



HAL
open science

Condition physique, immunocompétence et parasitisme dans des populations naturelles de chevreuils (*Capreolus capreolus*)

Maël Jégo

► **To cite this version:**

Maël Jégo. Condition physique, immunocompétence et parasitisme dans des populations naturelles de chevreuils (*Capreolus capreolus*). Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10237 . tel-01166544

HAL Id: tel-01166544

<https://theses.hal.science/tel-01166544>

Submitted on 23 Jun 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.

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Présentée

Devant L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

pour l'obtention

du DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le

8 décembre 2014

par

Maël JÉGO

Discipline : Biologie

Spécialité : Écologie évolutive

Condition physique, immunocompétence et
parasitisme dans des populations naturelles de
chevreuils (*Capreolus capreolus*)

Jury :	Dominique PONTIER	Présidente du jury
	Éric CARDINALE	Rapporteur
	Nathalie CHARBONNEL	Rapporteur
	François KLEIN	Examineur
	Jacqueline MARVEL	Examineur
	Hubert FERTÉ	Examineur
	Gilles BOURGOIN	Co-directeur de thèse
	Emmanuelle GILOT-FROMONT	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier mes directeurs de thèse, Emmanuelle Gilot-Fromont et Gilles Bourgoïn, pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer un doctorat, m'avoir fait confiance et m'avoir encadré durant ces trois années. Trouvez ici, à travers mon manuscrit de thèse mais également à travers les articles publiés, l'expression de ma reconnaissance.

Je souhaite également remercier les structures qui ont financé mon doctorat, à savoir l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage et VetAgro Sup. De plus, de façon générale, je remercie les structures qui m'ont accueilli tout au long de mon doctorat, le Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de l'université Claude Bernard Lyon 1 et VetAgro Sup.

Je remercie sincèrement Dominique Pontier d'avoir accepté très rapidement de présider mon jury de thèse. Merci pour le temps précieux que tu m'as accordé et pour les échanges toujours très intéressants que nous avons eu.

Je remercie très sincèrement mes deux rapporteurs, Nathalie Charbonnel et Eric Cardinale, d'avoir accepté de relire et commenter mon manuscrit de thèse.

Nathalie, comme tu le sais, depuis mon Master 1, j'ai toujours beaucoup admiré ton travail et tes recherches. J'ai été très honoré que tu fasses partie de mon jury et les échanges très intéressants que nous avons pu avoir, qui me poussent à aller plus loin dans les réflexions et les perspectives, constitueront une base solide de ma future carrière.

Eric, voilà maintenant quelques années que nous nous connaissons et du chemin a été parcouru depuis notre première rencontre en Master 2. Tu es, pour moi, un exemple et un modèle à suivre depuis notre première collaboration. En m'offrant un stage de Master 2, tu m'as finalement offert la possibilité de m'épanouir et découvrir le monde de la recherche. Mais la chose la plus importante, c'est sûrement la confiance que tu as mise en moi dès le début, me laissant libre de mes choix et ton ouverture constante à la discussion et au partage, qui m'a permis d'être autonome, responsable et finalement de chercher !! Il était pour moi impossible que tu ne sois pas rapporteur de ma thèse, car au delà du fait que tu me suis depuis mes premiers pas dans la recherche, ta positivité, ta passion et ta volonté de continuellement aller plus loin sont des moteurs essentiels des discussions scientifiques.

Je remercie très sincèrement l'ensemble des personnes de l'ONCFS avec qui j'ai eu l'honneur de travailler durant ces trois années. Je remercie François Klein, Claude Warnant, Gilles Capron, Marc mais également tous les volontaires et principalement Alexandra, Rudy, Mario ... Je vous remercie pour m'avoir accueilli sur les différents sites d'études, pour m'avoir fait découvrir un véritable monde dont j'ignorais l'existence, pour m'avoir appris tout ce que vous saviez. Les captures de chevreuils ne constituent pas vraiment un « travail » en soi mais plus un moment d'évasion dans des forêts magnifiques avec des personnes passionnées et généreuses. Les captures constituent les plus beaux souvenirs de ma thèse et resteront à jamais gravés !! Merci !!

Je remercie également Hubert Ferté !! Hubert, c'est également un véritable monde, que j'avais à peine effleuré durant mon master, que j'ai découvert avec toi ! Ta passion et tes connaissances uniques sur ces parasites m'ont tout de suite fasciné. Avoir eu l'occasion d'effectuer des manip avec toi étaient pour moi un réel honneur et j'aurais pu t'écouter parler pendant des heures sur ces petites bêtes !! Je te remercie pour le soutien et l'appui constant et infailible que tu m'as offert durant ces trois années !!

Je remercie Jacqueline Marvel tout d'abord pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse mais également pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche, ainsi j'en profite pour remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai pu travailler au sein de l'unité U851. Les visions différentes ont toujours engendrées des discussions passionnées et passionnantes et l'appui technique dont j'ai eu la chance de bénéficier ont grandement participé à l'originalité et à l'avancée de ce travail durant ma thèse.

Je remercie l'ensemble du personnel VetAgro Sup qui a participé de près ou de loin à mon doctorat. Plus particulièrement, je voudrais remercier Céline Dussart et Benoît Rannou, pour avoir grandement participé et avoir été présents tout au long de ma thèse lorsque j'en avais besoin !!

En ce qui concerne le LBBE, il y a vraiment beaucoup de monde à remercier, je vais essayer de n'oublier personne, si cela est le cas, je m'en excuse...

Je remercie l'ensemble des permanents, aussi bien chercheurs, que techniciens mais également le personnel administratif avec qui j'ai pu échanger, travailler, croiser ou qui a participé à rendre ces trois années passionnantes !! Parmi eux, il y a deux personnes qui ont marqué et marqueront pour toujours mon passage au LBBE.

La première est Jean-Michel Gaillard. Jean-Michel, je n'ai pas trouvé de mot plus fort que « merci » pour t'exprimer ma gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi durant ma thèse. Impossible d'oublier notre première rencontre à la réunion CNERA à Paris ... Impossible d'oublier ces trois années de thèse à partager, discuter, échanger ... Tu as été un soutien fort et tes encouragements lorsque cela s'est avéré nécessaire ont été très précieux durant toute ma thèse. Je te remercie très sincèrement pour ton investissement et ton implication dans mes différents travaux tout au long de ma thèse. Tu as contribué de manière très significative à ma formation et apprendre à tes côtés a été un véritable privilège !

Impossible non plus d'oublier les moments en dehors de la thèse que nous avons partagés !

Si je ne devais en choisir qu'un, je choisirais sans hésitation la réunion à Chizé en 2012 avec une mémorable partie de tennis de table et des fous rires interminables !

Pour finir, je dirais que mon seul souhait serait de continuer à collaborer avec toi dans le futur !

Merci Jean-Michel, merci pour tout !!!

La seconde personne est Laurent Crespin. Laurent, tu m'as montré comment s'amuser avec les stats, et ça c'est une victoire ! Merci pour toutes ces réunions où se sont toujours mêlées bonne humeur et travail, merci ton enthousiasme, ton investissement et surtout pour ta patience ! Merci pour ton temps à la fois au labo mais aussi en dehors. Mais ne t'inquiète

surtout pas, ce n'est pas parce qu'une page se tourne avec la fin de la thèse que cela signifie que tu t'es débarrassé de moi et la fin de nos réunions passionnées !! Bien au contraire !!

Et bien sur, comment ne pas finir par les personnes que j'ai cotoyé tous les jours depuis trois ans (ou un peu moins pour certains) !!

Je vous remercie

Jeff, Mathieu, Marlène, Morgane, Camille, Vérane, Stéphanie, Anne, Mariona, Pierre, Célia, Coraline, Marion R., Marion V., Christophe, Aurélie, Aurélie, Anna, Nicolas L., Nicolas F., William, Cécile G., Cécile V., Ronan, Sylvia.

De manière générale, je vous remercie pour tous ces moments passés ensemble, pour le soutien que vous m'avez apporté lorsque j'en avais besoin, d'avoir été là dans les mauvais moments mais aussi d'avoir été là pendant les bons, voire pendant les excellents moments !!

Il serait bien inutile de noircir cette feuille de tous les souvenirs que j'ai avec vous, car au-delà du fait qu'ils sont nombreux, ils sont surtout indescriptibles ! Je tiens à vous remercier très spécialement pour mon pot de thèse qui a été pour moi un moment très fort en émotion. Cela ne pouvait pas être plus parfait !!

Que cela soit juste le partage d'une bière ou une soirée avec certains, jusqu'à l'honneur d'une collaboration scientifique avec d'autres, vous constituez les pierres de l'édifice de l'aboutissement et la réussite de ma thèse, et pour cela, je vous remercie du fond du cœur !

Résumé

Condition physique, immunocompétence et parasitisme dans des populations naturelles de chevreuils (*Capreolus capreolus*)

L'émergence de l'éco-immunologie a permis une approche intégrative de l'étude des interactions hôtes-parasites allant des mécanismes moléculaires de la réponse immunitaire au rôle de l'immunocompétence dans l'évolution des traits d'histoire de vie. Dans ce contexte, cette thèse a pour but d'étudier les variations de l'immunocompétence dans deux populations naturelles de chevreuils vivant en milieux contrastés. Cependant, les méthodes disponibles pour caractériser le système immunitaire dans les populations naturelles sont peu nombreuses et peu adaptées. Aussi les objectifs de cette thèse étaient i) d'identifier et mettre au point des méthodes permettant de caractériser le système immunitaire du chevreuil, ii) d'étudier le lien entre les différents déterminants de l'immunocompétence, et iii) d'étudier les variations de l'immunocompétence en lien avec la condition physique d'une part, et avec un caractère sexuel secondaire d'autre part. Nous avons mesuré plusieurs composantes de l'immunité prenant en compte les aspects descriptifs, comme la numération des leucocytes, et fonctionnels, avec le test d'hémagglutination-hémolyse, la prolifération lymphocytaire ou la phagocytose. Nous avons mis en évidence une corrélation négative entre les deux déterminants de l'immunité, la condition physique et le parasitisme. Nous avons également montré un déclin des paramètres hématologiques et biochimiques avec l'âge (sénescence). Ensuite, nous avons montré des relations entre l'immunocompétence et la condition physique ou la taille des bois. Ces travaux corroborent différentes hypothèses de l'écologie évolutive.

Mots-clés : caractères sexuels secondaires, chevreuil, compromis, condition physique, éco-immunologie, immunocompétence, parasitisme.

Abstract

Body condition, immunocompetence and parasitism in natural populations of roe deer (*Capreolus capreolus*)

Ecoimmunology focuses on an integrative approach of host-pathogens interactions from the molecular mechanics of immune responses to the role of immunity in shaping the evolution of life history traits. Here, we proposed to study the variation of immunocompetence in two natural contrasted populations of roe deer. However, available methods to characterize immune system in wild populations are still limited. Consequently, in this context, the goals of this work were i) to identify methods to investigate the roe deer immune system and to adapt these methods developed for other species to roe deer, ii) to study the relationships between potential drivers of immunocompetence, including body condition and parasitism, and iii) to study variation of immunocompetence with body condition on one hand, and in the context of sexual selection, with secondary sexual characters on the other hand. We measured simultaneously several components of immunity including descriptive measures, as numeration of leucocytes subsets, and functional measures with hemagglutination-hemolysis, lymphocyte proliferation by mitogens stimulation or phagocytosis. We found a negative correlation between body condition and parasitism and senescence patterns in haematological and biochemical parameters. Moreover, we showed variations of immunocompetence with body condition and secondary sexual characters. This work corroborates some hypotheses of evolutionary biology.

Keywords: body condition, ecoimmunology, immunocompetence, parasitism, roe deer, secondary sexual character, trade-off.

UMR CNRS 5558 – Laboratoire de Biométrie et de Biologie Évolutive
UCB Lyon 1 – Bât. Grégor Mendel
43 bd du 11 Novembre 1918
69622 VILLEURBANNE

Valorisation des travaux dans le cadre de la thèse

Publications scientifiques

Jégo M, Bourgoïn G, Lemaître JF, Klein F, Crespin L, Gaillard JM, Gilot-Fromont E. Male roe deer trade their immune system for sexual ornamentation in the wild. *In preparation*

Jégo M, Djebali S, Klein F, Marvel J, Bourgoïn G, Gilot-Fromont E. characterization and variation of leucocytes subsets in roe deer (*Capreolus capreolus*) in two different populations. *In preparation*

Jégo M, Lemaître JF, Bourgoïn G, Capron G, Warnant C, Klein F, Gilot-Fromont E, Gaillard JM. Haematological parameters do senesce in the wild: evidence from contrasted populations of a long-lived mammal. *Journal of Evolutionary Biology*. *In revision*

Jégo M, Ferté H, Gaillard JM, Klein F, Crespin L, Gilot-Fromont E, Bourgoïn G. 2014 A comparison of the physiological status in parasitized roe deer (*Capreolus capreolus*) from two different populations. *Veterinary parasitology* **205**, 717-720.

Gilot-Fromont E, **Jégo M**, Bonenfant C, Gibert P, Rannou B, Klein F, Gaillard JM (2012) Immune phenotype and body condition in roe deer: individuals with body condition have different, not stronger immunity. *PLoS ONE*. 7:e45576. doi: 10.1371/journal.pone.0045576

Communication orale

Jégo M, Bourgoïn G, Lemaître JF, Klein F, Crespin L, Gaillard JM, Gilot-Fromont E. Male roe deer trade their immune system for sexual ornamentation in the wild. 11th European Wildlife Disease Association (EWDA), Edinburgh, Scotland. August 28th 2014

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	1
RESUME.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTES DES FIGURES	8
LISTES DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION.....	10
CHAPITRE I.....	13
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. ÉMERGENCE DE LA NOTION D'IMMUNOCOMPÉTENCE	14
2. APERÇU DU FONCTIONNEMENT DE L'IMMUNITÉ	16
3. COÛTS DE L'IMMUNITÉ.....	18
3.1. <i>Coût énergétique et lien avec la condition corporelle.....</i>	<i>20</i>
3.2. <i>Coût de l'immunopathologie.....</i>	<i>21</i>
4. COÛTS ET COMPROMIS	22
4.1. <i>Compromis avec l'effort reproducteur</i>	<i>23</i>
4.2. <i>Compromis avec la croissance</i>	<i>24</i>
4.3. <i>Compromis avec la survie.....</i>	<i>24</i>
5. REGULATIONS PHYSIOLOGIQUES ET IMMUNOCOMPÉTENCE DANS LA SÉLECTION SEXUELLE	
26	
5.1. <i>Hypothèse du handicap d'immunocompétence.....</i>	<i>26</i>
5.2. <i>Dimorphisme sexuel dans le phénotype immunitaire</i>	<i>28</i>
6. OBJECTIFS DE LA THÈSE	30
CHAPITRE II.....	31
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	31
1. BIOLOGIE DU CHEVREUIL	32
2. SITES D'ÉTUDE ET CAPTURES.....	34
2.1. <i>Sites d'étude.....</i>	<i>34</i>
2.2. <i>Captures.....</i>	<i>39</i>
3. CARACTÉRISATION DE L'IMMUNITÉ CHEZ LE CHEVREUIL	47
3.1. <i>Quels types de mesures ?.....</i>	<i>47</i>
3.2. <i>Que mesurer ?.....</i>	<i>47</i>
3.3. <i>Comment mesurer ?.....</i>	<i>50</i>
4. TEST FONCTIONNEL D'HEMAGGLUTINATION-HEMOLYSE.....	52
4.1. <i>Les anticorps naturels et le complément.....</i>	<i>52</i>

4.2.	<i>Principe du test</i>	53
5.	CHARACTERIZATION AND VARIATION OF LEUCOCYTES SUBSETS IN ROE DEER (<i>CAPREOLUS CAPREOLUS</i>) IN TWO DIFFERENT POPULATIONS (ARTICLE 1)	56
5.1.	<i>Abstract</i>	57
5.2.	<i>Introduction</i>	58
5.3.	<i>Material and methods</i>	59
5.4.	<i>Results</i>	62
5.5.	<i>Discussion</i>	68
6.	TEST FONCTIONNEL DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE	76
6.1.	<i>La prolifération lymphocytaire</i>	76
6.2.	<i>Principe du test</i>	77
6.3.	<i>Protocole</i>	77
6.4.	<i>Résultats</i>	78
6.5.	<i>Conclusion</i>	80
7.	TEST FONCTIONNEL DE PHAGOCYTOSE	80
7.1.	<i>La phagocytose</i>	80
7.2.	<i>Principe du test</i>	81
7.3.	<i>Protocole</i>	82
7.4.	<i>Résultats</i>	82
7.5.	<i>Conclusion</i>	87
8.	CONCLUSION	87
CHAPITRE III		88
VARIATIONS DES DETERMINANTS DE L'IMMUNITE CHEZ LE CHEVREUIL. 88		
1.	INTRODUCTION.....	89
2.	A COMPARISON OF THE PHYSIOLOGICAL STATUS IN PARASITIZED ROE DEER (<i>CAPREOLUS CAPREOLUS</i>) FROM TWO DIFFERENT POPULATIONS (ARTICLE 2).....	91
2.1.	<i>Abstract</i>	92
2.2.	<i>Introduction</i>	93
2.3.	<i>Material and methods</i>	94
2.4.	<i>Results</i>	96
2.5.	<i>Discussion</i>	99
2.6.	<i>Supplementary data</i>	102
3.	HAEMATOLOGICAL PARAMETERS DO SENESCE IN THE WILD: EVIDENCE FROM DIFFERENT POPULATIONS OF A LONG-LIVED MAMMAL (ARTICLE 3)	116
3.1.	<i>Abstract</i>	117
3.2.	<i>Introduction</i>	118
3.3.	<i>Material and methods</i>	121
3.4.	<i>Results</i>	125
3.5.	<i>Discussion</i>	133
3.6.	<i>Appendix 1</i>	137
4.	CONCLUSION	145
CHAPITRE IV		148

VARIATIONS DE L'IMMUNOCOMPÉTENCE CHEZ LE CHEVREUIL	148
1. INTRODUCTION.....	149
2. IMMUNE PHENOTYPE AND BODY CONDITION IN ROE DEER: INDIVIDUALS WITH HIGH BODY CONDITION HAVE DIFFERENT, NOT STRONGER IMMUNITY (ARTICLE 4)	151
2.1. <i>Abstract</i>	152
2.2. <i>Introduction</i>	153
2.3. <i>Materials and Methods</i>	154
2.4. <i>Results</i>	159
2.5. <i>Discussion</i>	164
3. MALE ROE DEER TRADE THEIR IMMUNE SYSTEM FOR SEXUAL ORNAMENTATION IN THE WILD (ARTICLE 5).....	168
3.1. <i>Abstract</i>	169
3.2. <i>Introduction</i>	170
3.3. <i>Material and methods</i>	171
3.4. <i>Results</i>	173
3.5. <i>Discussion</i>	178
3.6. <i>Appendix 1</i>	185
4. CONCLUSION	187
DISCUSSION GÉNÉRALE	189
1. COMMENT MESURER L'IMMUNITÉ DANS LES POPULATIONS SAUVAGES	191
1.1. <i>Contraintes liées au suivi de terrain</i>	191
1.2. <i>Principes de mesure de l'immunocompétence</i>	194
1.3. <i>Tests proposés chez le chevreuil</i>	196
2. VARIATIONS DES DEUX DÉTERMINANTS DE L'IMMUNOCOMPÉTENCE : LA CONDITION PHYSIQUE ET LE PARASITISME.....	199
2.1. <i>Relations entre condition physique et parasitisme</i>	199
2.2. <i>Implication sur la connaissance de la pathogénie des parasites</i>	200
2.3. <i>La relation parasitisme-condition physiologique se modifie avec l'âge</i>	200
3. VARIATIONS DE L'IMMUNITÉ.....	202
3.1. <i>Effet population</i>	202
3.2. <i>Lien avec la condition physique</i>	202
3.3. <i>Evolution de l'immunité avec l'âge</i>	203
4. PARASITES, IMMUNOCOMPÉTENCE ET SÉLECTION SEXUELLE.....	204
5. APPLICATIONS POSSIBLES À LA GESTION DES ESPÈCES DE CERVIDES	205
6. PERSPECTIVES	207
6.1. <i>Perspectives méthodologiques</i>	207
6.2. <i>Lien entre physiologie et immunité</i>	208
6.3. <i>Dimorphisme sexuel de l'immunité</i>	210
6.4. <i>Lien avec la reproduction et la survie</i>	210
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	212
ANNEXES.....	231

1.	ANNEXE 1. FICHE PRELEVEMENT CAPTURES	232
2.	ANNEXE 2. PROTOCOLE PURIFICATION PBMC DU SANG DE CHEVREUIL	234
3.	ANNEXE 3. PROTOCOLE DU TEST HEMOLYSE-HEMAGGLUTINATION	235
4.	ANNEXE 4. PROTOCOLE TEST DE PHAGOCYTOSE	239
5.	ANNEXE 5. PARTICULES DE ZYMOSAN EN CONTACT AVEC LES PHAGOCYTES.....	240
6.	ANNEXE 6. PROTOCOLE DE PHAGOCYTOSE AVEC ANTICORPS SECONDAIRE	241
7.	ANNEXE 7. RESULTATS PRELIMINAIRES DE LA DISTRIBUTION LEUCOCYTAIRE ET DE L'ACTIVITE PHAGOCYTAIRE (UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE).....	242

Listes des figures

Figure 1. Territoire d'Étude et d'Expérimentation de Trois Fontaines	36
Figure 2. (a) Plan de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé ; (b) illustration de la forêt de Chizé.....	38
Figure 3. Sabots qui permettent de transporter les chevreuils du lieu de capture au lieu de manipulation.....	41
Figure 4. Prise de sang.	42
Figure 5 : Principe de l'étalement sanguin (Smith 2008)	43
Figure 6. Prélèvement de moquettes.	46
Figure 7. Modèle conceptuel des composantes des défenses immunitaires (adapté de Schmid-Hempel et Ebert 2003)	49
Figure 8. Résultats de tests d'agglutination (à gauche) et d'hémolyse (à droite).	55
Figure 9. Résultats des tests de lymphoprolifération sur 3 chevreuils, avec stimulation par le PMA/ionomycine, la concanavaline A, et les LPS.	79
Figure 10. Histogramme de cytofluorimétrie en flux de la phagocytose	84
Figure 11. Vue microscopique de la phagocytose : trois particules de Zymosan phagocytées par une cellule phagocytaire.....	85
Figure 12. Analyse de cytofluorimétrie en flux de la phagocytose.....	86

Listes des tableaux

Tableau 1 : coûts des réponses immunitaires non spécifique et spécifique (Klasing 2004)... 19

INTRODUCTION

Depuis plusieurs décennies, les écologistes et évolutionnistes se sont penchés sur les relations hôtes-pathogènes comme l'une des nombreuses facettes qui composent l'histoire de vie des individus (Hamilton et Zuk 1982 ; Clayton et Moore 1997). Les nombreuses études sur le sujet ont admis qu'il était inconcevable de considérer les parasites sans considérer la réponse de l'individu aux infections. En effet, il est commun d'observer, dans une population, de fortes variations de la charge parasitaire et des répercussions du parasitisme sur l'hôte. Ces variations dans la réceptivité des hôtes aux agents pathogènes et dans leur sensibilité à la maladie sont liées au système immunitaire, qui regroupe l'ensemble des organes et fonctions qui protègent l'individu contre les agressions extérieures.

