré.

Une mention toute particulière à Anna M. Eglantine qui a été le point de repère de toute cette thèse, pour son soutien et bien plus encore.

Et sans oublier les innombrables personnes qui ont contribué à mon parcours, dont la seule énumération ne suffirait pas à exprimer toute ma gratitude.

**Sénescence et longévité : des mécanismes physiologiques aux processus évolutifs.  
Etudes chez les oiseaux et les mammifères.**

**Résumé :** Il existe dans le règne animal une diversité incroyable de durées de vie allant de quelques jours pour les petits vers gastrotriches à plusieurs centaines d'années pour certains bivalves ou tortues terrestres. Cette étonnante diversité a depuis longtemps questionné les chercheurs en biologie. L'intérêt croissant pour le phénomène de vieillissement, notamment dû à l'augmentation de l'espérance de vie chez l'Homme, a conduit les chercheurs à essayer de comprendre les processus qui déterminent les patrons de longévité et de vieillissement. D'une part, les études biomédicales et biogérontologiques ont contribué à décrire nombres de mécanismes physiologiques et cellulaires à l'origine du vieillissement. Parmi ces mécanismes, le stress oxydant a été identifié comme jouant un rôle majeur, à travers l'accumulation au cours de la vie des dégâts générés par la production de radicaux libres lors d'activités métaboliques aérobies. D'autre part, le développement de théories évolutives du vieillissement a contribué à comprendre l'origine ultime du vieillissement et l'évolution de la diversité des traits d'histoire de vie. Cependant, ces approches, bien que complémentaires, sont longtemps restées imperméables et les travaux intégrant les mécanismes physiologiques tels que le stress oxydant dans une perspective évolutive n'ont connu que de récents développements. Dans cette thèse, nous avons étudié comment des mécanismes tels que le stress oxydant et ses coûts associés lors d'évènements comme la reproduction ou la réponse immunitaire pouvaient jouer un rôle dans l'évolution des patrons de vieillissement chez les oiseaux et les mammifères (i) en étudiant le rôle des antioxydants comme ressources clés dans les compromis adaptatifs entre reproduction et survie en fonction de l'âge, (ii) en étudiant les conséquences à long terme de l'environnement périnatal, (iii) en étudiant le lien entre réponse inflammatoire et patrons de vieillissement et de longévité contrastée entre oiseaux et mammifères, (iv) en s'intéressant plus particulièrement aux mécanismes de régulation immunitaire, soulignant leur rôle crucial pour la fitness des hôtes, et notamment tard dans la vie. Nos résultats soulignent l'importance des contraintes physiologiques liées à la limitation en ressources clés (antioxydants) ou aux dégâts engendrés lors d'activités coûteuses et destructrices et sur les patrons de vieillissements à l'échelle intra et inter-spécifique.

**Mots clés :** vieillissement, sénescence, longévité, stress oxydant, antioxydants, compromis d'allocation, traits d'histoire de vie, inflammation, immunité, immunopathologie, immuno-écologie, diamant mandarin, souris, médecine darwinienne.

---

**Senescence and longevity: from physiological mechanisms to evolutionary processes.  
Studies in birds and mammals.**

**Summary** There is an incredible diversity of lifespan in the animal kingdom ranging from a few days for small gastrotrichs worms to several hundred of years for some bivalves or tortoises. This amazing diversity has long questioned biology researchers. The growing interest in the phenomenon of aging, mainly due to the increase in life expectancy in humans, has questioned researchers on processes that determine patterns of longevity and ageing. On the one hand, biomedical and biogerontological studies helped describe numerous cellular and physiological mechanisms related to aging. Among these mechanisms, oxidative stress has been identified as playing a major role, through life-time accumulation of damage generated by production of metabolic free radicals. On the other hand, the development of evolutionary theories of aging has contributed to understanding ultimate origins of ageing and of the diversity of life history traits. However, these approaches, although complementary, have long remained separated and works that integrate physiological mechanisms such as oxidative stress in an evolutionary perspective have known only recent developments. In this thesis, we studied how mechanisms such as oxidative stress and its associated costs produced during reproduction or immune response could play a role in the evolution of patterns of ageing in birds and mammals by (i) studying the role of antioxidants as key resources involved in adaptive trade-offs between reproduction and survival through age, (ii) studying the long-term effects of the early environment, (iii) studying the relationship between inflammatory response and contrasted patterns of ageing and longevity between birds and mammals, (iv) focusing particularly on immune regulatory mechanisms, emphasizing their crucial role in fitness of hosts, especially late in life. Overall, our results highlight the importance of physiological constraints in terms of key resources limitation (i.e. antioxidants) or damage caused during costly and destructive activities and on intra-and inter-specific patterns of ageing.

**Keywords:** ageing, senescence, longevity, oxidative stress, antioxidants, life-history trade-offs, inflammation, immunity, immunopathology, ecoimmunology, zebra finch, mouse, Darwinian medicine.