Cependant, l'arrivée de l'étude du système immunitaire dans le domaine de l'écologie évolutive a donné lieu à un changement de paradigme. L'immunologie est en premier lieu un domaine médical qui analyse la réponse immunitaire qui fait suite à la stimulation par des antigènes. Or cette réponse ne constitue pas le seul élément de la stratégie immunitaire des hôtes : un hôte a besoin d'élaborer la capacité de répondre de manière appropriée à d'autres antigènes, avant même de les avoir rencontrés. Cette capacité, l'immunocompétence, doit être comprise en étudiant ses variations dans les populations naturelles, afin de comprendre comment elle est déterminée par les parasites rencontrés précédemment et les ressources disponibles ; c'est cette démarche qui a donné naissance à l'éco-immunologie ou immuno-écologie (Hamilton et Zuk 1982 ; Sheldon et Verhulst 1996).

Du fait de l'émergence récente de ce concept, les variations de l'immunocompétence sont encore incomplètes chez les espèces animales domestiques, mais également chez l'homme. A titre d'exemple, pour l'homme, les études commencent à s'intéresser et tenter d'expliquer les variations de l'immunocompétence dans le cas du virus du SIDA, du SRAS ou plus récemment de la fièvre hémorragique Ebola (Harthill 2011). Les connaissances concernant le

système immunitaire des espèces sauvages sont encore plus parcellaires, et d'autant plus pour ce qui concerne les variations de l'immunité (Norris et Evans 2000).

Cependant, l'enjeu d'une telle compréhension est important pour analyser l'impact des agents pathogènes dans des populations qui sont par ailleurs parfois menacées. En effet, l'étude de l'impact de facteurs tels que l'âge, ou les conditions environnementales sur les variations de l'immunocompétence permet d'une part de comprendre pourquoi certains individus ou certaines populations sont plus affectés par le parasitisme que d'autres (Møller et al. 2006 ; Buehler et al. 2009) et d'autre part de comprendre l'impact de ces variations de l'immunocompétence sur la dynamique des populations.

Le chevreuil *Capreolus capreolus* est un modèle biologique intéressant. C'est en effet une espèce « *income breeder* », dont l'effort de reproduction est permis par les ressources disponibles au moment de cet effort. C'est donc une des espèces les plus à même de présenter, à certaines périodes de l'année, une difficulté à fournir un effort de reproduction et d'immunité simultanément. De plus, sa biologie est bien connue : les agents pathogènes présents ont déjà été étudiés et les déterminants de sa condition physique, qui permet cet effort, sont déjà largement connus.

Cette thèse se focalise sur les variations de trois traits, l'immunité, le parasitisme et la condition physique dans deux populations contrastées de chevreuils, suivies au plan démographique et épidémiologique depuis plusieurs décennies. La première partie exposera les connaissances acquises sur l'immunocompétence à partir des études précédentes. Les chapitres suivants détailleront les résultats de ce travail concernant la mise au point d'outils d'évaluation de l'immunocompétence, les variations du parasitisme, de la condition physique et de l'immunité.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Émergence de la notion d'immunocompétence

Face aux continuelles menaces des parasites, ou agents pathogènes¹, qui vivent en utilisant les ressources de l'hôte, la sélection naturelle a favorisé le développement d'une large gamme d'adaptations. Parmi elles figure le système immunitaire, indispensable pour les organismes afin de reconnaître le « non-soi » (en particulier les parasites), de se défendre, de contrôler et de minimiser l'impact des parasites. Le système immunitaire apparaît comme une fonction physiologique primordiale puisqu'elle assure l'intégrité et la survie de l'organisme dans un environnement hostile (McDade 2003).

Dans ce contexte, l'éco-immunologie s'est développée comme le domaine d'analyse des variations de l'immunité à l'échelle des individus, des populations et des espèces. Il est possible d'associer l'émergence de l'éco-immunologie à la publication d'Hamilton et Zuk (1982) sur le rôle des parasites dans la sélection sexuelle, qui a engendré un intérêt considérable sur les relations entre le parasitisme et l'histoire de vie des hôtes (Sheldon et Verhulst 1996 ; Norris et Evans 2000). De nombreuses études se sont alors tournées vers l'analyse du compromis (« *trade-off* ») entre les différentes composantes de l'histoire de vie et l'immunité, en montrant que l'investissement dans l'effort reproducteur, la survie ou les caractères sexuels secondaires est souvent associé à une plus forte prévalence ou intensité des infections parasitaires (Norris et Evans 2000). En effet, comme le suggère le second article fondateur en éco-immunologie (Sheldon et Verhulst 1996), le compromis, c'est-à-dire l'allocation des ressources limitées aux différentes fonctions physiologiques coûteuses, serait à l'origine des variations quantitatives et qualitatives des défenses immunitaires. Par la suite, de très nombreuses publications se sont intéressées aux mécanismes qui peuvent expliquer ce

¹ Le terme « parasitisme » se réfère à une association entre deux organismes, dans laquelle le parasite vit au dépend (en terme d'énergie) de son hôte. Dans le cadre de la thèse, les termes parasites, agents pathogènes ou infectieux sont utilisés comme des synonymes.

compromis entre les fonctions qui maximisent les traits d'histoire de vie et l'immunocompétence (Norris et Evans 2000). L'immunocompétence est un terme récent, devenu central depuis l'émergence de l'éco-immunologie (Owens et al. 2010). Utilisé pour la première fois par Folstad et Karter (1992), aucune définition de ce terme n'a été donnée dans leur publication. Plus tard, Norris et Evans (2000) ont défini l'immunocompétence comme la « capacité de l'hôte à prévenir et contrôler une infection par un pathogène ou un parasite » repris par la suite par Beldomenico et Begon (2010) comme la « capacité du système immunitaire à contrer et limiter une infection ». Finalement, Vinkler et Albrecht (2011) proposent d'utiliser ce terme comme un caractère binaire, et d'utiliser plutôt le terme « sensibilité immunitaire » (« *immune responsiveness* ») comme l'amplitude de la réponse immunitaire, c'est-à-dire un trait quantitatif continu.

Les principaux objectifs de l'éco-immunologie sont de comprendre les facteurs extrinsèques et intrinsèques qui mènent à une modification des fonctions du système immunitaire dans un contexte d'écologie évolutive (Demas et Nelson 2011), et surtout de comprendre comment ces changements influent sur la sensibilité des hôtes. Ainsi, les concepts liés à l'immunocompétence ont pris naissance dans l'écologie évolutive et l'écophysiologie afin d'apporter des outils permettant de comprendre les variations de la sensibilité des hôtes pouvant avoir un impact sur les différents traits d'histoire de vie. Il convient cependant de préciser que les concepts utilisés en éco-immunologie chevauchent ceux de l'immunologie classique. Alors que les immunologistes définissent l'immunocompétence comme la capacité de l'hôte à produire une réponse immunitaire appropriée, les écologistes, quant à eux, se réfèrent à la capacité de l'hôte à contrer efficacement une infection. Pour être plus précis, dans son utilisation dans le cadre de l'éco-immunologie le terme « immunocompétence » fait référence à la capacité de l'hôte à répondre efficacement à un parasite particulier, préférant ainsi l'utilisation de l'expression « immunocompétence vis-à-vis de tel parasite ».

2. Aperçu du fonctionnement de l'immunité

L'objectif ici n'est pas de rentrer dans le détail de l'ensemble des mécanismes et rôles des différents acteurs du système immunitaire mais de décrire la diversité qui existe et de donner quelques exemples de chacune des voies immunitaires. Comme dit précédemment, le système immunitaire chez les mammifères peut communément être divisé en deux principales composantes : l'inné (ou constitutive) et l'acquis (ou induite). Mais ces composantes peuvent, elles-mêmes, être divisées en deux branches, qui se réfèrent plutôt à la structure des éléments qui la composent, à savoir le cellulaire et l'humoral (Male et al. 2006). L'immunité fait intervenir de très nombreuses cellules et molécules aux fonctions multiples, qui interagissent entre elles. Les différentes voies et branches sont également liées par des relations de régulation croisée qui rendent le système immunitaire particulièrement complexe.

L'immunité innée (ou constitutive) inclut à la fois les barrières physiques de défense, telles que la peau, le mucus, la flore bactérienne, mais également les cellules immunitaires, comme les phagocytes, les lymphocytes « *Natural Killers* », les neutrophiles, les éosinophiles, ainsi que des protéines, comme le complément (Male et al. 2006). Par exemple, les macrophages constituent un élément majeur de l'immunité innée permettant entre autres l'élimination d'agents étrangers par phagocytose ou la sécrétion de cytokines. Dans la branche humorale de l'immunité innée, le complément constitue une composante de la réponse inflammatoire de par sa capacité à lyser un corps étranger après reconnaissance et agglutination par les anticorps naturels.

La branche acquise (ou induite) de l'immunité est définie par des mécanismes complexes qui interviennent après la reconnaissance d'un agent pathogène. Ces mécanismes font intervenir un grand nombre d'acteurs. Parmi eux, les lymphocytes, dont on peut distinguer deux types : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes B, après sélection clonale, deviennent des plasmocytes, cellules effectrices de la réaction humorale de par leur capacité à

sécréter des anticorps. Les autres clones deviennent des cellules mémoires à durée de vie longue qui permettront une réponse immunitaire humorale quasi immédiate lors de la prochaine rencontre avec le même antigène. Les lymphocytes T, quant à eux, incluent les lymphocytes T CD4+ « *helpers* » et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les lymphocytes T CD4+ « *helpers* » sont différenciés en deux sous-groupes : les Th1 (stimulation de l'inflammation lors de l'entrée d'un microparasite) et les Th2 (coopération avec les lymphocytes B pour la production d'anticorps et activation des granulocytes éosinophiles et basophiles lors de l'entrée d'un macroparasite extracellulaire). Les lymphocytes T CD8+ sont les seuls lymphocytes capables d'attaquer et détruire directement les cellules infectées. Ils se lient à la cellule cible, libèrent de grandes quantités de substances chimiques cytotoxiques (granzymes, perforine) qui s'insèrent dans la membrane plasmique des cellules entraînant la formation de pores transmembranaires. Les granzymes pénètrent par les pores et provoquent l'apoptose de la cellule cible (Male et al. 2006).

Au-delà des concepts, c'est la terminologie utilisée peut créer une confusion et une incompréhension entre les immunologistes et les écologistes. En immunologie, les deux branches de l'immunité sont respectivement qualifiées d'« innée » (« *innate* » en anglais) pour celle qui est présente avant l'infection et d'« acquise » (« *adaptive* » en anglais) pour celle qui survient pendant l'infection. En écologie, l'« inné » qualifie un caractère qui se retrouve chez un ensemble d'individus de la même espèce, déterminé génétiquement, comme la parade nuptiale ou la migration, et l'« acquis » comme un caractère secondaire construit à partir d'informations, d'un apprentissage, comme l'imitation ou le conditionnement (Lorenz 2007). Ainsi d'autres termes ont été proposés dans le cadre de l'éco-immunologie afin de dissiper la confusion dans les deux disciplines en utilisant « constitutive », « non-spécifique » ou « naturelle » pour qualifier la branche innée de l'immunité et « induite », « spécifique » ou « adaptative » pour la branche acquise de l'immunité (Schmid-Hempel et Ebert 2003).

3. Coûts de l'immunité

Il est possible de distinguer deux principaux « coûts » de l'immunité : le coût énergétique d'une part et le coût immunopathologique d'autre part. Les études menées en écophysiologie ou en éco-immunologie utilisent le terme de « coût » pour définir l'énergie (ressources, protéines) dont l'organisme a besoin pour mettre en place une réponse immunitaire, c'est-à-dire la production, l'activation des organes, des cellules ou molécules immunologiquement actives. Mais le coût comprend également les effets secondaires résultant d'une réponse immunitaire normale (comme par exemple la fièvre), de réactions immunitaires excessives ou inappropriées. Même lorsque l'organisme n'est pas sujet à une infection, la mise en place et le maintien d'un système immunitaire normal nécessitent un coût. Par ailleurs, lorsque l'organisme est infecté par un parasite, les processus physiologiques vont être activés afin de générer une réponse immunitaire.

Comme décrit dans le tableau 1, les deux grandes voies de l'immunité diffèrent par leurs coûts quant à la mise en place, la maintenance et l'activation. L'immunité innée, présente de manière constante et reconnaissant de façon non-spécifique les agents pathogènes, apparaît comme coûteuse en matière d'utilisation et surtout de coût pathologique, mais présente un coût moins important en développement et maintenance. Au contraire, l'immunité acquise, activée à la suite de la reconnaissance d'un agent pathogène ayant entraîné une sensibilisation au système, apparaît comme coûteuse dans la mise en place mais peu coûteuse dans le maintien et l'utilisation (Klasing 2004). L'immunité acquise est donc plus avantageuse dans le cas où les individus rencontrent le même agent pathogène plusieurs fois au cours de leur vie.

Tableau 1 : coûts des réponses immunitaires non spécifique et spécifique (Klasing 2004)

Paramètre	Temps de développement	Coût énergétique du développement	Coût énergétique de la maintenance	Coût énergétique d'utilisation	Efficacité		Coût pathologique d'utilisation
					Nouveau pathogène	Pathogène connu	
Immunité non-spécifique	Courte	Faible	Moyenne	Très élevée	Bonne	Bonne	Très élevée
Immunité spécifique	Longue	Très élevée	Faible	Faible	Pauvre	Excellente	variable

3.1. Coût énergétique et lien avec la condition corporelle

Certaines études apportent un soutien faible au coût énergétique lié à l'utilisation de la fonction immunitaire (Svensson et al. 1998 ; Nilsson 2002), voire aucun support (Hörak et al. 2003 ; Verhulst et al. 2004), suggérant l'hypothèse qu'il y aurait des mécanismes limitant le coût énergétique de l'immunité. Par exemple, les niveaux élevés de dépenses énergétiques associés à la consommation d'oxygène augmenteraient la production de radicaux libres, ayant des effets néfastes sur le système immunitaire (Svensson et al. 1998). Une autre hypothèse suggère que l'immunosuppression pourrait résulter de l'augmentation des hormones en réponse au stress dans le but d'éviter les dommages aux tissus ou d'augmenter les risques de réactions d'immunopathologie (Svensson et al. 1998).

Mais de nombreuses publications, principalement dans le domaine de la santé humaine, révèlent que, même modérée, une malnutrition protéino-énergétique, peut entraîner une mauvaise condition physique, définie comme le statut physique et physiologique de l'individu, qui affecte non seulement les barrières physiques (peau, muqueuses, ...) mais également les réponses immunitaires (Chandra 1997 ; Woodward 1998). En effet, par exemple, les carences en Zinc, un micronutriment, entraînent une réduction de la prolifération lymphocytaire et diminuent la production d'anticorps après une stimulation antigénique (Chandra 1999). Un autre micronutriment, le Sélénium, apparaît également comme essentiel dans le maintien d'une réponse immunitaire optimale (Hoffmann et Berry 2008). Les carences en Sélénium entraîneraient une diminution de la capacité des organismes à répondre de manière optimale aux virus ou aux tumeurs. Il a été montré un lien entre les carences en Sélénium et la réponse immunitaire Th2 et à l'inverse, une supplémentation en Sélénium renforcerait le système immunitaire en diminuant le risque de cancer et permettrait l'augmentation de la production de lymphocytes (Hoffmann et Berry 2008).

Certains nutriments spécifiques sont impliqués dans des aspects clés de l'inflammation et d'une multitude de fonctions immunitaires (Oleg et Herb 2011). A titre d'exemple, les acides gras vont moduler les réponses immunitaires en activant les profils cytokines Th1 et Th2 ainsi que l'activité des cellules « *Natural Killers* » (NK) chez l'homme mais également chez l'animal. De la même manière, les vitamines, par exemple de type A, jouent un rôle important pour les lymphocytes T et B, en régulant la production d'IgA alors que les vitamines C et D vont respectivement renforcer et inhiber l'activité des neutrophiles. De manière générale, les acides aminés jouent également un rôle clé dans la maintenance et la réponse immunitaire en régulant l'activation des lymphocytes T et B, les NK les macrophages, la prolifération des lymphocytes, la production d'anticorps, de cytokines et autres substances cytotoxiques (Li et al. 2007).

3.2. Coût de l'immunopathologie

Le coût énergétique d'une infection inclut le coût direct de la présence de l'agent pathogène (dommage sur les tissus, pertes de nutriments, sang ...), le coût de production de la réponse immunitaire et le coût de l'immunopathologie (Viney et al. 2005). En effet, malgré les nombreux mécanismes de régulation, une dérégulation du système immunitaire peut entraîner un processus pathologique, caractérisé par un retournement du système immunitaire contre le soi. Cette dérégulation peut causer des dégâts à l'hôte plutôt qu'au parasite et entraîner un coût pathologique, comme par exemple le prolongement d'une inflammation suite à une réaction innée locale. C'est aussi le cas de certaines anémies associées aux infections de *Plasmodium falcifarum*, responsable de la malaria ; en effet, la destruction des globules rouges, responsable de l'anémie, est causée directement par le système immunitaire (Graham et al. 2005).

Les processus pathologiques liés à un excès immunitaire incluent par exemple les maladies auto-inflammatoires, les maladies auto-immunes et la lymphoprolifération (Sibilia 2007). Les

maladies auto-inflammatoires résultent d'une déficience de l'immunité innée. Les maladies auto-immunes se caractérisent par un dysfonctionnement du système immunitaire dont le résultat est l'immunisation contre les antigènes du « soi », on parle alors d'auto-antigène. Enfin, la lymphoprolifération peut être liée à la dérégulation de certains mécanismes, comme l'apoptose, entraînant ainsi la circulation de lymphocytes « malins » qui ne sont pas éliminés (Sibilia 2007).

Plusieurs auteurs considèrent que l'essentiel du coût de l'immunité réside non pas dans la quantité d'énergie nécessaire pour le mettre en place et le faire fonctionner, mais dans les effets secondaires de son activation, qui revient à détourner le métabolisme entier vers la défense immunitaire (revue dans Lochmiller et Deerenberg 2000). Ces aspects ne seront pas développés par la suite, dans le cadre de la thèse.

4. Coûts et compromis

L'existence de coûts de l'immunité permet de comprendre pourquoi un individu ne développe pas une immunité maximale permanente. En se basant sur la théorie des traits d'histoire de vie, un individu ne peut pas maximiser simultanément l'ensemble de ses traits d'histoire de vie du fait des ressources limitées (Williams 1966 ; Stearns 1992). Parmi les traits principaux, il est possible de citer la reproduction, la maintenance/développement et la croissance. Ainsi, une des hypothèses centrales en éco-immunologie est qu'il existe un compromis² entre les défenses immunitaires et les autres fonctions ou activités physiologiques qui contribuent à la valeur sélective³ de l'animal (Sheldon et Verhulst 1996 ; Lochmiller et Deerenberg 2000 ; Norris et Evans 2000 ; Zuk et Stoehr 2002). On prédit donc que l'augmentation d'un des traits

² Allocation d'énergie entre deux ou plusieurs traits en compétition pour la même ressource.

³ La valeur sélective correspond à l'espérance de la contribution relative aux générations ultérieures et est souvent estimée par plusieurs composantes, comme la survie, le succès reproducteur.

d'histoire de vie pourra se faire au détriment d'autres traits, dont l'immunocompétence, et vice-versa (Norris et Evans 2000).

Il existe de nombreuses études qui démontrent l'existence de tels compromis dont trois exemples entre la réponse immunitaire d'une part et la reproduction, la croissance ou la survie d'autre part sont illustrés ci-dessous.

4.1. Compromis avec l'effort reproducteur

De nombreux travaux montrent que la réponse immunitaire et l'effort reproducteur sont deux fonctions coûteuses qui peuvent faire l'objet d'un compromis. Allander (1997) a mis en évidence un compromis entre une mesure indirecte de l'activité immunitaire (la prévalence du protozoaire sanguin *Haemoproteus majoris*), et l'effort reproducteur chez les mésanges charbonnières *Parus major* L. Plus précisément, les parents ayant une nichée agrandie expérimentalement présentaient une prévalence plus élevée de parasites sanguins que ceux ayant une nichée plus réduite. Aucune différence entre les sexes et aucun effet de l'âge n'ont été trouvés. Ces résultats vont à l'encontre de ceux de Norris et al. (1994) qui n'ont observé aucun effet d'une nichée agrandie sur la prévalence de *Leucocytozoon*, un hématozoaire sanguin. Allander (1997) soulève le fait que premièrement, des espèces différentes de parasites ont été étudiées lors de ces 2 études et deuxièmement, la réponse immunitaire, et par conséquent le coût engendré est différent. En accord avec Allander (1997), Ilmonen et al. (2000) a également mis en évidence un compromis entre l'effort reproducteur et les défenses immunitaires chez le gobemouche noir *Ficedula hypoleuca* en montrant que les femelles expérimentalement immunisées présentaient une réduction du succès reproducteur, de la masse corporelle et une survie des jeunes plus faible. Sur la même espèce, en augmentant artificiellement les nichées, Moreno et al. (1999) ont montré une diminution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez les femelles. Des résultats similaires ont été observés sur le gobemouche à collier *Ficedula albicollis* (Nordling et al. 1998), la mésange bleue

Parus caeruleus (Råberg et al. 2000 ; Stjernman et al. 2004), et le moineau domestique *Passer domesticus* (Bonneaud et al. 2003).

4.2. Compromis avec la croissance

Plusieurs publications mettent en évidence un compromis entre l'investissement dans l'immunité et la croissance. Pour ne citer que quelques exemples, Saino et al. (1998) ont montré chez les hirondelles de cheminée *Hirundo rustica*, parasitées expérimentalement avec des ectoparasites, une corrélation négative entre la croissance et l'immunocompétence. Les résultats de Soler et al. (2003) vont également dans ce sens en montrant que les oisillons de la pie bavarde, *Pica pica*, nourris avec de la méthionine (qui active la réponse immunitaire des lymphocytes T) présentaient une croissance plus faible mais une réponse immunitaire à médiation cellulaire plus élevée que les contrôles. Brommer (2004) a également mis en évidence ce même compromis chez la mésange bleue, *Parus caeruleus*. Pour finir, une méta-analyse basée sur les résultats expérimentaux a montré un compromis entre l'investissement dans la croissance et celui dans la fonction immunitaire, sans pour autant montrer un effet exclusif entre les deux (Van der Most et al. 2011). En effet, alors que la méta-analyse a montré qu'il y avait uniformément un effet de la croissance sur la fonction immunitaire, l'inverse, en revanche n'est pas systématique. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que le coût pour la croissance est plus élevé que celui pour la fonction immunitaire (Klasing 1998) mais également par le fait que dans la majorité des études, une seule composante de l'immunité a été mesurée, ne reflétant ainsi pas la complexité du système immunitaire.

4.3. Compromis avec la survie

Le coût de l'immunité sur la survie a été expérimentalement montré par Moret et Schmid-Hempel (2000) chez le bourdon terrestre *Bombus terrestris*. En effet, les auteurs ont mis en évidence qu'en période de famine, la survie des bourdons est diminuée de 50 à 70%

lorsqu'une réponse immunitaire est induite artificiellement. Chez la poule, Star et al. (2007) ont aussi montré que les titres d'anticorps naturels étaient significativement prédictifs du taux de survie. De la même manière, Gonzalez et al. (1999) ont mis en évidence une corrélation négative entre la concentration des immunoglobulines et la probabilité de survie chez le moineau domestique, mais parallèlement une corrélation positive entre la prolifération lymphocytaire et la survie. Toujours chez les oiseaux, Hanssen et al. (2004) ont montré un compromis entre la capacité des hôtes à monter une réponse de type humorale (après immunisation expérimentale) et la survie chez l'eider à duvet, *Somateria mollissima*.

Même s'il est possible de mettre en évidence ces compromis entre l'investissement dans l'immunité et l'investissement dans les différents traits d'histoire de vie, ces résultats sont pour la plupart contexte-dépendants et utilisent également des méthodes diverses pour mesurer l'immunocompétence (Norris et Evans 2000 ; Lochmiller et Deerenberg 2000). D'une part, l'hétérogénéité des mesures utilisées pour caractériser l'immunocompétence empêche de généraliser les concepts de compromis entre l'immunocompétence et les autres traits ou fonctions coûteuses pour l'organisme. D'autre part, l'utilisation d'une seule composante pour caractériser l'immunocompétence peut engendrer une vision simpliste du système immunitaire et empêche de mettre en évidence de possibles compromis entre les différentes branches de l'immunité et les autres traits étudiés.

Les compromis faisant intervenir l'immunité ont également suscité un grand intérêt dans le cadre de la sélection sexuelle.

5. Régulations physiologiques et immunocompétence dans la sélection sexuelle

5.1. Hypothèse du handicap d'immunocompétence

L'idée que le choix du partenaire par les femelles pourrait être une force sélective impliquant les caractères sexuels secondaires des mâles a été introduite par Darwin (1971). Darwin a ainsi mis en évidence le fait que certains organes ou comportements sont susceptibles d'être sélectionnés par la sélection sexuelle, comme les bois des cervidés, qui dans un contexte de compétition entre les individus du même sexe, ici les mâles, influent sur l'accès aux femelles (Thomas et al. 2010). De plus, la préférence des femelles pour les caractères sexuels secondaires qualifiés d'extravagants peut, selon Darwin, favoriser par exemple les plumages très colorés ou surdéveloppés (tels que ceux des paons), les grands bois chez les cerfs, le chant complexe des oiseaux ... Il faut attendre la publication d'Hamilton et Zuk (1982) pour apporter une première piste sur les mécanismes qui régissent cette force sélective. Les auteurs suggèrent que les caractères sexuels secondaires agiraient comme un signal honnête, c'est-à-dire comme le reflet de la capacité du mâle à résister au parasitisme. En d'autres termes, seuls les mâles possédant les « bons gènes » pourraient exprimer ces attributs secondaires sans souffrir d'une réduction de leur valeur sélective pouvant provenir d'un pathogène. Cette théorie est l'extension du principe du handicap proposé par Zahavi (1975), qui postule que le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires constitueraient un signal honnête de la qualité des mâles.

L'hypothèse du handicap d'immunocompétence (ICHH) proposée par Folstad et Karter (1992) intègre à la fois la théorie du handicap de Zahavi (1975) et l'hypothèse de la sélection sexuelle modulée par les parasites d'Hamilton et Zuk (1982). Les auteurs suggèrent que le compromis entre les caractères sexuels secondaires et l'immunocompétence pourrait être

régulé par la testostérone. En d'autres termes, Folstad et Karter (1992) présentent la testostérone comme une « lame à double tranchant » qui entraîne à la fois la stimulation et le maintien des caractères sexuels secondaires mais également la suppression des défenses immunitaires. Pour que cette hypothèse soit valide, trois pré-requis sont nécessaires : (i) les femelles doivent préférer les caractères sexuels secondaires les plus développés ou exagérés, (ii) ces caractères nécessitent un niveau de testostérone élevé qui (iii) présente un effet immunosuppresseur. Il a été démontré que les femelles préfèrent les mâles avec les caractères sexuels secondaires exagérés dans de nombreuses études sur la sélection sexuelle (Andersson et Iwasa 1996) et que les mâles avec un système immunitaire performant sont en mesure de résister aux effets potentiellement immunosuppresseurs de la testostérone, nécessaire au développement des caractères sexuels secondaires (Thornill et Gangestad 2006). Le pré-requis le plus discuté des trois concerne l'effet immunosuppresseur de la testostérone, proposé pour la première fois par Grossman (1985) chez les rats castrés. Depuis, de nombreuses études ont documenté le rôle immunosuppresseur de la testostérone (Peters 2000 ; Casto et al. 2001 ; Lindström et al. 2001 ; Buchanan et al. 2003 ; Mougeot et al. 2006). Cependant, les résultats d'autres études testant l'ICHH montrent des résultats ambigus sinon contradictoires. En effet, Hasselquist et al. (1999) et Ros et al. (1997) n'ont pas mis en évidence de relation entre les niveaux de testostérone et l'immunité humorale. Paz Nava et al. (2001) n'ont non seulement pas montré de lien entre la concentration des leucocytes et la testostérone chez les jeunes moineaux domestiques, *Passer domesticus*, mais en plus montrent une augmentation significative des lymphocytes avec la testostérone chez les adultes. Enfin, une méta-analyse a apporté un soutien faible à l'ICHH (Roberts et al. 2004).

Une hypothèse alternative, proposée par Braude et al. (1999), suggère une immunoredistribution plutôt qu'une immunosuppression pour expliquer le lien entre les fonctions immunitaires et les niveaux de testostérone. Les variations de testostérone auraient

donc pour conséquence la réallocation entre les différentes branches de l'immunité vers des composantes plus spécifiques, en l'occurrence l'immunité innée et locale, et ce phénomène serait rapide et réversible. Sur le plan méthodologique, on peut remarquer que cette hypothèse ne peut pas être testée en ne mesurant qu'un seul paramètre de l'immunité. A titre d'exemple, Ezenwa et al. (2012) incluent différentes composantes du système immunitaire et permettent de mettre en évidence des variations différentes en fonction de la branche de l'immunité testée.

Une autre hypothèse alternative à l'ICHH reprend le concept central de l'éco-immunologie détaillé plus haut : le compromis énergétique. Il existe un coût énergétique à la mise en place et au maintien des caractères sexuels secondaires et parce que les fonctions immunitaires et les ornements apparaissent comme coûteuses (Lochmiller et Deerenberg 2000), elles sont limitées par les ressources disponibles. L'investissement dans les caractères sexuels secondaires doit donc être négativement corrélé à l'investissement dans l'immunocompétence.

Pour mieux comprendre et tester ces hypothèses, il est donc nécessaire d'utiliser un ensemble de mesures qui caractérisent l'immunocompétence, à la fois descriptives et fonctionnelles.

5.2. Dimorphisme sexuel dans le phénotype immunitaire

Les hypothèses de Folstad et Karter (1992) vont également être reprises pour tenter d'expliquer les différences de prévalence⁴ et d'intensité⁵ parasitaires entre les mâles et les femelles. En effet, de nombreuses études et méta-analyses ont démontré que les mâles sont en général davantage parasités chez les mammifères, y compris chez les humains (Moore et Wilson 2002).

⁴ La prévalence correspond à la proportion d'animaux infectés par un agent pathogène dans une population.

⁵ L'intensité parasitaire se réfère au nombre de parasites par rapport au nombre d'individus hôtes parasités.

Le dimorphisme sexuel dans l'immunocompétence s'est donc vu offrir une place de choix dans le domaine de l'éco-immunologie (Sheldon et Verhulst 1996 ; Zuk et Stoehr 2002 ; Schmid-Hempel 2003 ; Rolff et Siva-Jothy 2004). Deux hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer cette différence : la première, énoncée plus haut, est l'hypothèse du handicap d'immunocompétence (ICHH). La seconde hypothèse, proposée par Rolff (2002) est basée sur le principe de Bateman (1948) et suggère que la différence observée dans l'immunité entre mâles et femelles résulte de leurs trajectoires d'histoire de vie différentes. Cette hypothèse, sans aucun lien avec la testostérone ou l'intervention d'autres hormones, suggère que cette différence résulterait du fait que les mâles optimisent leurs valeurs sélectives en augmentant leurs succès d'accouplement alors que les femelles optimisent leurs valeurs sélectives grâce à leur longévité du fait de l'effort reproducteur plus élevé. En conséquence, Rolff (2002) prédit que les femelles devraient investir plus dans l'immunité que les mâles.

Il apparaît donc qu'au même titre que la croissance, la reproduction ou la survie, l'immunité est coûteuse dans la mise en place, le maintien et l'activation. De plus, l'immunité semble modulée par plusieurs forces que sont le parasitisme, les ressources mais également les traits d'histoire de vie. De nombreuses hypothèses ont vu le jour pour expliquer les variations de l'immunité, en intégrant la physiologie, le parasitisme mais également les concepts de biologie évolutive. Cette thèse est donc centrée autour de certaines de ces hypothèses qui ont pour but de mieux comprendre les interactions et le rôle que jouent chacun de ces différents acteurs.

6. Objectifs de la thèse

Cette thèse se concentre donc sur le rôle que jouent le parasitisme, la condition physique et les traits d'histoire de vie sur l'immunité dans les populations de chevreuils. Les travaux sont présentés en quatre parties :

Le chapitre II évoque les méthodes communes aux différentes démarches, notamment les populations d'étude et les méthodes d'obtention des prélèvements puis les tests mis en place pour caractériser le système immunitaire du chevreuil. L'objectif était d'identifier des méthodes permettant de caractériser le système immunitaire chez le chevreuil, telles que la caractérisation des sous-populations de leucocytes à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques et de mesurer la fonctionnalité de cette réponse immunitaire, telles que la phagocytose, la prolifération lymphocytaire et l'hémagglutination-hémolyse.

Le chapitre III présente l'étude des variations des deux déterminants potentiels de l'immunité, la condition physique, mesurée à l'aide de la masse corporelle mais aussi de paramètres hématologiques et biochimiques, et le parasitisme, dans deux populations de chevreuils contrastées du point de vue de l'environnement.

Le chapitre IV de la thèse se concentre sur les variations du phénotype immunitaire. Dans un premier temps, l'objectif est de mettre en évidence le lien entre le phénotype immunitaire et la condition physique. Pour cela, de nombreuses mesures immunologiques et de la condition physique ont été utilisées, toujours dans deux populations de chevreuils contrastées. Nous avons comparé le phénotype immunitaire lorsque les individus sont dans un environnement riche ou pauvre en ressources, et en fonction de leur condition physique. Dans un second temps, nous avons étudié les relations entre caractères sexuels secondaires et le système immunitaire, en testant les hypothèses développées plus haut.

La discussion finale a permis de mettre en perspective l'ensemble des résultats.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1. Biologie du chevreuil

Le chevreuil est un mammifère du Super-Ordre des Ongulés. Les chevreuils appartiennent à l'Ordre paraphylétique des Artioctyles (un nombre pair de doigts par pied) et leurs caractéristiques digestives, comme un estomac à quatre poches de structure originale, les rattachent au Sous-Ordre des Ruminants. Enfin, le chevreuil (*Capreolus capreolus*) européen appartient à la Famille des *Cervidae* (Lecointre et Le Guyader 2006).

L'espèce est endémique et occupe la presque totalité du continent européen. Il est largement représenté de l'Atlantique à l'Oural, jusqu'en Scandinavie et en Angleterre, mais absent en Irlande. Le chevreuil est le plus petit cervidé d'Europe, caractérisé par une faible masse corporelle (18 – 30 kg) et une petite taille (env. 70 cm au garrot) avec un faible dimorphisme sexuel (Andersen et al. 1998). Au même âge et pour un même milieu environnemental, les femelles adultes pèsent généralement 2 à 3 kg de moins que les mâles. Les cervidés sont caractérisés notamment par la production annuelle de caractères sexuels secondaires, les bois, présents uniquement chez les mâles. Les bois sont des productions osseuses caduques se développant sur deux apophyses de l'os frontal : les « pivots ». Renouvelés chaque année, les bois tombent puis repoussent progressivement en deux à trois mois à partir de décembre. Lors de leur développement, ils sont appelés « en velours » car ils sont protégés par une peau richement vascularisée recouverte de poils fins. A la fin de l'hiver, le brocard (chevreuil mâle) va « frayer » ses bois, c'est-à-dire les dépouiller du velours (qui sèche et tombe en lambeaux sanguinolents) qui les recouvre pour ainsi retrouver des bois robustes et solides (Andersen et al. 1998).

Les chevreuils mâles peuvent vivre jusqu'à 14 ans et les femelles jusqu'à 17 ans en milieu naturel (Loison et al. 1999). Cependant, la survie des faons est faible et variable de la naissance jusqu'au sevrage (Plard et al. 2014), puis augmente jusqu'à 2 ans. La survie reste

assez élevée et constante pendant environ 6 ans (force de l'âge), puis diminue à partir de 8 ans (sénescence) (Gaillard et al. 1993).

Le chevreuil présente de nombreuses contraintes nutritionnelles en raison de réserves corporelles limitées, de besoins énergétiques et de coûts de reproduction importants qui le rendent très dépendant d'une alimentation de bonne qualité sur toute l'année : c'est un « *income breeder* », dont l'effort de reproduction est supporté par les ressources présentes au moment de l'effort, par opposition aux espèces « *capital breeder* » dont l'effort de reproduction est permis par les réserves accumulées précédemment (Andersen et al. 2000). Le comportement alimentaire du chevreuil est éclectique et plastique. En milieu forestier il est de type cueilleur (Andersen et al. 1998), ingérant des espèces ligneuses et semi-ligneuses herbacées, divers fruits forestiers... La quantité de nourriture hivernale disponible est l'un des principaux facteurs limitant de l'espèce (Widmer et al. 2004). Si en milieu forestier la proportion d'herbacées consommée par les chevreuils est faible, en milieu ouvert *a contrario*, elle est majoritaire voire quasi-exclusive et représente 96% du régime alimentaire (Andersen et al. 1998).

La plupart des femelles donnent naissance (en général à des jumeaux) à 2 ans. Les mâles deviennent généralement territoriaux, et donc s'accouplent, uniquement à partir de 3 ans (Andersen et al. 1998). Le rut, période de l'année durant laquelle les femelles sont sexuellement réceptives et s'accouplent, s'étend de mi-juillet à mi-août. Les brocards sont territoriaux du printemps jusqu'au rut, période au cours de laquelle leur activité et agressivité sont maximales. L'œstrus chez la chevrette ne dure que deux jours, une fois par an. Par conséquent, la fécondation doit impérativement se faire pendant cette période. Une fois l'ovocyte fécondé par le spermatozoïde, l'œuf commence à se développer pour ensuite arrêter son développement au stade blastocyte. Cette diapause embryonnaire dure environ 150 jours. L'implantation et la nidification de l'ovocyte dans la paroi utérine ne se réalisent que fin

décembre-début janvier avec une reprise du développement de l'œuf. La durée totale de la gestation est donc de 300 jours mais la gestation réelle n'est que d'environ 130 jours avec l'œuf en diapause embryonnaire le reste du temps (Andersen et al. 1998). Dans ce contexte, il est possible de s'attendre à un compromis entre l'investissement dans la reproduction et dans l'immunité, durant la période de gestation, de lactation ou encore durant le soin aux jeunes pour les femelles et durant la période de rut ou de la pousse des bois pour les mâles (revue dans Hawley et Altizer 2011).

2. Sites d'étude et captures

Les populations étudiées dans le cadre de ce travail sont celles de deux sites français dont les populations sont suivies par capture-marquage-recapture par l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage ONCFS : la réserve de Trois Fontaines et la réserve biologique intégrale de Chizé. Jusqu'en 1972, les deux sites étaient des camps militaires de dépôts de munitions durant la seconde guerre mondiale. C'est à la suite de la fermeture des dépôts militaires que les deux réserves nationales de chasse ont été créées.

2.1. Sites d'étude

2.1.1. Trois Fontaines

La réserve de Trois Fontaines (48°43'N, 4°55'E) a obtenu le statut juridique de Territoire d'Étude et d'Expérimentation (TEE) en 1991. D'une superficie de 1360 hectares (Figure 1) à 190 mètres d'altitude, la réserve est incluse dans la forêt domaniale de Trois-Fontaines qui chevauche les départements de la Marne (51) et la Haute-Marne (52). Le climat, de type continental modéré, est particulièrement propice au développement du chêne (*Quercus sp.*) et du hêtre (*Fagus sylvatica*). Les taillis, composés de charmes (*Carpinus betulus*) à 70%, et de

plantes herbacées, sont abondants. La productivité et la richesse de la végétation de la réserve de Trois Fontaines, en raison de son sol et de sa pluviométrie, offrent un milieu favorable à une espèce sélective et opportuniste comme l'est le chevreuil. La réserve de Trois Fontaines est un site de sylviculture exploité qui fait l'objet d'un aménagement forestier avec une coupe de bois.

Enfin, la population de chevreuils de Trois Fontaines présente des paramètres démographiques de très hautes performances, proches des plus élevés observés chez le chevreuil, avec un taux de survie annuel de 0.92 pour les femelles (Douhard et al. 2014).

Figure 1. Territoire d'Étude et d'Expérimentation de Trois Fontaines



© ONCFS

2.1.2. *Chizé*

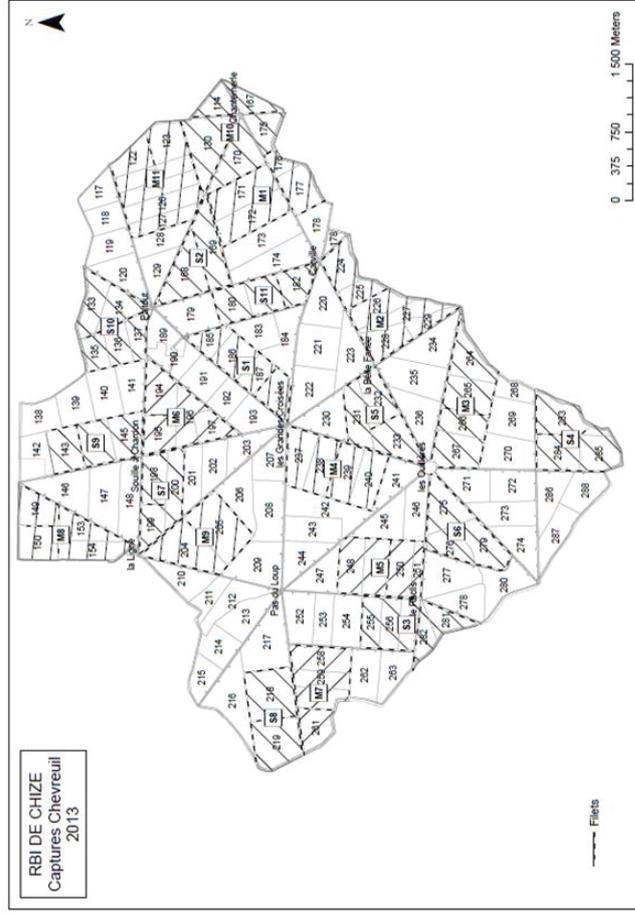
La réserve de chasse et de faune sauvage de Chizé (46°05'N, 0°25'W) a un statut juridique de Réserve Biologique Intégrale (RBI) depuis 2006. Située dans le département des Deux-Sèvres (79), la réserve de Chizé occupe une superficie de 2571 hectares (Figure 2) à une altitude comprise entre 47 et 101 mètres. Le sol est occupé par deux types de peuplements : une futaie régulière à dominante hêtre (60% de la réserve) et un taillis sous futaie (40%).

La productivité de la forêt n'est pas élevée en raison de sols pauvres et de conditions de sécheresses estivales fréquentes qui s'étendent de juin à septembre. En comparaison, la production de biomasse à l'hectare est environ deux fois plus faible qu'à Trois-Fontaines.

Le statut RBI de la réserve lui confère une obligation de laisser évoluer naturellement la végétation sans aucune coupe de bois, exploitation ou aménagement forestier d'aucune sorte.

A Chizé, en fonction des conditions environnementales, le taux de survie annuel des femelles varie entre 0.70 et 0.95 (Douhard et al. 2014).

Figure 2. (a) Plan de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé ; (b) illustration de la forêt de Chizé



© ONCFS



© Nicolas Lieury

2.2. Captures

Les deux populations de chevreuils sont intensivement suivies par la méthode de capture-marquage-recapture depuis 1975 pour Trois Fontaines et 1977 pour Chizé. Durant la période de ma thèse, entre 8 et 12 jours de captures ont été organisés de Décembre à Mars par les agents de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS ; M. Gilles Capron pour Chizé et M. Claude Warnant pour Trois Fontaines) sous la supervision de M. François Klein (responsable du CNERA Cervidés - sanglier).

Les captures de chevreuils sur les deux sites monopolisent entre 100 et 250 personnes (ONCFS et volontaires) pour chaque journée de capture. Les deux sites sont découpés en secteurs afin de permettre un échantillonnage aléatoire des secteurs durant la capture. Néanmoins, dans une volonté de maximiser les recaptures et dans le cadre d'un travail de recherche spécifique (suivi des femelles avec collier GPS pour le succès reproducteur par exemple), certaines parcelles font l'objet d'un suivi obligatoire. De nombreux programmes de recherche dépendent de ces captures, principalement sur la dynamique des populations, l'alimentation mais également des programmes de surveillance sanitaire de la faune sauvage. Les secteurs et parcelles pour la traque du matin et de l'après-midi sont choisis en prenant en compte plusieurs composantes: le nombre de participants présents sur place, le temps imparti, les conditions climatiques... environ 85% des parcelles sont visitées au cours de la saison de capture.

Par la suite, 2,5 km de filets sont placés autour de la parcelle sélectionnée. La traque consiste à déloger et rabattre les chevreuils dans les filets. Les chevreuils capturés sont placés dans des sabots (Figure 3) et transportés afin d'être manipulés. La manipulation d'un chevreuil dure environ 15 minutes et plusieurs mesures sont effectuées. Dans un premier temps, l'animal est pesé, sexé puis une prise de sang est réalisée au niveau de la veine jugulaire (Figure 4) externe sur les animaux d'âge connu (c'est-à-dire ceux ayant été capturés durant leur première année).

La prise de sang est effectuée avec une seringue de 20 ml à embout Luer excentré (REF TERUMO® SST20ES) et une aiguille de diamètre 1.0 mm et d'une longueur de 30 mm (REF TERUMO® NN-1030R). Le sang est ensuite immédiatement réparti dans les différents tubes selon un ordre d'importance préétabli.

Ainsi, les tubes sont remplis de la façon suivante, par ordre de priorité, en retirant l'aiguille de la seringue et le bouchon des tubes:

1. 1 ou 2 Tubes violet EDTA (volume : 4 ml ; additif : 7.8 mg K2-EDTA; concentration de l'additif : 1.95 mg/ml; REF TERUMO® VF-054SDK) remplis à moitié (environ 2 ml) pour l'hématologie et le volet cellulaire de l'immunité (numération formule sanguine et typage leucocytaire)
2. 1 ou 2 tubes rouge gélose (volume : 8 ml ; additif : gel + clotactivator ; REF TERUMO® VF-108SAS) remplis en entier (env. 8 ml) pour obtenir du sérum à partir duquel il est possible de doser différentes molécules reflétant la physiologie et l'immunologie (volet humoral)
3. Tube vert hépariné (volume : 4 ml ; additif : 60 USP.U. Lithium Heparin; concentration de l'additif : 15 USP.U./ml ; REF TERUMO® VF-054SHL) rempli à moitié (env. 3-4 ml) pour l'étude du stress et de la sénescence.

Les tubes avec des anticoagulants sont retournés une dizaine de fois délicatement afin d'éviter la formation de microcaillots de sang.

Un étalement sanguin sur lame est effectué sur place à l'aide d'une goutte de sang issue d'un tube EDTA. Une goutte de sang est disposée à environ 1 cm du bord de la lame. La tranche d'une seconde lame qui sert d'étaleur est disposée au contact de la lame à environ 45°. La goutte est étalée le long de l'arête sur la lame par un mouvement rapide et régulier lorsque l'étaleur est poussé (Figure 5).

Figure 3. Sabots qui permettent de transporter les chevreuils du lieu de capture au lieu de manipulation

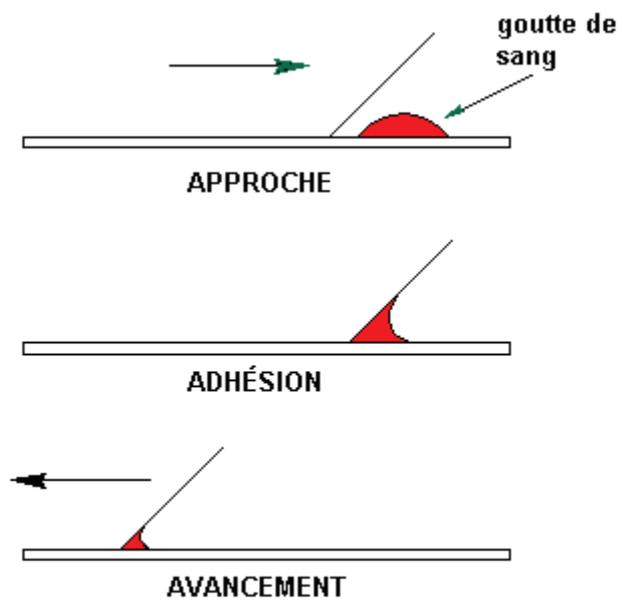


Figure 4. Prise de sang.

Prélèvement sanguin à la veine jugulaire sur un chevreuil (*Capreolus capreolus*) à Trois Fontaines (en haut) et à Chizé (en bas)



Figure 5 : Principe de l'étalement sanguin (Smith 2008)



Pendant ce temps, différentes manipulations sont effectuées sur le chevreuil. Lorsque l'animal est un chevillard de l'année capturé pour la première fois, il est marqué à l'aide de boucles auriculaires afin d'être identifié et suivi lors de captures futures. La pose des boucles auriculaires permet également la récupération d'un échantillon de tissu pour l'identification ADN. Les fèces, ou « moquettes », sont prélevées directement au niveau du rectum de l'animal (Figure 6). Deux prélèvements d'une dizaine de moquettes sont réalisés. L'un des prélèvements permet l'étude du régime alimentaire et l'autre, dans le cas de notre étude, permet de rechercher les oeufs et larves de parasites. L'identification et le prélèvement des tiques se fait au niveau de la tête par palpation et visualisation des parasites, ce qui permet d'obtenir une information sur le parasitisme externe. Lorsqu'elles sont présentes, les tiques sont alors comptées et prélevées dans des tubes préalablement remplis d'alcool à 70°, permettant la recherche d'agents pathogènes ou l'identification des espèces de tiques présentes.

Les individus sont relâchés dans la parcelle où ils ont été capturés. Les prélèvements dans le cadre de notre étude ne sont effectués que sur des animaux d'âge connu. L'ensemble des informations de capture sur les deux sites est relevé sur une fiche de renseignements (Annexe 1) validée lors de réunions du laboratoire de Biométrie et de Biologie Évolutive (LBBE)/ONCFS.

Par la suite, les échantillons, conservés au frais (4°C), sont acheminés sur Lyon en moins de 24h pour Trois Fontaines et en 24-48h pour Chizé. Les échantillons sont ensuite répartis comme suit : les tubes rouges, un tube vert et un tube violet ainsi que les lames sont acheminés à VetAgro-sup afin d'y effectuer les mesures hématologiques et biochimiques (électrophorèse, dosage des protéines, coloration de lames). Le second tube violet, lorsqu'il a pu être fait, est acheminé à l'INSERM (U851) afin d'y effectuer des mesures d'immunocompétence. Les moquettes sont apportées au LBBE de l'Université Lyon 1

(UCBL) puis transférées dans un laboratoire de parasitologie pour la mise en évidence de parasites (méthodes de McMaster (Raynaud 1970) et Baermann (1917)). Jusqu'en 2013, le laboratoire de parasitologie était l'EA4688 VECPAR de l'Université de Reims (responsable : Hubert Ferté), depuis 2014 il s'agit du laboratoire de VetAgro-sup et de l'UMR 5558 (responsable Gilles Bourgoïn).

Dans le cadre de cette thèse, j'ai participé à l'ensemble des campagnes durant les hivers 2011-2012, 2012-2013 sur le site de Trois Fontaines où j'ai effectué les captures de chevreuils, l'ensemble des prises de sang et participé aux prélèvements de moquettes. J'ai également été présent, mais de manière plus sporadique, à quelques dates dans les campagnes de captures de chevreuils à Chizé. De plus, même si l'ensemble des coproscopies a été réalisé par Hubert Ferté, j'ai pu, au cours de ma thèse, être formé aux méthodes de McMaster et Baermann (par Hubert Ferté) au sein du laboratoire de parasitologie EA4688 VECPAR.

Figure 6. Prélèvement de moquettes.

Matière fécale (5-10 g) prélevée directement *per rectum* sur un chevreuil (*Capreolus capreolus*) à Trois Fontaines



3. Caractérisation de l'immunité chez le chevreuil

Compte-tenu du développement récent de l'éco-immunologie, les méthodes disponibles pour caractériser le système immunitaire dans des populations sauvages sont encore peu nombreuses, surtout lorsque l'objectif est d'approcher simultanément plusieurs aspects de l'immunité et de prendre en compte au mieux les contraintes des études de terrain (accessibilité des populations, problèmes de conservation des échantillons entre le terrain et le laboratoire).

3.1. Quels types de mesures ?

Pour mesurer l'immunocompétence, Norris et Evans (2000) ont distingué deux types de mesures de l'immunité : les tests descriptifs, qui consistent à mesurer le niveau de présence d'un composant immunitaire et permettent d'avoir une mesure de l'état de l'immunité d'un individu à un instant t , et les tests fonctionnels, qui sont basés sur l'observation d'une réaction vis-à-vis d'une stimulation expérimentale de l'immunité, et permettent donc d'accéder à une composante essentielle du système immunitaire, la réponse immunitaire face à un nouvel agent pathogène. Les tests descriptifs ont l'inconvénient d'être largement dépendants de l'histoire des individus et des antigènes rencontrés, tandis que les tests fonctionnels reflètent davantage le fonctionnement et l'efficacité de l'immunité en présence d'une nouvelle stimulation et donc l'immunocompétence.

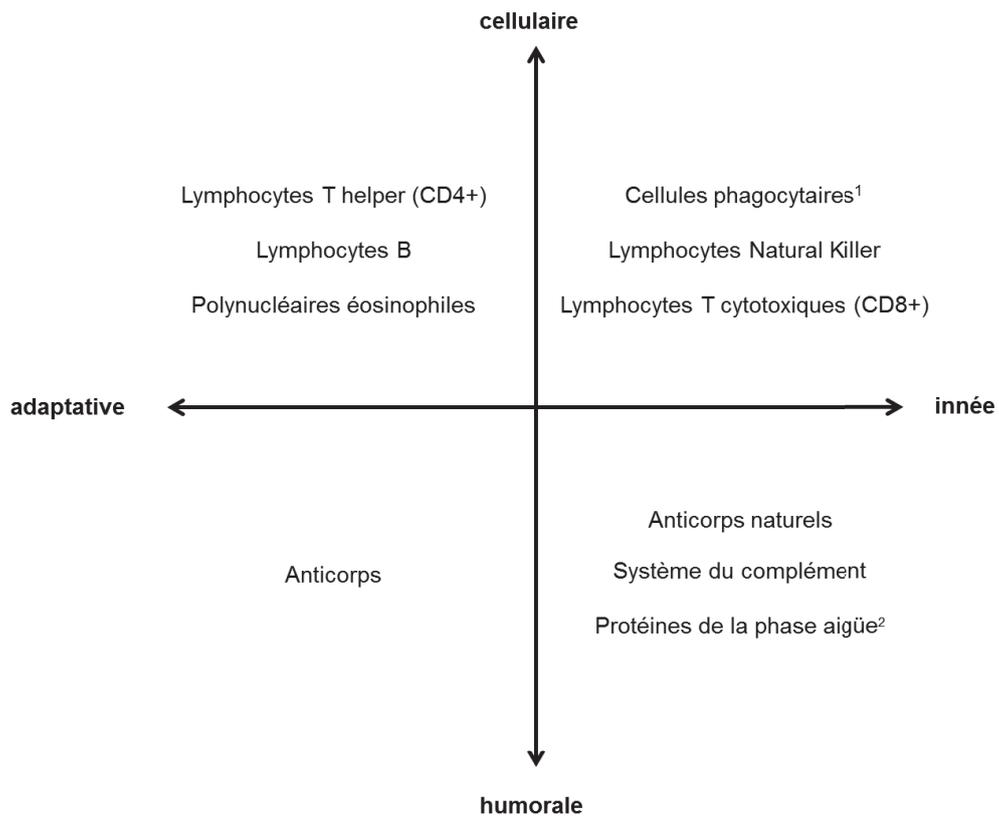
3.2. Que mesurer ?

Une analyse de l'immunité, qu'elle soit descriptive ou fonctionnelle doit prendre en compte la complexité des nombreuses voies immunitaires. Afin d'éviter une vision trop simplifiée du système immunitaire dans le cadre de l'éco-immunologie, Schmid-Hempel et Ebert (2003) proposent un modèle conceptuel qui permet de classer les composantes des défenses

immunitaires en quatre quadrants. Nous nous proposons, dans le cadre de nos études, d'adapter ce modèle conceptuel (Figure 7).

La première dimension se réfère à la tactique d'utilisation de la réponse immunitaire (dimension « innée-adaptative »). L'immunité innée correspond à la première ligne de défense contre les agents pathogènes, elle est mobilisée sans contact préalable avec l'antigène, tandis que l'immunité adaptative qui se met en place uniquement après qu'un agent pathogène soit reconnu est plus tardive, mais plus spécifique, très efficace et peu coûteuse. La seconde dimension se réfère aux constituants de la réponse immunitaire, avec d'un côté les réponses de nature humorale (production de molécules efficaces contre les agents pathogènes, notamment dans le sérum) et de l'autre les réponses cellulaires, faisant intervenir des cellules, telles que les lymphocytes B et T.

Figure 7. Modèle conceptuel des composantes des défenses immunitaires (adapté de Schmid-Hempel et Ebert 2003)



¹ polynucléaires neutrophiles, monocytes/macrophages

² protéine C-réactive, céruplasmine, protéine sérum amyloïde A, haptoglobine

3.3. Comment mesurer ?

Plusieurs tests existants permettent d'accéder à certaines composantes de ce schéma. Par exemple, la méthode de numération et formule sanguine permet de connaître la concentration et la distribution de l'ensemble des globules blancs sanguins. L'intérêt de ces tests classiques est de pouvoir comparer les résultats avec ceux d'études antérieures et de parfois, disposer de valeurs de référence pour les animaux en bonne santé. En revanche ils ne rendent pas compte de tous les aspects de l'immunité, surtout sous l'angle fonctionnel. De plus, chez le chevreuil aucune méthode n'a fait l'objet d'une validation pour cette espèce en particulier.

Dans cette étude, nous avons combiné des mesures descriptives qui, même si elles n'avaient pas été régulièrement utilisées pour le chevreuil, étaient utilisables sans mise au point, et des mesures descriptives et fonctionnelles pour lesquelles un travail de mise au point préalable était nécessaire.

Concernant les mesures descriptives utilisables sans mise au point spécifique pour le chevreuil, nous avons mesuré l'immunité cellulaire en utilisant la numération et formule sanguine. Elle permet, dans un premier temps de mesurer la concentration sanguine en globules blancs (ici par impédance à l'aide d'un automate d'hématologie), puis d'estimer la concentration des cinq sous-populations de leucocytes, notamment ceux intervenant dans l'immunité cellulaire innée (polynucléaires neutrophiles et monocytes en particulier) et dans l'immunité adaptative (éosinophiles et lymphocytes, ces cellules intervenant aussi dans l'immunité innée) par reconnaissance morphologique sous un microscope, après une coloration au Wright-Giemsa.

Concernant l'immunité humorale, nous avons utilisé des méthodes employées en pathologie clinique vétérinaire. Un dosage des protéines totales à l'aide d'un réfractomètre, suivi d'une électrophorèse, permettent de séparer les principaux groupes de protéines sériques, notamment les alpha-2 globulines (protéines de la phase aiguë, donc immunité humorale

innée) et les gammaglobulines (constituées essentiellement d'immunoglobulines G ou anticorps, donc de protéines de l'immunité adaptative humorale). Ces tests classiques ont été effectués en collaboration avec le plateau technique Biovelys de VetAgro-sup qui dispose des automates d'hématologie et de biochimie vétérinaire, avec une participation personnelle notamment pour la lecture des lames sanguines (334 lues sur 621).

Pour mieux caractériser le reste des composantes du système immunitaire, nous avons également dû adapter chez le chevreuil des tests descriptifs et fonctionnels. Ces tests sont présentés ci-dessous en commençant par ceux dont la mise au point est la plus aboutie. Parmi les tests fonctionnels, le test d'hémagglutination-hémolyse (proposé par Matson et al. 2005 chez les oiseaux) avait été adapté chez les mammifères avant cette thèse (Gilot-Fromont et al. 2012) et a été utilisé pour tous les chevreuils analysés dans l'étude.

Parmi les tests descriptifs, il est essentiel de pouvoir séparer les sous-populations lymphocytaires, puisque les lymphocytes participent à des fonctions différentes au sein de l'immunité, notamment innées et adaptatives. L'association de l'immunofluorescence et de la cytométrie en flux est devenue un élément clé dans l'étude des systèmes biologiques, surtout dans la discrimination entre cellules d'une population hétérogène. En effet, l'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre des composantes membranaires spécifiques permet de distinguer des sous-populations lymphocytaires après purification (protocole de purification en annexe 2). Ces dernières années, les techniques d'identification et de caractérisation des antigènes (Ag) de surface des lymphocytes ont progressé très rapidement. Cependant, il n'existe pas actuellement d'anticorps monoclonaux spécifiques du chevreuil, c'est pourquoi nous avons testé différents anticorps disponibles au laboratoire, qui peuvent être utilisés si la réactivité croisée entre espèces est suffisante. Dans ce but, des anticorps disponibles pour l'homme, la souris, le porc et le mouton ont été testés sur le sang de chevreuil. Tout d'abord, j'ai réalisé plus de 333 extractions de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) en

suivant le protocole de purification (annexe 2) dans les locaux et encadrés par le personnel de l'INSERM (U851) avec qui nous avons collaboré. Par la suite, plus de 22 anticorps monoclonaux différents ont été testés sur les PBMC de chevreuil afin de tester leur cross-réactivité. Les premiers résultats sur la cross-réactivité des anticorps sont décrits ci-dessous. Enfin, deux autres tests fonctionnels ont fait l'objet de tests préliminaires qui sont décrits ci-dessous, mais les mises au point n'étaient pas suffisamment avancées pour appliquer ces méthodes à l'ensemble des prélèvements : il s'agit des tests de prolifération lymphocytaire et de phagocytose.

4. Test fonctionnel d'hémagglutination-hémolyse

4.1. Les anticorps naturels et le complément

L'immunité innée humorale comprend la fraction non-spécifique du système immunitaire humoral, représenté notamment par les anticorps naturels, dont une part importante d'immunoglobuline de classe M (IgM, Boes 2010), et par le complexe lytique du complément. Ces deux effecteurs agissent dans les premières phases de l'immunité innée. En effet, ils se développent avant l'exposition à un agent pathogène et ne visent pas un agent pathogène spécifique ou un antigène particulier (Ochsenbein et al. 2000). La présence et les niveaux des anticorps naturels ne sont pas dus à l'exposition antérieure d'un pathogène mais sont cependant corrélés à la capacité de l'organisme à produire des anticorps après une stimulation (Matson et al. 2005).

Récemment, Matson et al. (2005) ont développé un test simple, le test d'hémagglutination-hémolyse (HAHL) qui permet de mesurer l'activité du complément ainsi que des anticorps naturels à partir du sérum ou du plasma chez des oiseaux. Ce test a été adapté pour être utilisé chez les mammifères, en modifiant l'antigène utilisé et la température des réactions (Gilot-

Fromont et al. 2012). La réalisation du test dans plusieurs espèces montre que des variations importantes existent entre carnivores, omnivores et herbivores, mais aussi entre populations et entre individus (Gilot-Fromont en préparation). Chez le sanglier *Sus scrofa*, Rossi et al. (2013) montrent un lien entre l'immunité innée humorale mesurée par le test H AHL, le risque d'infection virale et la probabilité de résistance à cette infection. Dans le cadre de l'éco-immunologie, plusieurs études apportent un soutien au compromis associé à cette composante de l'immunité. Mauck et al. (2005) ont montré qu'il existait une corrélation négative entre les niveaux d'anticorps naturels et le taux de croissance chez les Océanites cul-blanc, *Oceanodroma leucorhoa*. Møller et Haussy (2007) ont montré une diminution de la capacité à agglutiner (mais pas à lyser) avec l'augmentation de la longueur de la queue chez l'hirondelle rustique, *Hirundo rustica*.

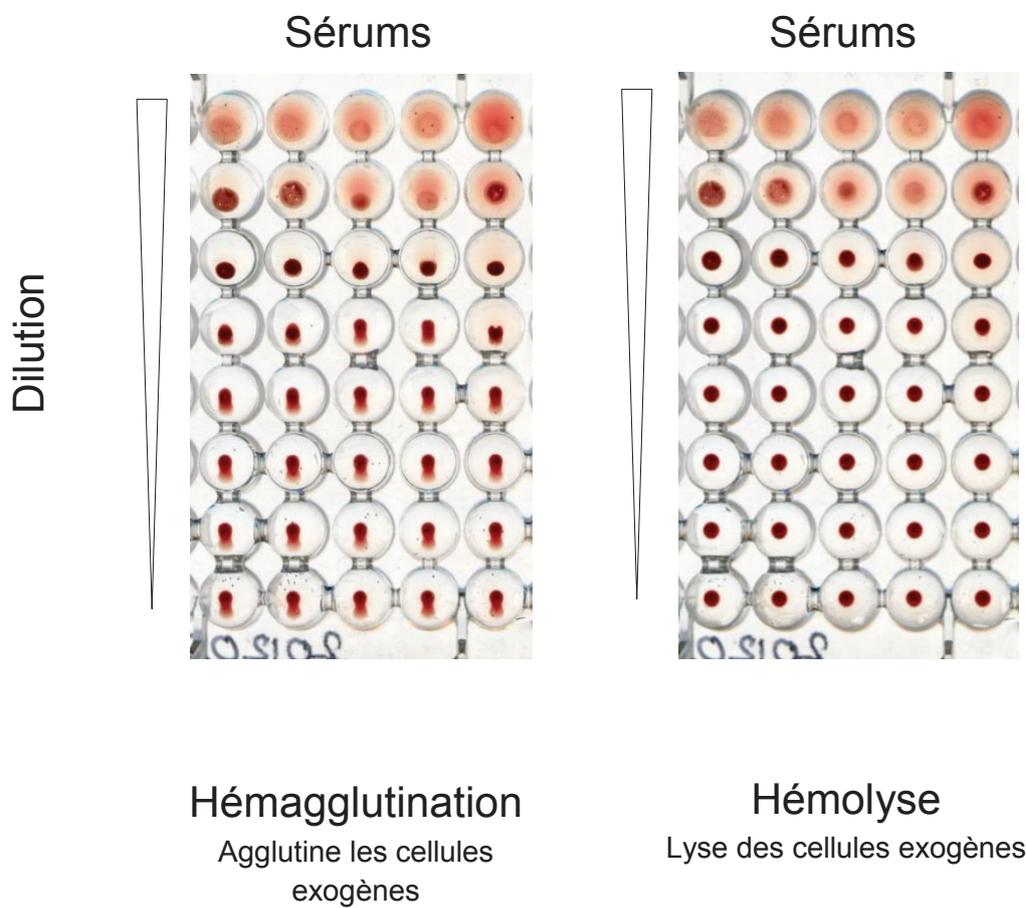
4.2. Principe du test

Le test d'héماغglutination-hémolyse est un test fonctionnel qui permet de mesurer la capacité du sérum à agglutiner et à lyser un antigène avec lequel l'individu n'a pas été précédemment en contact, ici des globules rouges purifiés d'une autre espèce. L'agglutination est due à la reconnaissance de l'antigène par les anticorps naturels : ces anticorps pentamériques forment avec les cellules reconnues un réseau visible sous la forme d'un voile d'agglutination (HA en $-\log_2(\text{dilution})$). L'hémolyse (HL en $-\log_2(\text{dilution})$) révèle l'action du complément qui est activé par le complexe antigène-anticorps et lyse les hématies. Celles-ci libèrent l'hémoglobine dont la concentration permet de mesurer la réaction. En immunologie, les globules rouges purifiés de différentes espèces sont utilisés comme antigène pour créer un test utilisable indifféremment chez tous les mammifères. Ici, nous avons utilisé des globules rouges de poule (voir protocole Annexe 3). La capacité à agglutiner et à lyser est mesurée en utilisant une gamme de dilution du sérum, la dernière dilution qui présente la réaction recherchée détermine le score d'agglutination et de lyse (Figure 8). Les tests H AHL ont été

réalisés pour tous les chevreuils étudiés dans ce travail, à l'UMR 5558 LBBE par Corinne Régis, Emmanuelle Gilot-Fromont et moi-même en fonction des années.

Figure 8. Résultats de tests d'agglutination (à gauche) et d'hémolyse (à droite).

Les dilutions successives de sérum sont présentées en colonnes (dilution $\frac{1}{2}$, puis $\frac{1}{4}$, etc), chaque colonne représente un individu et les témoins négatifs sont en bas. Par exemple, pour le sérum placé à droite dans les deux plaques, l'agglutination est visible jusqu'à la 4^{ème} dilution et la lyse jusqu'à la 2^{ème}.



5. Characterization and variation of leucocytes subsets in roe deer (*Capreolus capreolus*) in two different populations (Article 1)

Maël Jégo^{1,2,*}, Sophia Djebali³, François Klein⁴, Jacqueline Marvel³, Gilles Bourgoïn^{1,2},
Emmanuelle Gilot-Fromont^{1,2}

Manuscrit en préparation

¹ *Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France*

² *Université de Lyon, VetAgroSup, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France*

³ *Université de Lyon, INSERM, U851, 21 Avenue Tony Garnier 69365 Lyon Cedex 07, France*

⁴ *Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Centre National de Recherches Appliquées sur les Cervidés-Sanglier, 1 Place Exelmans, F-55000 Bar-le-Duc, France*

* Author for correspondence: M. Jégo, E-mail: mael.jego@vetagro-sup.fr or jego.mael@gmail.com

5.1. Abstract

In this study we aimed to characterize the immune system in roe deer (*Capreolus capreolus*) in two different populations (Trois Fontaines and Chizé) and investigate the hypothesis that variation may occur according to age, sex and resources. Peripheral blood mononuclear cell populations were analyzed using immunofluorescence and flow cytometry techniques. The percentage of cells expressing population markers CD3, CD4, CD8, CD14 and IgM were analyzed in relation to age, sex and site. We found a higher percentage for young individuals than adults for CD8 and IgM and the opposite for CD3 and CD4. Only monocytes markers CD14 showed a higher percentage at Trois Fontaines than at Chizé. No differences were observed in cell surface markers in relation with sex. This study showed for the first time the cross-reactivity with monoclonal antibodies and roe deer leucocytes subsets cells, and consequently the characterization of immune system in roe deer. On the contrary of our expectation, we found no variation with sex. However, in accordance with our hypothesis, we found statistically significant variations in cell surface markers with age and site suggest variation strategy in immune function in the context of populations dynamics.

5.2. Introduction

Eco-immunology focused on the variation of immunocompetence to explain difference in parasitic load in host in a context of life-history theory (Sheldon and Verhulst 1996; Demas and Nelson 2011). Since the publication of Hamilton and Zuk's (1982) on the role of parasites in sexual selection, many studies investigated a trade-off between investment in life-history components and infection by parasites, leading to the study of immune defense by host (Norris and Evans 2000). However, the contribution of the host immune response or protective immunity against pathogens remains to be characterized. Moreover, variation of immune system in the wild remains unknown or partially known.

Among the numerous cells that constitute the immune system, peripheral leucocytes, and particularly mononuclear cells (lymphocytes and monocytes), are particularly relevant, being central in numerous innate and adaptive immune processes. These cells (peripheral blood mononuclear cells or PBMC) are also easily sampled in captured individuals, and thus represent one of the most widely studied compartments of immunity. The distribution of leucocytes subsets, associated to the measurement of the capacity of cells to respond to challenges, are key steps towards a better understanding of the immune system of wild-living hosts.

To discriminate between cells in a heterogeneous cell population, the use of immunofluorescence and flow cytometry has developed rapidly. In recent years, the identification and characterization of antigens surface cells to discriminate PBMC grew up very quickly. Many monoclonal antibodies, developed in other species, were tested in deer species, including reindeer (Waters et al. 2006), to distinguish subsets of leucocytes. However, no study has targeted the roe deer, a common species in Europe. The roe deer is a relevant biological model to analyze the variations of immune parameters in a variable environment. Using samples from roe deer captured in two contrasted sites, we analyzed the

variations of the distribution of PBMC subsets. The distribution of leucocyte subsets can first be predicted to vary with age, with innate functions being prominent in young individuals, while adults should experience a progressive development of adaptive immunity. Moreover, when resources are limited, individuals are predicted to allocate less to immune functions, i.e., to down-regulate immunity in general and costly functions in particular (Lee 2006). This should be the case when individuals live in a poor environment, such as in the roe deer population of Chizé, compared with Trois Fontaines (Gilot-Fromont et al. 2012). Moreover, the proportion of leucocyte subsets could be compromised by the male hormones, i.e. testosterone, and led to an immunosuppression in males (Folstad and Karter 1992; Ezenwa et al. 2012).

The first aim of this study was to define a set of relevant monoclonal antibodies to analyze composition of leucocytes subsets of roe deer. The second aim was to investigate variations of leucocytes subsets among individuals in two populations of roe deer. We expected (i) PBMC composition should vary with age, with a shift towards adaptive immunity in adults compared to young individuals; (ii) males should show less immune cells proportions than females; (iii) individuals living in a poor environment should have less costly immune functions than others.

5.3. Material and methods

5.3.1. Study sites and data collection

We used data from two contrasting populations of European roe deer. Both sites are enclosed forests managed by the Office National des Forêts, in which roe deer populations have been monitored by the Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage since three decades.

The Réserve Biologique Intégrale of Chizé is a 2,614-ha enclosed forest located in western France (46°05'N, 0°25'W). This site has a temperate oceanic climate and the forest has a low

productivity due to poor soil and offers a poor habitat quality to roe deer. In contrast, the Territoire d'Etude et d'Expérimentation of Trois Fontaines (1360 ha), located in North-Eastern France (48°43'N, 4°55'E), has a continental climate and a high quality soils, offers a high habitat quality to roe deer.

During winter 2013, roe deer were caught using drive netting. We recorded antler size, the exact age of males captured (when marked as newborn or at 8 months of age), blood samples were collected at the jugular vein.

5.3.2. *Flow cytometry immunophenotyping*

Isolation of cervine cells

After collecting whole blood into vacuum blood tube, cervine roe deer PBMC were isolated using a gradient of Ficoll® (lymphocyte cells separation e.g. Eurobio # CMSMSL 01-01, density: 1.077 ± 0.001), according to the manufacturer's instructions. Cells were washed in RPMI (Invitrogen, RPMI + 6% FCS (SVF) + 0.01M HEPES + 2mM Glutamine + 50µg/mL Gentamycine + 50µM βmercaptoethanol) and resuspended at the final concentration of 2×10^6 cells/mL in FBS – DMSO (Fetal Bovine Serum – DiMethyl SulfOxide).

Monoclonal antibodies and cell subsets

The monoclonal antibodies used in this study to test the cross-reactivity were directed against CD3 (lymphocytes), CD4 (lymphocytes T CD4+), CD8 (lymphocytes T CD8+), CD11 (leucocytes), CD14 (monocytes), CD16 (natural killers, macrophages), CD19 (B cells), CD21 (B cells subset, dendritic cells), CD45 (leucocytes) and IgM (activated lymphocytes B). A full list of all clones tested, the target species and the companies can be found in Table 1. Most of the tested antibodies are specific to species, such as cattle, sheep or goat surface markers but some had been shown to cross-react with cervine cell surface markers in previous studies

(Buchan and Griffin, 1990; Davis et al. 1996; Waters et al. 2000, 2004; Robinson et al. 2008, 2010).

The leucocytes subsets detected represent various arms of immunity: monocytes (CD14) are mobilized during innate cellular response, and are thus considered as a costly and innate arm. Lymphocytes T CD8+ are also involved in cellular responses and thus in costly immunity. On the contrary, CD4 (lymphocytes T CD4+) reveal adaptive functions, including the production of antibodies, one of the functions that are less costly for a following challenge (Klasing 2004). IgM are the first class of antibodies that are produced in the course of the adaptive response, and are thus expected to be produced at the beginning of this response.

Single-color flow cytometry

To screen for cross-reactivity, tubes containing approximately 2×10^6 cells/mL in RPMI were centrifuged and incubated for 30 min at 4°C in the dark with each of the primary monoclonal antibodies (Table 1; dilution 1/100). After being washed, cells that were incubated with nonlabeled primary monoclonal antibodies (dilution 1/100) were incubated with the conjugated 20 min at 20°C in the dark. After being washed, cells were resuspended in 100 µl of RPMI.

Finally, 80 µl of each tube were analyzed using a FACS Accuri flow cytometer and FlowJo software.

5.3.3. Statistical analysis

To access variation in the distribution of leucocyte subsets, we included the proportion of each leucocyte subset at a time as the response variable. We first considered that the time between blood sampling and isolation of PBMC may have influenced the mortality of cells, we thus included period (that varied between 24 and 120 hours) as a control variable in all models. We first fitted several age-dependent models to determine the pattern of age-specific

changes of leucocytes subsets (see Table 2 for details). For each variable, we then fitted all models including age (as selected in the previous analysis), site, sex and two-way interactions among age, sex and site. The model with the lowest AIC was selected. When two competing models had a difference in AIC less than 2, we retained the model with the lowest number of parameters to satisfy the parsimony criterion (Burnham and Anderson, 2002).

5.4. Results

Freshly isolated cervine PBMC were used to validate the cross-reactivity of human, mouse, pig and ruminants monoclonal antibodies listed in Table 1. Cross-reactivity was observed with monoclonal antibodies directed against CD3, CD4, CD8, B cells, CD14, IgM (Figure 1), and not for other monoclonal antibodies.

We analyzed leucocytes subsets from 112 individuals including 60 from Trois- Fontaines (with 33 females and 27 males) and 52 from Chizé (with 32 females and 20 males). Mean (in percentage) \pm standard deviation and variance for each leucocytes subpopulations were: CD3: mean = 20.86 ± 0.82 , variance = 74.41; CD4: mean = 17.46 ± 0.51 , variance = 29.83; CD8: mean = 32.11 ± 0.61 ; variance = 42.76; CD14: mean = 2.61 ± 0.27 , variance = 8.22; IgM: mean = $26.05 \pm 1.1.3$, variance = 144.35. Moreover, we found a statistically significant effect of period on leucocytes populations for CD3 ($\beta = 0.15 \pm 0.05$; $p < 0.001$), CD8 ($\beta = 0.04 \pm 0.02$; $p = 0.046$), CD8 ($\beta = 0.03 \pm 0.008$; $p < 0.001$) but not for CD4 ($\beta = -0.006 \pm 0.01$; $p = 0.735$) and IgM ($\beta = -0.05 \pm 0.04$; $p = 0.207$).

As expected, the distribution of leucocytes subsets varied with age and site, but no effect of sex was observed. For CD3, the best model included period and age as a continuous variable. We found an increase of the proportion of CD3 with increasing age ($\beta = 0.24 \pm 0.24$, Figure 2). For CD4, CD8 and IgM, the best model included period and age in two classes, young animals versus adults animals. Compared to young individuals, adults had a higher proportion of CD4 (difference of $6.40 \pm 1.06\%$, Figure 3) but lower proportions of CD8 and IgM

(differences of 5.42 ± 1.35 and 17.14 ± 2.13 respectively, Figure 3). For CD14/monocytes, the best model included period and site with a higher concentration at Trois Fontaines than at Chizé (difference of 0.61 ± 0.50 , Figure 4). In each case, no interaction occurred for any leucocytes subsets.

Figure 1. Percentage of leucocytes subsets expressing cell activation markers CD3, IgM, CD14, B cells (A), CD3+CD4+ (B) and CD3+CD8+ (C) in one individual. (A) Show the percentage of leucocytes subsets expressing cell activation marker CD3, IgM, CD14 and B cells. Other cells were not characterized because of any cross-reactivity with monoclonal antibodies. (B) Show the percentage of CD3+ / CD4+, means lymphocytes with CD3 marker and also CD4 markers. Other cells were CD3 - / CD4 -. This figure represents a percentage for only one individual. (C) Show the percentage of CD3+ / CD4+, means lymphocytes with CD3 marker and also CD8 markers. Other cells were CD3 - / CD8 -. This figure represents a percentage for only one individual.

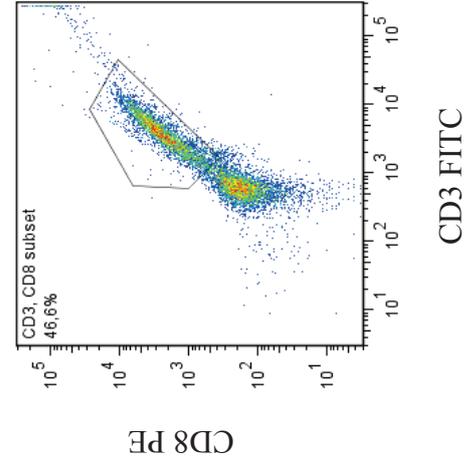
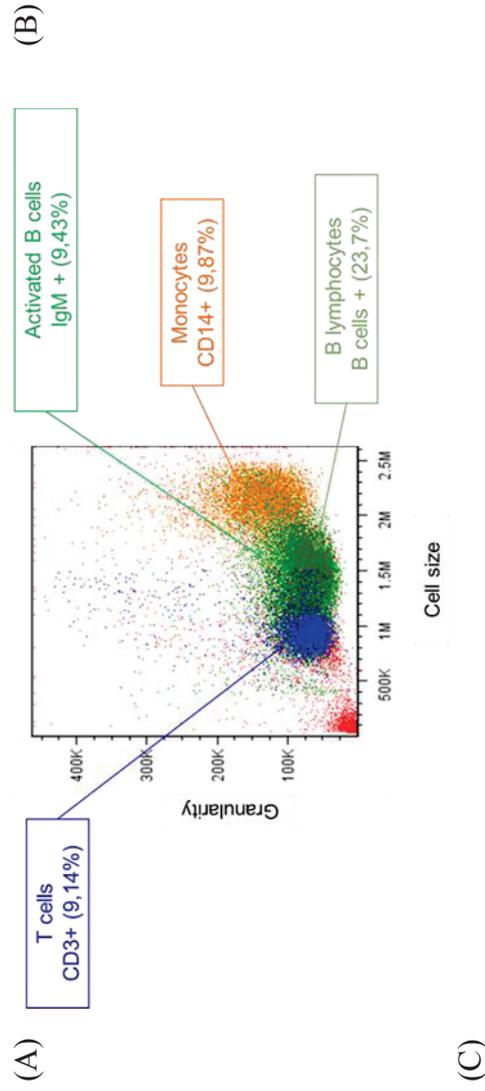


Figure 2. Age-related variation in percentage of CD3 (lymphocytes) with predictions based on the model selected by AIC. Dots correspond to observed values per age, full black line corresponds to the predicted values and dotted black lines correspond to standard errors.

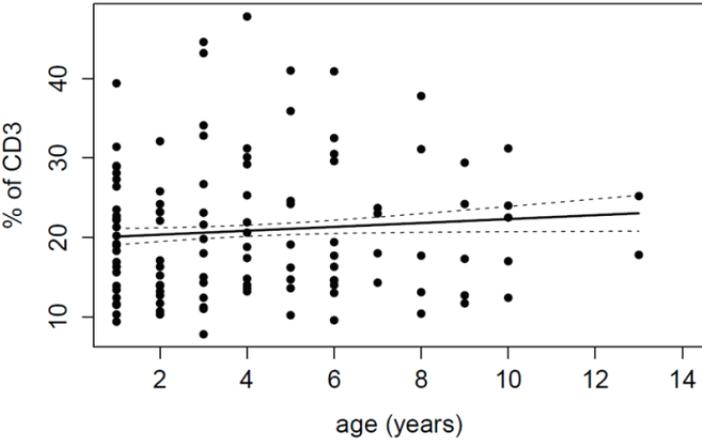


Figure 3. Age-related variation in percentage of CD4 (lymphocytes T CD4+), CD8 (lymphocytes T CD8+) and IgM (B cells activated) with predictions based on the model selected by AIC. Dots correspond to the average value for each class of age with Y (young animals) versus A (adult animals) (adult animals), black lines correspond to standard errors.

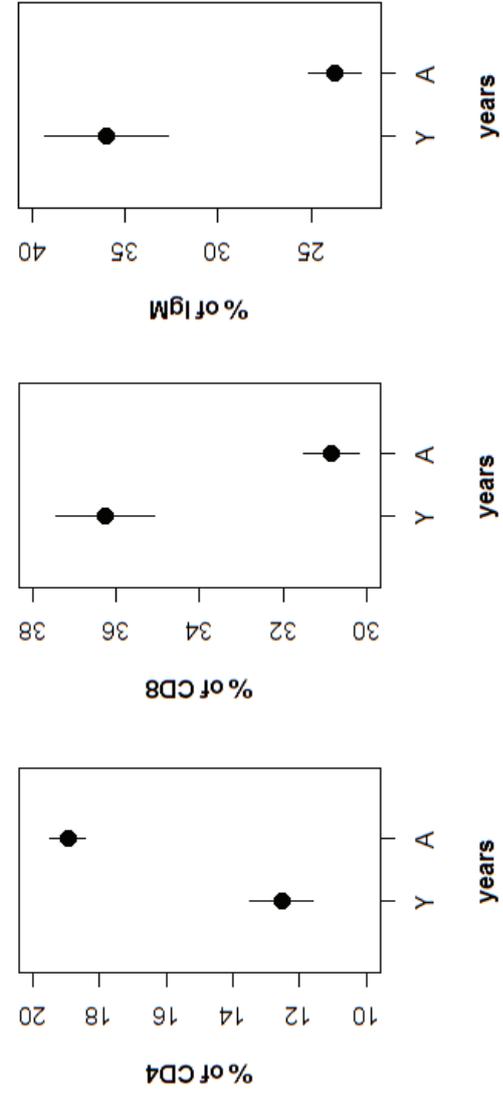
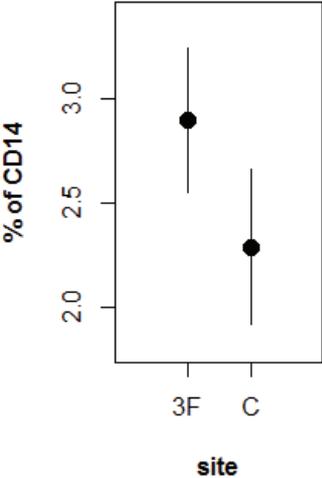


Figure 4. Site-related variation in percentage of CD14 (monocytes) with predictions based on the model selected by AIC. Dots correspond to the average value for each class of age with 3F (Trois Fontaines) versus C (Chizé), black lines correspond to standard errors.



5.5. Discussion

While many studies investigated the immune response of mammal after a specified antigen exposure or during disease course, few have been carried out to investigate the variation of the immune system, of clinically healthy individuals in wild-living populations, even less in deer. Such investigations represent a first step towards a better understanding of the variability of host susceptibility within and among populations. We first determined the cross-reactivity of several monoclonal antibodies between pig, mouse or human and cervine leucocytes. These tools may now be used to quantify and sort various PBMC subsets that may be further characterized and challenged, for example to measure the capacity of phagocytosis. This characterization also allowed us to analyze the distribution of PBMC subsets in a more complete way than the one permitted by morphological analysis only.

In this study, we tested whether age, sex and population modified the distribution of PBMC subset, and found that both age and population significantly influenced this distribution.

Three markers varied with age: compared to young individuals, adults showed lower proportions of CD8 (30% versus 36%) and of IgM (25% versus 35%), while their proportion of CD4 was higher (18% versus 12%). Our results were in accordance with the hypothesis that the proportion of adaptive response increase when individuals grow. Such changes were also observed by Robinson et al. (2010) and Nussey et al. (2012) for CD4 but they also had an increase for CD8. However, on the contrary with Robinson et al. (2010), no decrease of monocytes with age was found.

Many studies showed males and females differ in their parasite prevalence and intensities and a meta-analysis showed consistent male-bias in parasitism in mammals (Wilson and Cotter 2013). Authors related this sex-bias in parasitism by sexual dimorphism in immune phenotype with several hypotheses, including immunosuppressive effect by testosterone (Folstad and Karter 1992) or difference in immune components between sexes could result in different life-

history trajectories in males and females (Rolff 2002). However, similarly to the result of meta-analysis by Roberts (2004) and contrary to our expectations, we found no variation of leucocyte subsets with sex, thus no support was found for the immunocompetence handicap hypothesis. Indeed, But, in our case, perhaps because of the small sample size, we found no support in sexual dimorphism in immune phenotype.

A large range of life history traits differ between the two studied populations, which can partly be explained by the contrast in resource availability or pathogens exposure. Indeed, for example, body condition is generally higher at Trois Fontaines (Gilot-Fromont et al. 2012) and senescence patterns differed in haematological and biochemical parameters (Jégo et al. submitted). We also showed that general, descriptive immune parameters differ between the two populations with higher levels of neutrophil count and hemolysis capacity in Trois Fontaines, and more generally that the level of innate and cellular response was correlated with body condition (Gilot-Fromont et al. 2012). We thus proposed that the high availability of resources in Trois Fontaines allowed individuals to mount costly immune response, including innate cellular response, while individuals in Chizé, being generally in poorer condition, would down-regulate costly immune arms.

In accordance with these previous results, the expression of the monocyte marker CD14 dropped from approximately 3% at Trois Fontaines to 2% at Chizé. Circulating monocytes play a key role in the inflammatory response, including phagocytosis (Auffray 2009). Phagocytes cells are able to internalize and digest bacteria and others cells and are found in high concentrations in inflammatory response caused by bacteria, parasites and viruses (Tizard et al. 2004; Auffray et al. 2009). It has long been recognized that inflammatory monocytes are recruited and differentiate into macrophages at the site of the inflammatory lesion (Gordon and Taylor 2005). We can hypothesize that the difference in expression of the monocyte marker CD14 between Trois Fontaines and Chizé could reflect the difference in

body condition. Indeed, Waterer and Wunderink (2003) in accordance with Beldomenico et al. (2008a) shown peaks of monocytes and found an expensive cost of mounting an inflammatory response. We thus confirm that innate cellular response is lower in Chizé than in Trois Fontaines.

These results are only descriptive and we only investigated monitoring technique in the peripheral blood to highlight variation in immune system. We have shown for the first time a cross-reactivity of monoclonal antibodies with roe deer PBMC. This study is one of the first steps to better understanding variation of immune system in the wild. Coupling monitoring with challenge techniques would produce a more complete description of immune system functioning.

Finally, the variations of immune strategy, both quantitatively and qualitatively, are expected to result in variable host response to parasite challenge, within and among populations (Rossi et al. 2013). These variations should have important consequences in terms of pathogen dynamics and of impact of parasites on host fitness. Here, for example, the maturation of immune system with age is probably related to the variations of helminth parasites observed among age classes (Body et al. 2011). Whether these differences also explain host resistance after parasite challenge, survival and fecundity will be investigated in the future.

Table 1. list of human, mouse, pig and ruminants monoclonal antibodies tested with roe deer PBMC.

Host	Antibodies	Clone	Isotype	Company	Cross-reactivity	Reference
Hu	CD3-FITC		IgG	eBiosciences	-	
Hu	CD19-APC		IgG	eBiosciences	-	
Hu	CD45-PeCy7	HI30	igG1k	eBiosciences	-	
Mo	CD3-FITC	145-2C11	IgG	eBiosciences	-	
Mo	CD19-APC		IgG	eBiosciences	-	
Mo	CD45-PeCy7	30-F11	IgG2b,k	BDBiosciences	-	
Pi	CD3-FITC	BB23-8E6-8C8	IgG	BDBiosciences	-	
Pi	CD4-PeCy7	74-12-4	IgG2b,k	BD Pharmingen	+	
Pi	CD8-APC		IgG	BD Pharmingen	-	
Pi	CD3-FITC	PPT3	IgG1,k	Southern biotech	+	
Pi	CD4-PeCy7	74-12-4	IgG2b,k	BD Pharmingen	-	
Pi	CD8- AF647	76-2-11	IgG2a, k	BD Pharmingen	-	
Pi	CD14-APC	MIL-2	IgG2b	AbD Serotec	-	
Pi	CD16-PE	G7/MCA1971	Mouse IgG1	AbD serotec	-	
Pi	CD21-PE	B-Ly4	IgG1K	BD Pharmingen	-	
Pi	CD45-FITC	K252-1E4/MCA1222F	Mouse IgG1	AbD serotec	-	
Sh	CD4-PE	17D1	IgG1	VMRD	+	Waters et al. 2000, 2002, 2004 ; Robinson et al. 2008, 2010
Sh/Go	CD8-PE	CACT80C	IgG1	VMRD	+	
Sh/Go/Bo	CD45-FITC		IgG1	Thermo Scientific	-	
Sh/Go/Bo	B cells-FITC	1.11.32	IgG2b	VMRD	-	Waters et al. 2000, 2002
Sh/Go/Bo	CD14-FITC		IgG1	VMRD	+	Robinson et al. 2010
Sh/Go/Bo	B-B4-FITC	PIG45A	IgG1	VMRD	+	

Significant abbreviation: Hu Human ; Mo Mouse ; PI Pig ; Sh Sheep ; Go Goat ; Bo Bovine

Table 2. Model selection for the effects of age on leucocytes subsets.

Displayed are the AIC of each model with degrees of freedom (df), and the difference in AIC between each candidate model and the selected model (in bold). Null = constant model. Age² = model with age fitted as a quadratic function. Full classes = model with age fitted as a continue variable. Factor classes = model with age fitted as a factor with as many age classes as observed different ages. Two classes = model with age fitted as a factor with two classes (i.e., 1, 2+ years). Three classes = model with age fitted as a factor with three age classes (i.e., 1, 2–7, 8+ years). Four classes = model with age fitted as a factor with four age classes (i.e., 1, 2–7, 8–12, 12+ years). Threshold = model with a threshold age at the onset of senescence.

	Df	AIC	Δ AIC
CD3			
Full classes	4	772.4648	0
Two classes	4	773.3004	0.8356
Threshold	4	773.4971	1.0323
Age ²	5	773.692	1.2272
Three classes	5	775.1992	2.7344
Four classes	6	776.8932	4.4284
Factor classes	13	784.8982	12.4334
Null	2	805.0145	32.5497
CD4			
Two classes	4	673.1205	0
Three classes	5	675.0651	1.9446
Four classes	6	677.0539	3.9334
Age ²	5	685.4189	12.2984
Factor classes	13	688.5255	15.405
Full classes	4	692.0448	18.9243
Null	2	701.1425	28.022
Threshold	4	703.6368	30.5163
CD8			
Two classes	4	725.9829	0
Three classes	5	727.9677	1.9848
Four classes	6	728.9944	3.0115
Factor classes	13	734.6297	8.6468
Full classes	4	736.1403	10.1574
Age ²	5	736.5348	10.5519
Threshold	4	739.6087	13.6258
Null	2	741.4657	15.4828

CD14			
Full classes	4	544.3663	0
Threshold	4	544.7813	0.415
Two classes	4	544.8362	0.4699
Three classes	5	546.2439	1.8776
Age ²	5	546.357	1.9907
Four classes	6	547.5428	3.1765
Factor classes	13	554.241	9.8747
Null	2	556.8189	12.4526
IgM			
Three classes	5	827.472	0
Two classes	4	828.0499	0.5779
Four classes	6	828.8631	1.3911
Factor classes	13	832.5184	5.0464
Age ²	5	843.9914	16.5194
Full classes	4	851.4516	23.9796
Threshold	4	873.695	46.223
Null	2	877.7314	50.2594

Table 3. Model selection for the effect of age selected, site and sex controlled by period on leucocytes subsets. Displayed are the AIC of each model with degrees of freedom (df) and the difference in AIC between each candidate model and the selected model.

	df	AIC	Δ AIC
CD3			
period + age	4	772.4648	0
period + sex	4	772.5501	0.0853
period + site	4	772.952	0.4872
period + sex + age	5	773.1329	0.6681
period + site + age	5	773.7258	1.261
period + site + sexe	5	773.8947	1.4299
period + site + sex + age	6	774.2285	1.7637
CD4			
period + age (2 classes)	4	673.1205	0
period + sex + age (2 classes)	5	673.26	0.1395
period + site + sex + age (2 classes) + sex:age (2 classes)	6	674.3506	1.2301
period + site + age (2 classes)	5	675.0233	1.9028
period + site + sex + age (2 classes)	6	675.0713	1.9508
period + site + sex + age (2 classes) + site:age (2 classes)	7	675.4794	2.3589
CD8			
period + age (2 classes)	4	725.9829	0
period + site + age (2 classes) + site:age (2 classes)	6	726.341	0.3581
period + sex + age (2 classes)	5	726.9613	0.9784
period + site + age (2 classes)	5	727.0802	1.0973
period + site + sex + age (2 classes) + site:age (2 classes)	7	727.1521	1.1692
period + site + sex + age (2 classes)	6	727.8661	1.8832
period + site + sex + age (2 classes) + sex:age (2 classes)	6	728.9223	2.9394

CD14			
period + site	4	543.8005	0
period + sex	4	543.8815	0.081
period + age	4	544.3663	0.5658
period + site + sex	5	544.5532	0.7527
period + sex + age	5	544.5731	0.7726
period + site + age + site:age	6	544.7316	0.9311
period + site + sex + age + site:age	7	544.9441	1.1436
period + site + age	5	545.1	1.2995
period + site + sex + age	6	545.4923	1.6918
period + site + sex + age + sex:age	6	545.4979	1.6974
IgM			
period + site + sex + age (2 classes) + site:age (2 classes)	7	826.7285	0
period + site + age (2 classes) + site:age (2 classes)	6	827.5426	0.8141
period + site + sex + age (2 classes) + sex:age (2 classes) + site:age (2 classes)	8	827.7185	0.99
period + sex + age (2 classes)	5	827.7468	1.0183
period + age (2 classes)	4	828.0499	1.3214
period + site + sex + age (2 classes)	6	828.3109	1.5824

6. Test fonctionnel de prolifération lymphocytaire

6.1. La prolifération lymphocytaire

La prolifération lymphocytaire est l'une des composantes essentielles de la réponse immunitaire adaptative. Tous les lymphocytes sont issus des hémocytoblastes de la moelle osseuse. Le processus de multiplication et de maturation des lymphocytes T s'effectue dans le thymus (pendant 2-3 jours) par stimulation des hormones thymiques. Une sélection positive s'opère dans la région corticale du thymus : les peptides du soi sont présentés aux lymphocytes par les cellules épithéliales du thymus, entraînant ainsi une sélection des lymphocytes capables de reconnaître les molécules du soi constitués du complexe CMH/peptides et la mort des lymphocytes incapables de reconnaître ce complexe. Une sélection négative va également entraîner l'élimination des lymphocytes T qui se lient trop fortement aux molécules du CMH ou du complexe CMH/peptides. Les lymphocytes T vont ensuite se différencier en lymphocytes T CD4+ (ou auxiliaires ou « *helpers* ») capables de proliférer à la suite du contact antigène/cellules présentatrices d'antigènes et entraîner une stimulation et différenciation des lymphocytes T CD8+ en lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes B en plasmocytes. Les lymphocytes T cytotoxiques ont pour rôle la destruction de la cellule cible à l'aide de la perforine.

A l'inverse, l'acquisition de la maturation des lymphocytes B s'effectue dans la moelle osseuse. Certains lymphocytes B sont inactivés (phénomène d'anergie), d'autres éliminés par apoptose (délétion clonale). Par la suite les lymphocytes B immunocompétents naïfs sont activés et différenciés par stimulation lorsque l'antigène se lie aux récepteurs membranaires.

6.2. Principe du test

La prolifération lymphocytaire est un processus qui permet de mesurer la capacité des lymphocytes à proliférer suite à l'action de plusieurs stimuli. Le test de prolifération est un test fiable, simple et facile à mettre en place. Il a été utilisé dans le cadre de nombreuses études afin de mesurer l'immunocompétence (Cross et al. 1996 ; Waters et al. 2004).

Ce test fonctionnel mesure la capacité des lymphocytes mis en culture à proliférer (prolifération clonale) lors d'une stimulation in vitro par un antigène ou mitogène étranger. Les cellules qui prolifèrent synthétisent des protéines et de l'ADN. L'augmentation de la synthèse d'ADN peut être mesurée par l'addition de [³H] thymidine, un précurseur d'ADN marqué par un radio-isotope, dans le milieu de culture cellulaire : la quantité de [³H] absorbée par les cellules en division permet d'estimer le niveau de la prolifération cellulaire.

L'objectif de la mise au point de ce test est double. Tout d'abord, le principe consiste, d'une part, à chercher un mitogène qui permet une prolifération des sous-populations de leucocytes souhaitées chez le chevreuil et d'autre part, d'observer une variabilité inter individuelle.

6.3. Protocole

Dans le cadre de la thèse, j'ai participé à la mise au point des tests préliminaires destinés à mesurer la lymphoprolifération des cellules de trois individus à des doses croissantes de mitogène qui ont été effectués à l'unité U851 de INSERM en 2012.

Les cellules utilisées sont les PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) congelées à 2×10^6 cellules/ml, dont le protocole d'extraction est décrit dans l'Annexe 2. Dans cette étude, les PBMC sont stimulées à l'aide de différents mitogènes : la concanavaline A (Con A), l'acétate de phorbol myristate / Ionomycine (PMA / iono) et les lipopolysaccharides (LPS). La Con A est un mitogène des plantes et est connue pour sa capacité à stimuler la sous-population de cellules T. Le PMA et l'ionomycine sont des agents qui imitent la stimulation

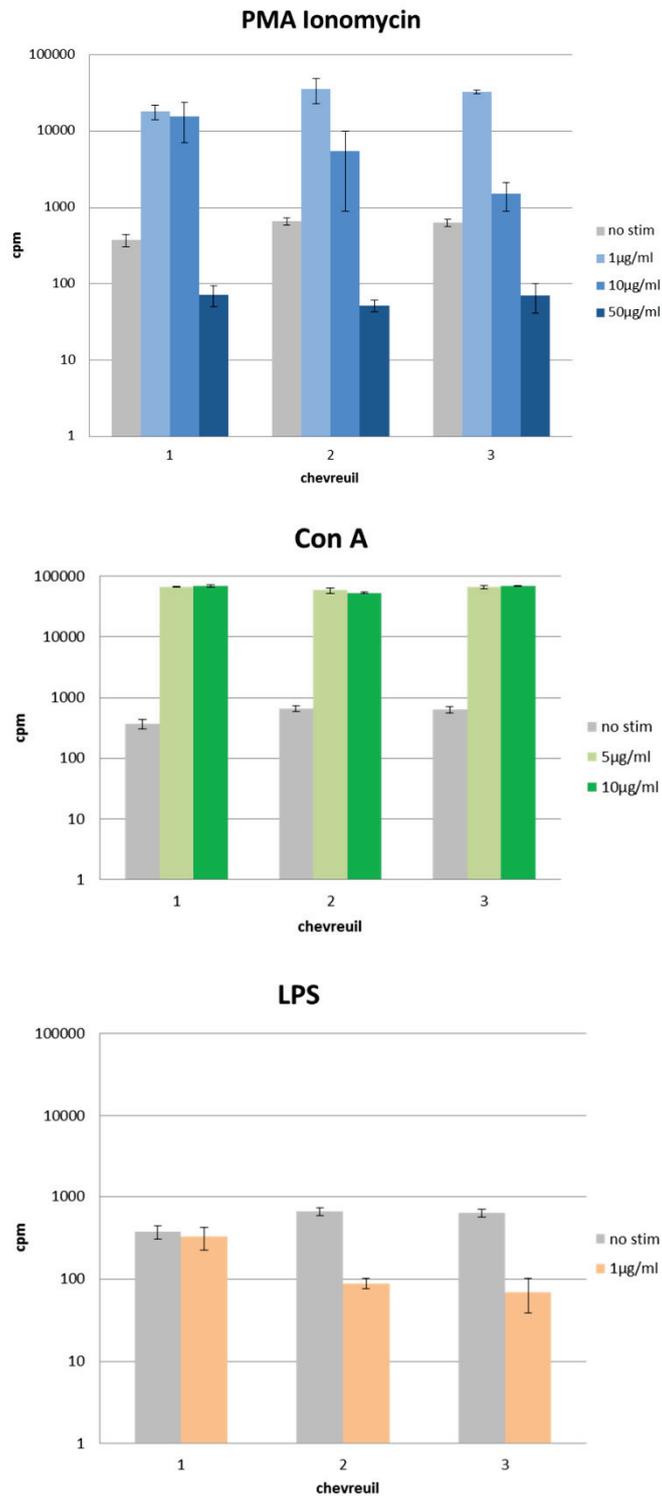
du récepteur TCR (T-Cell Receptor) sur la sous-population de cellules T. Les LPS, provenant de bactéries gram-négatives, sont un puissant inducteur de l'activation polyclonale des cellules B, de la prolifération des lymphocytes T et de la stimulation de macrophages. La Con A a été testée à 5 µg/ml et 10 µg/ml ; le PMA / iono a été testé à 1, 10 et 50 µg/ml et enfin les LPS ont été testés à 1 µg/ml. Les contrôles n'ont pas été stimulés et ont été mis en culture dans les mêmes conditions que les cellules stimulées. La prolifération cellulaire est ensuite mesurée par l'incorporation de [³H] thymidine après 18 h de culture. Le degré de prolifération cellulaire est exprimé en comptage par minute (CPM).

6.4. Résultats

Le niveau de prolifération varie selon les mitogènes utilisés et les doses. La prolifération des lymphocytes chez le chevreuil est observée avec la ConA (5 à 10 µg/mL), le PMA/iono (1 à 10 µg/mL) mais pas avec les LPS à 1 µg/mL (Figure 9). Classiquement dans ce genre de test il faut trouver la fenêtre dans laquelle on peut mettre en évidence une relation dose-réponse. Trop peu de mitogène ne permet pas une réponse suffisante pour être mesurée et trop de mitogène provoque un stress trop important aboutissant à un phénomène d'apoptose des cellules.

En termes de variabilité interindividuelle, il semble qu'avec une stimulation par le PMA ionomycine, il est possible d'observer une variation entre les trois chevreuils testés. Au contraire, pour la Con A et pour les LPS, les concentrations ne semblent pas adaptées pour observer une quelconque variation de la prolifération lymphocytaire car la prolifération atteint directement un seuil pour plusieurs concentrations ou entraîne la mort de cellules.

Figure 9. Résultats des tests de lymphoprolifération sur 3 chevreuils, avec stimulation par le PMA/ionomycine, la concanavaline A, et les LPS.



Légende : cpm: Count per minute (mesure de la radioactivité incorporée dans l'ADN) ; « no stim » : absence de stimulation

6.5. Conclusion

Au vu des essais préliminaires réalisés, la stimulation par le PMA/iono à des concentrations faibles semble le protocole le plus approprié pour mesurer la lymphoprolifération et ses variations interindividuelles. Quelques mises au point sont encore nécessaires afin d'obtenir un test de prolifération lymphocytaire fiable permettant d'observer des variations dans la réponse immunitaire chez le chevreuil. Tout d'abord, il convient de mettre au point le dosage final qui permet de mettre en évidence une prolifération lymphocytaire qui reflète la capacité de l'hôte à répondre au stimulus. Il faudra également s'assurer de la répétabilité du test puis de la stabilité de la réponse vis-à-vis de la conservation. En effet, comme nous l'avons dit précédemment, l'acheminement des échantillons sanguins met moins de 24h pour ceux de Trois Fontaines et 24-48h pour ceux de Chizé. Même s'il y a peu de variations entre populations lors de la décongélation des PBMC, c'est le temps entre la prise de sang et la congélation des PBMC qui constitue le paramètre primordial pour pouvoir comparer les variations inter-populations.

7. Test fonctionnel de phagocytose

7.1. La phagocytose

Les phagocytes mononucléaires, comme les monocytes, ont pour rôle l'élimination de particules d'origine exogènes comme les microbes, ou provenant de l'organisme, comme les globules rouges sénescents. Une série de récepteurs, qualifiés d'invariables ou PRR (« *pattern recognition receptor* ») est présente à la surface des monocytes/macrophages, permettant une reconnaissance non-spécifique d'une grande variété de microorganismes. La stimulation de

ces récepteurs déclenche l'activation des macrophages induisant une réponse inflammatoire locale qui permet le recrutement de nouveaux phagocytes.

Chez les mammifères, la phagocytose, notamment par les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles, est un processus essentiel pour plusieurs fonctions telles que le remodelage des tissus ou l'élimination des cellules mortes. De plus, la phagocytose est un processus central dans la défense contre les agents pathogènes, notamment dans le cadre des défenses innées. La phagocytose comprend une série d'évènements : la reconnaissance et la liaison des particules par les récepteurs de surface de la cellule, puis la formation d'une membrane plasmique qui englobe le corps étranger et forme un phagosome. La fusion du phagosome (ingestion du corps étranger) et des lysosomes forme le phagolysosome qui digère le corps étranger en libérant des enzymes de type protéases. Ce phénomène, qui fait partie du système immunitaire inné, est nécessaire pour la survie de l'hôte. Par la suite, les molécules dérivées de l'agent pathogène peuvent être présentées à la surface des cellules (cellules présentatrices d'antigène), ce qui permet l'activation des composantes de l'immunité acquise, principalement les lymphocytes.

7.2. Principe du test

Les tests de phagocytose sont essentiels pour mesurer le niveau d'activité des phagocytes, de façon à compléter l'information concernant leur concentration dans le sang par exemple. La phagocytose peut être mesurée à l'aide de tests simples consistant à mesurer la fluorescence de phagocytes (ici, des cellules mononuclées sanguines) après incubation avec des cibles marquées, qui doivent être phagocytées. Le principe consiste, d'une part, à mettre au point un protocole qui permette de mesurer la capacité des macrophages à phagocyter les particules antigènes *in vitro*, et d'autre part, de pouvoir montrer une potentielle variabilité entre les individus. La difficulté résulte dans le premier objectif principalement car des phénomènes de

liaisons entre le phagocyte et la particule cible peuvent laisser apparaître de la phagocytose sans que cela en soit.

7.3. Protocole

Les cellules utilisées sont les PBMC congelés à 2×10^6 PBMC/ml, pour lesquelles le protocole d'extraction est décrit dans l'Annexe 2. Les cellules sont mises en contact avec du Zymosan (ref Z-2841, Molecular Probes, fluorescein labelled) opsonisé (opsonising reagent (ref Z-2850, Molecular Probes): rabbit polyclonal IgG). L'opsonisation est un processus par lequel une molécule recouvre la membrane d'une cellule cible pour favoriser la phagocytose. Le Zymosan est préparé à partir de paroi cellulaire de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et se compose de complexes protéines-glucides.

Dans la mesure où ce test de phagocytose n'avait jamais été mis au point chez le chevreuil, la première étape a consisté à effectuer un test quantitatif sur les PBMC. Les résultats sont obtenus grâce à la cytométrie en flux et permettent dans cette première étape de mise au point, d'observer s'il y a ou non phagocytose. Les graphiques représentent la fluorescence (en abscisse) des Zymosan phagocytés et le nombre de cellules radioactives en ordonnée (Voir Annexe 4 pour le détail du protocole). La vitesse de phagocytose des cibles (mesurée par le nombre de cibles phagocytées dans un temps donné) est indicatrice de l'activité des cellules étudiées.

7.4. Résultats

L'analyse de la figure 10 permet d'observer trois pics : un pic de 10^1 à 10^2 , un pic à environ 10^3 et un pic entre 10^4 et 10^5 . L'analyse de ces pics permet de mettre en évidence que le pic (1) correspond aux cellules qui n'ont pas phagocyté de Zymosan, que le pic (2) correspond à des cellules qui ont phagocyté, sont en contact (fixation par des récepteurs) ou sont en train de phagocyter du Zymosan, et que le pic (3) correspond au Zymosan seul.

La fixation des cellules par la technique de fixation des filaments d'actine et fixation du Zymosan a permis l'observation de ces cellules (Figure 11 et Annexe 5). Afin de révéler la phagocytose, un anticorps secondaire (anti-lapin) a été ajouté afin de marquer le Zymosan (protocole en Annexe 6). Cet anticorps fluorescent est révélé par cytométrie en flux. Par conséquent, il est possible de distinguer le Zymosan qui a été phagocyté de celui qui ne l'a pas été. Les résultats préliminaires sont présentés par la figure 12. On observe toujours les cellules incapables de phagocytose (voir le pic (1) du précédent paragraphe) mais les résultats attendus prévoyaient un pic à environ 10^3 . Des mises au point complémentaires afin de tester le marquage des anticorps secondaires pour montrer la proportion réelle de Zymosan phagocytés sont nécessaires.

Une hypothèse peut être émise pour expliquer la présence des deux autres pics, observés sur la figure 12. Le pic (2) pourrait correspondre à des cellules qui ont phagocyté du Zymosan (donc moins de fluorescence), à des cellules qui ont commencé à dégrader le Zymosan et/ou à des cellules qui n'ont phagocyté qu'un morceau de Zymosan. Le pic (3) pourrait correspondre à un agglomérat de Zymosan seul, à des cellules qui ont phagocyté une quantité importante de Zymosan et/ou à des cellules qui ont phagocyté du Zymosan mais dont la fluorescence est toujours aussi élevée.

Figure 10. Histogramme de cytofluorimétrie en flux de la phagocytose chez deux individus après 30 min d'incubation du Zymosan marqué et des PBMC de chevreuil. L'abscisse correspond au logarithme de l'intensité de la fluorescence et l'ordonnée au nombre de cellules radioactives.

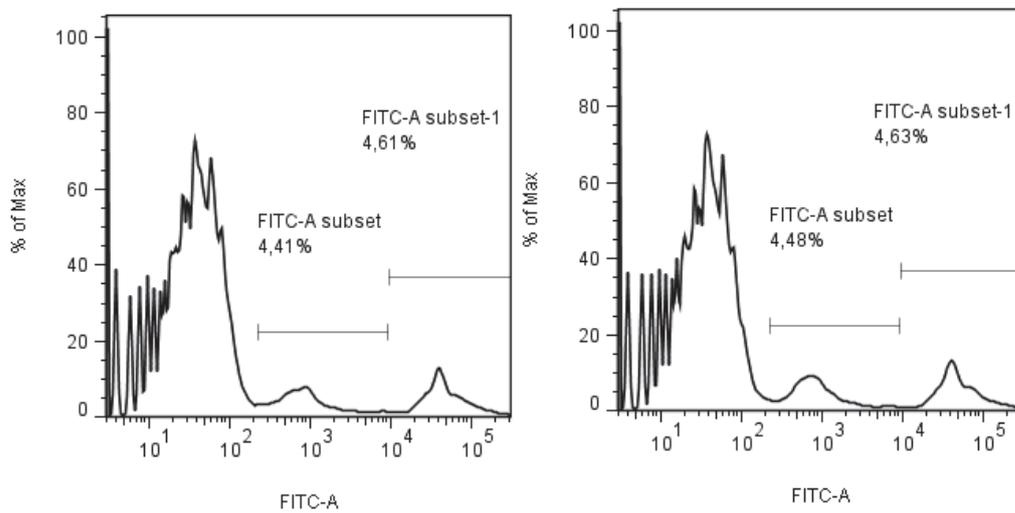


Figure 11. Vue microscopique de la phagocytose : trois particules de Zymosan phagocytées par une cellule phagocytaire.

Les Zymosan présentent un aspect particulier ; en effet, leur fluorescence n'est pas homogène et ils présentent une sorte de « noyau » ainsi qu'une paroi qui fluorescent de façon plus intense. Une interprétation possible est que le phagocyte ait commencé le travail de phagocytose et que le Zymosan soit en train d'être digéré.

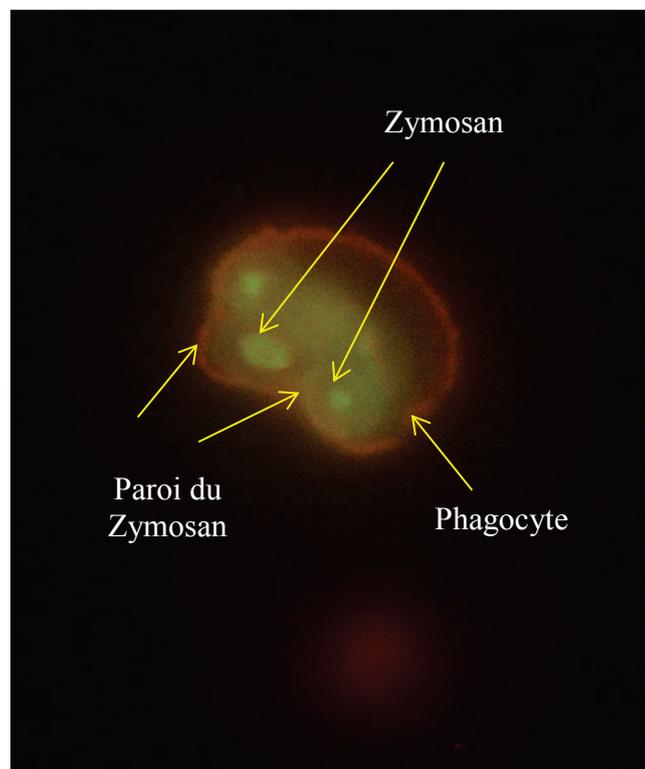
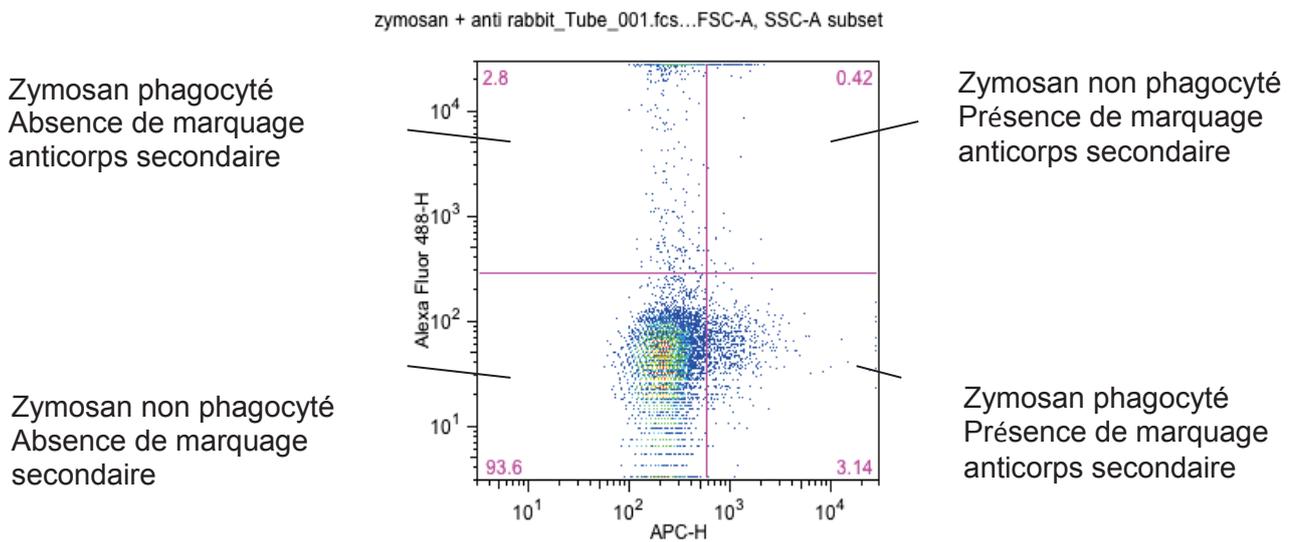


Figure 12. Analyse de cytofluorimétrie en flux de la phagocytose

chez un individu n après 1 h d'incubation du Zymosan (marqué ou non d'un anticorps secondaire) et des PBMC de chevreuil. L'abscisse correspond au logarithme de l'intensité de la fluorescence et l'ordonnée au nombre de cellules radioactives.



7.5. Conclusion

Même si certaines avancées ont été faites, il reste plusieurs paramètres à tester afin de pouvoir finaliser la mise au point du test de phagocytose. Il est essentiel de contrôler plusieurs paramètres afin de valider le test fonctionnel, tels que la préparation des cellules spécifiques pour ce test, la quantité de Zymosan mis en contact avec les cellules immunitaires et le temps de contact entre les deux composés. En effet, la méthode d'extraction des PBMC à l'aide du ficoll peut engendrer une perte de matériel. Concernant la quantité de Zymosan et le temps de contact, il serait nécessaire d'effectuer des mises au point comme un test cinétique et une gamme de doses qui permettraient à la fois d'optimiser la quantité de Zymosan ingérée en évitant les problèmes de mort cellulaire et à la fois de trouver le temps de contact optimal qui permettrait d'observer des variations entre les individus.

8. Conclusion

En se basant sur l'adaptation du modèle conceptuel de Schmid-Hempel et Ebert (2003), nous avons finalisé la mise au point des tests fonctionnels pour certains quadrants de l'immunité et d'autres sont en voie de finalisation. En effet, alors que le test HAML est dorénavant au point, fiable et utilisé en routine, les tests de prolifération lymphocytaire et de phagocytose nécessitent encore quelques mises au point. Cependant, le marquage leucocytaire a déjà permis de mettre en évidence des différences dans les proportions des sous populations de leucocytes en fonction de l'âge et du site.

CHAPITRE III

VARIATIONS DES DETERMINANTS DE L'IMMUNITE

CHEZ LE CHEVREUIL

1. Introduction

Dans ce troisième chapitre, nous nous sommes attachés à étudier les variations et les relations entre les variables qui peuvent moduler l'immunocompétence.

Comme nous avons pu le voir en introduction, la condition physique pourrait constituer un des facteurs déterminants de l'immunocompétence. Parmi les facteurs pouvant moduler la condition physique, on peut citer le parasitisme et l'âge. De plus, le parasitisme lui-même est un déterminant direct de l'immunocompétence puisqu'il va stimuler le système immunitaire et induire une réponse.

Dans un premier temps, nous avons focalisé notre étude sur le lien entre la condition physique et le parasitisme. De nombreuses études sur des populations sauvages ont montré une relation négative entre les parasites et la condition physique de leurs hôtes : les cestodes *Hymenolepis microps* et des nématodes *Trichostrongylus tenuis* et *Splendidofilaria papillocerca* sur le lagopède des saules, *Lagopus lagopus* (Holmstad et al. 2005), les helminthes gastrointestinaux sur le renne, *Rangifer tarandus platyrinchus* (Stien et al. 2002) et les lapins sauvages, *Oryctolagus cuniculus* (Lello et al. 2005), les nématodes respiratoires sur le cerf élaphe, *Cervus elaphus* (Corrigan et al. 1982), ou encore les coccidies sur le Jacarini noir, *Volatinia jacarina* (Costa et Macedo 2005), le campagnol roussâtre, *Clethrionomys glareolus* (Hakkarainen et al. 2007), le lièvre, *Lepus timidus* (Newey et al. 2005), ou les femelles springboks, *Antidorcas marsupialis* (Turner et al. 2012).

Cependant, ces études se basent sur la masse corporelle, souvent utilisée comme une mesure intégrative de la qualité phénotypique (Toïgo et al. 2006) et par conséquent comme un indicateur non-spécifique qui pourrait répondre lentement à une perturbation mais ne répondent pas à la question de savoir quels paramètres de la physiologie sont affectés par quel parasite. Nous avons donc tenté de répondre à cette question en étudiant le lien entre la condition physique, caractérisée non pas uniquement par la masse corporelle mais par un

ensemble de variables hématologiques reflétant des aspects physiologiques précis, et le parasitisme (Article 2).

L'article 2 ayant montré que les parasites ont un effet plus marqué dans certaines classes d'âge et en particulier chez les animaux âgés, nous avons voulu savoir si cet effet pouvait être lié à une diminution des performances physiologiques chez les animaux âgés.

Ainsi, dans la seconde partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux variations de la condition physique liées à l'âge. Il a été observé chez de nombreuses espèces, une détérioration de l'état physiologique des individus menant à un déclin de la survie et de la reproduction appelé sénescence (Monaghan et al. 2008). C'est principalement la sénescence actuarielle (de survie) et de reproduction qui ont fait l'objet d'études en faune sauvage (Nussey et al. 2013). Cependant, les connaissances concernant le déclin des paramètres et performances physiologiques lié à l'âge en faune sauvage restent peu nombreuses à l'heure actuelle. C'est dans ce contexte que nous avons étudié le lien entre les paramètres hématologiques et biochimiques et l'âge, en se focalisant sur des variations liées au site et au sexe (Article 3).

2. A comparison of the physiological status in parasitized roe deer (*Capreolus capreolus*) from two different populations (Article 2)

M. Jégo^{a,b,*}, H. Ferté^c, J.M. Gaillard^a, F. Klein^d, L. Crespin^{a,e}, E. Gilot-Fromont^{a,b}, G.
Bourgoin^{a,b}

Veterinary Parasitology **205**, 717-720

DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.09.016

^a Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

^b Université de Lyon, VetAgroSup, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France

^c EA 4688 « VECPAR », UFR Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 Rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France

^d Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Centre National de Recherches Appliquées sur les Cervidés-Sanglier, 1 Place Exelmans, F-55000 Bar-le-Duc, France

^e INRA, UR346 d'Epidémiologie Animale, F-63122 Saint Genès Champagnelle, France

* Corresponding author at: Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, 43 Bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: +33 0472448018.

E-mail addresses: mael.jego@vetagro-sup.fr, jego.mael@gmail.com (M. Jégo).

2.1. Abstract

Studies of the impact of parasites on host performance have mainly focused on body mass, a phenotypic trait that responds relatively slowly to the presence of parasites, and the expectedly faster response of physiological parameters has been mostly overlooked. We filled the gap by measuring the impact of endoparasites on four hematological/biochemical parameters (hematocrit, albumin, creatinine and fructosamine) in two contrasting free-living populations of roe deer. We generally found negative relationships between parasites and physiological parameters. Our findings also indicate little role of host sex on parasite impact and strongest parasite effects on young and senescent hosts.

Keywords: coccidia, hematology, nematode, plasma biochemistry, roe deer, wildlife

2.2. Introduction

Although parasites play a key role in wildlife population processes (Grenfell and Gulland 1995), there is still limited evidence of negative effects of parasites on host individual performance. Parasites often colonize blood, mucus or tissues, leading to protein loss and nutrient deficiency or anemia in their hosts (Parkins and Holmes 1989). Helminths and lungworms can also alter protein metabolism and depress appetite, leading to reduced food intake and decreased mass gain (Corrigan et al. 1982). Most studies describing the effects of parasites on body condition focused on body mass (Irvine et al. 2006), a relevant integrative measure of phenotypic quality (Toïgo et al. 2006). However, body mass is a non-specific indicator of performance that responds relatively slowly to the presence of parasites. In contrast, hematological and biochemical parameters reflect single well defined aspects of host physiology, which respond faster to parasites and allow identifying aspects of host physiology altered by parasites (Beldomenico and Begon 2010). The impact of parasites on physiological performance depends on the species and abundance of parasites, and on host initial condition and resilience (Beldomenico and Begon 2010). Both progressive establishment of immunity in young hosts and immune senescence should lead to age-specific variation in infestation, with old and young individuals being more sensitive to parasites than adults (Turner and Getz 2010). Moreover, males often have lower levels of immunity than females (Forbes 2007). Finally, environmental conditions should determine the energy and resources available to hosts for controlling parasites, likely causing individuals to allocate less energy against parasites in poor environments than in rich ones. A negative effect of parasites should thus occur on host body condition (H1), especially in males compared to females (H2), in young and senescent individuals compared to adults (H3), and when resources are scarce (H4).

2.3. Material and methods

2.3.1. Data collection

Data were collected in two contrasted areas: Trois Fontaines (1360 ha, 48°43'N, 4°55'E, France), with a continental climate and high quality soils; and Chizé (2614 ha, 46°05'N, 0°25'W, France), with a temperate oceanic climate and poor quality soils. Data were collected every winter from December 2009 to March 2013 on roe deer captured using drive netting (Gaillard et al. 1993). Roe deer were sexed and weighed and blood samples were collected (EDTA and serum tube) at the jugular vein and fecal matter (5-10 g) *per rectum*.

2.3.2. Body condition

Body condition was measured by body mass (in kg) and four hematological and biochemical parameters, obtained from classical biochemical measurements: hematocrit (HCT in %), to reflect changes in an animal's oxygen-carrying capacity; albumin (ALB in g/L), measured using total protein content of the serum (obtained with a refractometer) and electrophoresis (processor HYDRASIS, Sebia, Evry, France), to assess the level of protein resources; creatinine (CREA in $\mu\text{mol/L}$), to assess the turnover of muscular proteins, and fructosamine (FRU in $\mu\text{mol/L}$), measured using Thermo scientific reagents and ABX Pentrafructosamine reagents (Horiba, Montpellier, France), respectively, on a Konelab 30i automaton (Fisher Thermo Scientific, Cergy-Pontoise, France), to get a measure of the level of carbohydrates independent of capture stress (Stockham and Scott 2008) (see the Supplementary material for details).

2.3.3. Parasites

Fecal propagule counts of four frequent groups of species were investigated: gastrointestinal strongyles (GI strongyles), including Trichostrongyloidea and Strongyloidea, *Trichuris* sp.,

coccidia and Protostrongylids. Each fecal sample was analyzed by two different techniques at the laboratory of the faculty of pharmacy (University of Reims Champagne-Ardenne, EA4688 Vecpar): the McMaster protocol (Raynaud 1970) for gastrointestinal nematode eggs and coccidia, and the Baermann fecal technique (Baermann 1917) for pulmonary nematode larvae (Protostrongylids). Parasite abundance was estimated by using two metrics: the faecal propagule count (on a log $(n+1)$ scale) of each individual, infected or not (Bush et al. 1997) and the diversity of the parasitic community (IPC) measured as the Shannon index (Shannon 1948).

2.3.4. Statistical analysis

Only known-aged individuals (i.e. captured during their first year of life) were included, split into three age classes (young: < 1 year of age; adult: between 2 and 8 years of age; senescent: ≥ 8 years of age, see Gaillard et al. 1993). As young body mass provides a reliable indicator of resource availability during summer autumn in temperate ungulates (Hamel et al. 2009), the average mass of young (AMY) was used in a given population and for a given year to measure resource availability.

A linear mixed model was fitted for each physiological parameter by including individual as a random effect, and age, sex, AMY, body mass and parasite abundance as independent variables to allow testing hypotheses (using Likelihood Ratio Tests with Maximum Likelihood estimation method applied by deleting each variable in turn). A p -value < 0.05 was considered statistically significant. All analyses were run using R (version 2.15.3, 2013, R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0).

2.3.5. Ethical consideration

This research was conducted with the approval of the Director of Food, Agriculture and Forest (Prefectoral order 2009-14 from Paris) and of the Office National des Forêts (ONF),

and received the approval of the ethical committee of University Lyon 1 (project DR2014-09).

2.4. Results

After accounting for possible confounding effects of age and sex, body mass in Trois Fontaines decreased with increasing counts of GI strongyles ($\beta = -0.15 \pm 0.07$, $p = 0.043$), *Trichuris* sp. ($\beta = -0.17 \pm 0.08$, $p = 0.030$), and Protostrongylids ($\beta = -0.44 \pm 0.20$, $p = 0.027$), and with increasing IPC ($\beta = -0.87 \pm 0.38$, $p = 0.025$). At Chizé, no statistically significant association between parasite abundance and body mass was found. Moreover, in both populations, there was no statistically significant association between any parasite abundance and ALB.

At Trois Fontaines, HCT decreased with increasing counts of coccidia ($\beta = -0.30 \pm 0.15$, $p = 0.034$), CREA decreased with increasing counts of GI strongyles ($\beta = -2.93 \pm 0.80$, $p < 0.001$) and Protostrongylids ($\beta = -7.54 \pm 2.18$, $p < 0.001$) and with increasing IPC ($\beta = -13.90 \pm 4.03$, $p < 0.001$). At Chizé, HCT decreased with increasing counts of Protostrongylids ($\beta = -2.07 \pm 0.57$, $p < 0.001$), and CREA decreased with increasing counts of GI strongyles ($\beta = -1.80 \pm 0.87$, $p = 0.036$).

Moreover, at Trois Fontaines, there were interactions between sex and parasites (involving GI strongyles and IPC, Table 1) for HCT and between age and parasites (involving *Trichuris* sp. and IPC for HCT, and coccidia and IPC for FRU, Table 1). At Chizé, there were interactions between age and parasites (GI strongyles, Table 2) for HCT and between AMY and parasites (involving *Trichuris* sp. for CREA and coccidia for FRU, Table 2).

For Protostrongylids, no interaction with any variable investigated was statistically significant.

Table 1. Effect of parasites in interaction with age, sex and AMY on hematological parameters of roe deer in Trois Fontaines (France).

Parasites	HCT <i>p</i> estimate±SE	CREA <i>p</i> estimate±SE	FRU <i>p</i> estimate±SE
GI		p = 0.035 (M*GI) 3.31±1.59	
T	p < 0.001 (Y*T) -0.93±0.42 (S*T) -2.03±0.50		
C			p = 0.015 (Y*C) -1.70±1.83 (S*C) 6.28±2.76
IPC	p = 0.030 (Y*IPC) -2.40±1.98 (S*IPC) -6.08±2.33	p = 0.011 (M*IPC) 18.99±7.54	p = 0.025 (Y*IPC) -31.72±11.94 (S*IPC) -10.76±14.04

GI: gastrointestinal strongyles; T: *Trichuris* sp.; C: coccidia; IPC: index of diversity of parasitic community; HCT: hematocrit; CREA: creatinine; FRU: fructosamine; Y: young; S: senescent; M: males; AMY: average mass of young; *: interaction between parasite and body condition; *p*: *p*-value of the Likelihood Ratio Test; estimate±SE: coefficients estimated from the linear mixed model with standard error using females and adults as references.

Table 2. Effect of parasites in interaction with age, sex and AMY on hematological parameters of roe deer in Chizé (France).

Parasites	HCT <i>p</i> estimate±SE	CREA <i>p</i> estimate±SE	FRU <i>p</i> estimate±SE	
	p = 0.032			
GI	(Y*GI) 0.67±0.58 (S*GI) -1.12±0.54			
		p = 0.032		
T		(AMY*T) 4.66±2.18		
			p = 0.038	
C		(AMY*C) 5.04±2.45		
IPC				

GI: gastrointestinal strongyles; T: *Trichuris* sp.; C: coccidia; IPC: index of diversity of parasitic community; HCT: hematocrit; CREA: creatinine; FRU: fructosamine; Y: young; S: senescent; M: males; AMY: average mass of young; *: interaction between parasite and body condition; *p*: *p*-value of the Likelihood Ratio Test; estimate±SE: coefficients estimated from the linear mixed model with standard error using females and adults as references.

2.5. Discussion

All physiological parameters except ALB were negatively correlated with parasite abundance, at least for one parasite group, in accordance with the H1 hypothesis. As previously reported (Stien et al. 2002), negative associations were found between body mass and most parasites investigated at Trois Fontaines. HCT, CREA and FRU were also often negatively correlated with parasite abundance, suggesting either losses of blood and proteins in infested individuals (Baker et al. 2003) or a negative energy balance leading to a decrease of blood/protein production (Coop and Holmes 1996). However, in this cross-sectional study, causal relationships could not be demonstrated. Our finding that parasite abundance negatively impacts body condition could also be interpreted as highest susceptibility of individuals with poorest body condition (Ezenwa 2004).

The susceptibility of host and its ability to respond to parasite infestations could impact on fecal egg counts (Beldomenico and Begon 2010). However, based on the high correlation reported in roe deer between fecal egg counts and number of adult parasites in the digestive tract (Appendix 1 in Body et al. 2011), fecal egg counts can be assumed to be reliable markers for parasite infestation.

Host sex (H2) only had a minor role on parasitism patterns, but age (H3) had a determinant role, with stronger negative correlations in young and senescent individuals. Young animals had lower resilience than adults because they have been less exposed to pathogens and acquired immunity to GI nematode infestation at a slower rate (e.g. Coop and Holmes 1996 for sheep). The higher susceptibility of old animals to parasites matches with increasingly reported evidence of senescence in performance-related traits like reproduction or survival in the wild (Nussey et al. 2013). Accordingly, recent research in wild mammals has demonstrated a decrease of immune system efficiency with increasing age (Nussey et al. 2012). A decreasing food intake with increasing age leading to decrease physiological and

immune parameters could also be involved. The loss of immune capacity may itself increase parasitism, leading to a vicious circle (Beldomenico and Begon 2010).

Lastly, contrary to the H4 hypothesis, environmental conditions only had a negligible role on parasite-body condition relationship maybe because of limited variation in environmental conditions during this 4-year study. Alternatively, highly condition-dependent mortality in the worse situations could lead the most heavily infested individuals to die before capture following parasite infestation. However, the decrease in some physiological parameters with increasing parasite infestation was more pronounced at Chizé when the average mass of young animals was low (Table 2). We suggest that such pattern might be detected only under the strong limiting resource conditions of Chizé. At Trois Fontaines, even years of low performance would not be limiting enough to lower body condition and physiological parameters of roe deer.

Acknowledgements

We thank all the ONCFS staff volunteers who organized the roe deer captures, Céline Dussart for her help in field and laboratory analyses, Damien Jouet for his help in coprological techniques, and two anonymous reviewers for insightful comments on a previous draft. This study was financially supported by ONCFS (grants nos 2011/18/6171 and 2010/03/6171).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

2.6. Supplementary data

Measures of body condition

Hematological and biochemical assays were performed at the Biochemical and Endocrinological laboratory, VetAgro-Sup, France. We obtained complete blood counts using an ABC Vet automaton (Horiba Medical, Montpellier, France). Red blood cell counts were performed using impedance technology by considering parameters for bovine samples. Hemoglobin concentration was measured following cyan methaemoglobin conversion at 550 nm. Hematocrit (in %) was calculated by numeric integration. Creatinine and fructosamine analyses were performed on a Konelab 30i automaton (Fisher Thermo Scientific, Cergy-Pontoise, France) using Thermo scientific (creatinin) and ABX Pentra fructosamine (Horiba, Montpellier, France) reagents, respectively.

Results

Parasite abundance

We obtained 281 fecal samples from roe deer (Trois Fontaines: 172 samples including 1 individual captured in 4 years, 5 individuals captured in 3 years, 30 individuals captured in 2 years and 93 individuals captured in only 1 year; Chizé: 109 samples including 15 individuals captured in 2 years and 79 captured in only 1 year. Figure S1 displays the distribution of abundance of each parasite for each sex class in both populations. Figure S2 displays the abundance distribution of each parasite group for each age class in both populations.

Variation in body condition

The annual average mass of young varied from 15.84 kg in 2012 to 17.42 kg in 2011 at Trois Fontaines and from 12.19 kg in 2011 to 13.21 kg in 2013 at Chizé. Variability among years within a population was thus much smaller than between-population differences. All

physiological parameters studied except hematocrit ([mean \pm SD]: $53.43 \pm 0.36\%$ vs $53.70 \pm 0.45\%$, at Trois Fontaines and Chizé, respectively; $p = 0.651$) were higher at Trois Fontaines than at Chizé (body mass: 21.26 ± 0.30 kg vs 20.10 ± 0.33 kg; albumin: 37.43 ± 0.36 g/L vs 34.31 ± 0.49 g/L; creatinine: 116.50 ± 1.78 $\mu\text{mol/L}$ vs 103.33 ± 2.06 $\mu\text{mol/L}$; fructosamine: 262.09 ± 35.03 $\mu\text{mol/L}$ vs 228.27 ± 36.17 $\mu\text{mol/L}$; all $p < 0.001$).

Figure S1. Distribution of parasite abundance according to sex (males in black and females in grey) within each population (Trois Fontaines: males: n = 78; females: n = 94; Chizé: males: n = 38; females: n = 71).

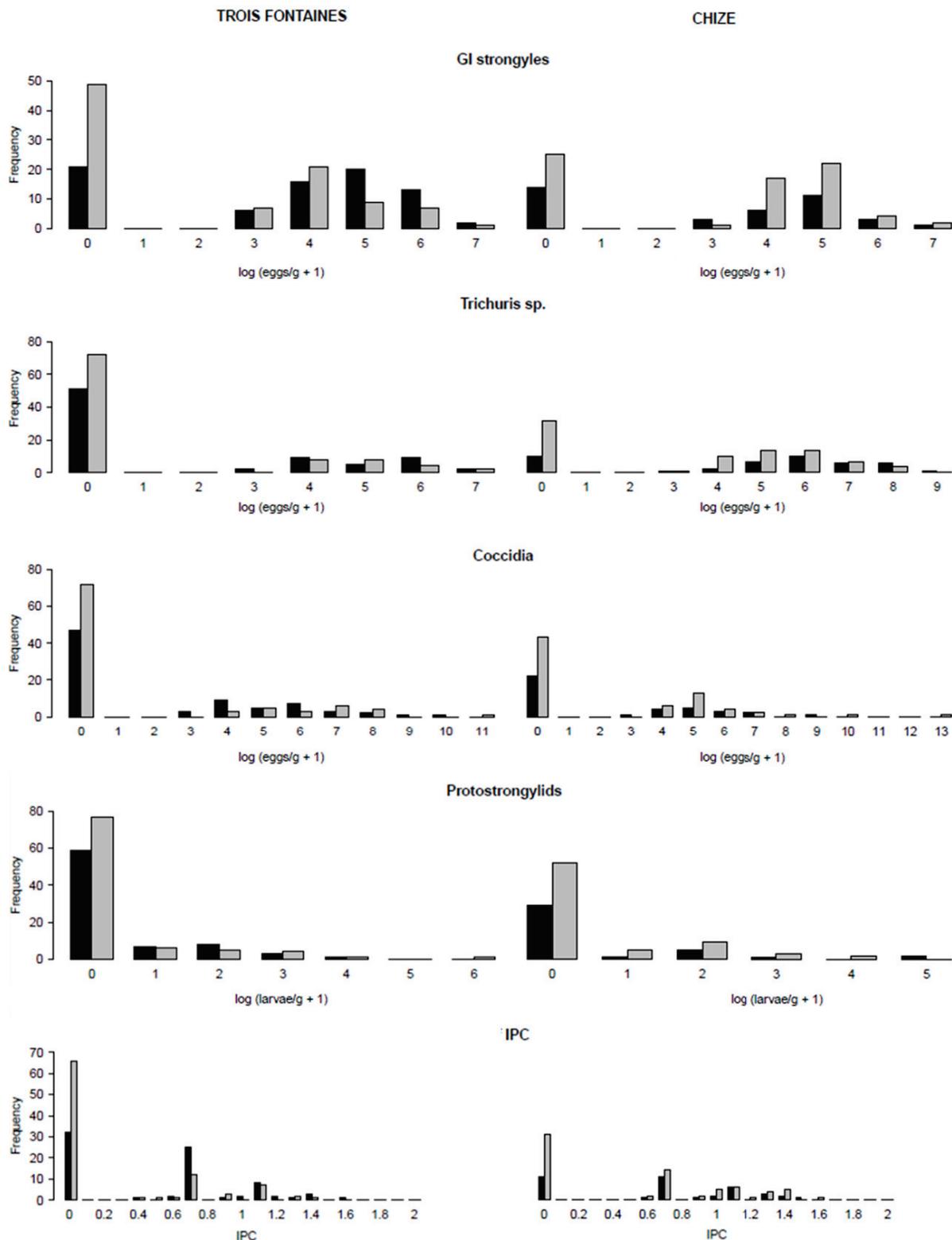


Figure S2. Distribution of parasite abundance according to age (young in black, prime-age in grey and senescent in white) within each populations (Trois Fontaines: young: n = 47; prime-age: n = 95; senescent: n = 30; Chizé: young: n = 26; prime-age: n = 62; senescent: n = 21).

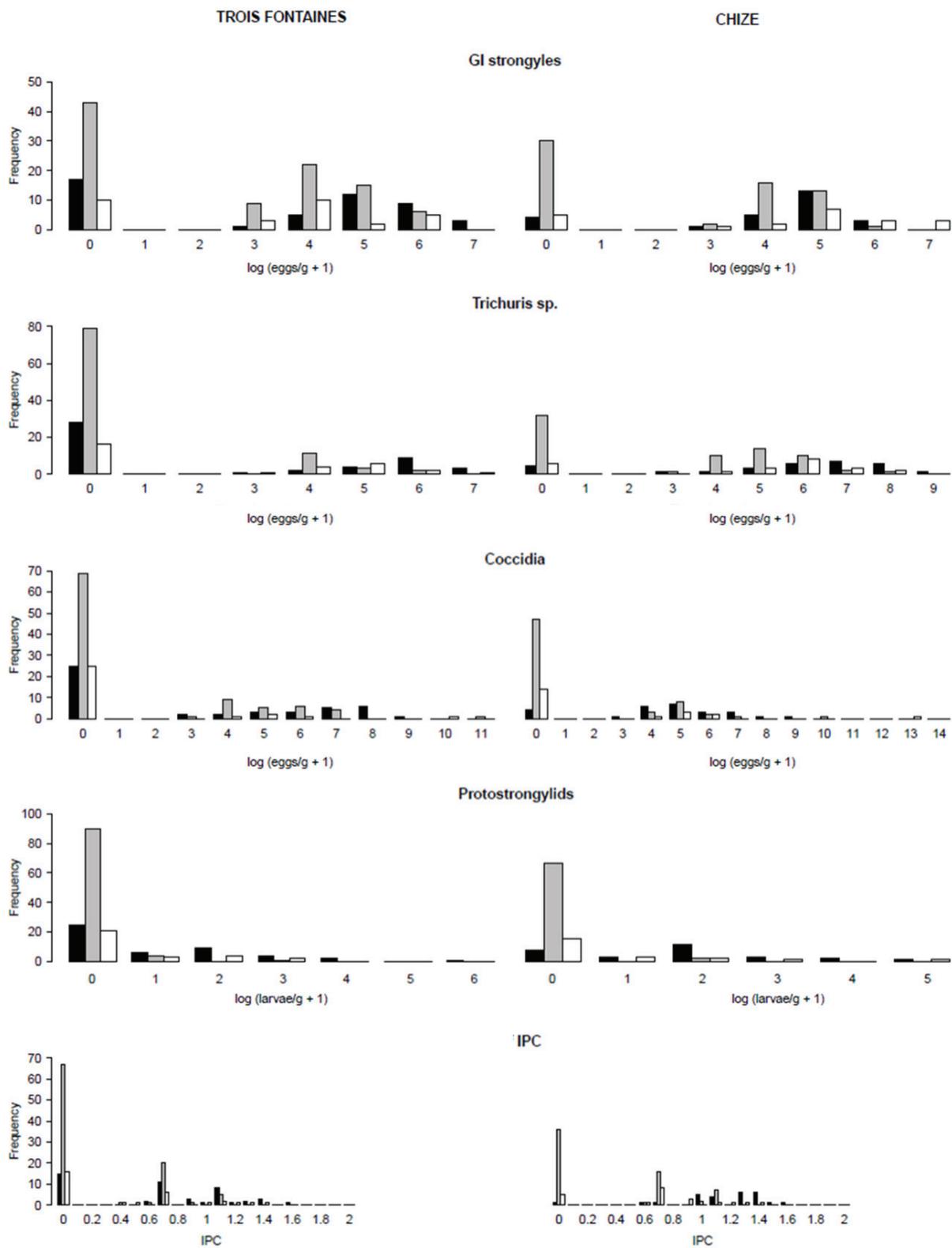


Table S1. Effect of parasites (Par) alone (H1), or in interaction with age (H2), sex (H3) and average mass of young (AMY, H4) on body mass of roe deer in Chizé and Trois Fontaines (France) with parameter estimates and associated standard errors (SE).

Trois Fontaines		Hypothesis				
Control variable		H1	H2	H3	H4	
Age	Sex	Par				
			estimate±SE	estimate±SE	estimate±SE	
			p	p	p	
		GI	p = 0.043 -0.15±0.07	p = 0.529 (Y*GI) -0.16±0.15 (S*GI) -0.12±0.20	p = 0.952 (M*GI) -0.008±0.14	p = 0.995 -0.007±0.11
		T	p = 0.030 -0.17±0.08	p = 0.280 (Y*T) -0.16±0.17 (S*T) -0.13±0.21	p = 0.855 (M*T) -0.02±0.15	p = 0.674 0.07±0.11
(Y) - p < 0.001	(M) +	C	p = 0.989 0.001±0.06	p = 0.171 (Y*C) -0.008±0.12 (S*C) -0.37±0.20	p = 0.947 (M*C) -0.007±0.12	p = 0.841 0.01±0.09
(S) + p < 0.001	p < 0.01	P	p = 0.027 -0.44±0.20	p = 0.424 (Y*P) -0.64±0.70 (S*P) -1.02±0.80	p = 0.431 (M*P) -0.30±0.39	p = 0.910 -0.03±0.25
		IPC	p = 0.025 -0.87±0.38	p = 0.335 (Y*IPC) -0.51±0.82 (S*IPC) -1.40±0.96	p = 0.818 (M*IPC) -0.16±0.71	p = 0.635 0.25±0.41

Chizé

Control variable	Age	Par	Hypothesis			
			H1	H2	H3	H4
			p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE
		GI	p = 0.158 -0.08±0.08	p = 0.141 (Y*GI) -0.04±0.24 (S*GI) -0.41±0.18	p = 0.938 (M*GI) -0.05±0.16	p = 0.936 0.05±0.17
		T	p = 0.077 -0.14±0.06	p = 0.414 (Y*T) -0.06±0.17 (S*T) -0.19±0.18	p = 0.896 (M*T) -0.06±0.12	p = 0.075 0.16±0.14
(Y) - p < 0.001 (S) + p < 0.001		C	p = 0.637 -0.02±0.07	p = 0.401 (Y*C) -0.26±0.20 (S*C) -0.01±0.17	p = 0.167 (M*C) 0.11±0.14	p = 0.738 -0.06±0.15
		P	p = 0.258 -0.32±0.23	p = 0.821 (Y*P) 0.43±1.03 (S*P) -0.51±1.05	p = 0.859 (M*P) -0.28±0.40	p = 0.700 0.41±0.43
		IPC	p = 0.093 -0.74±0.42	p = 0.513 (Y*IPC) -1.17±1.36 (S*IPC) -0.30±1.08	p = 0.119 (M*IPC) -0.28±0.40	p = 0.610 0.40±0.67

Table S2. Effect of parasites (Par) alone (H1), or in interaction with age (H2), sex (H3) and average mass of young (AMY, H4) on hematocrit of roe deer in Chizé and Trois Fontaines (France) with parameter estimates and associated standard errors (SE).

Trois Fontaines		Hypothesis				
Control variable		H1	H2	H3	H4	
Age	Sex	Par	Body mass			
		p	p	p	p	
		estimate±SE	estimate±SE	estimate±SE	estimate±SE	
		GI	p = 0.205 -0.23±0.18	p = 0.578 (Y*GI) -0.39±0.38 (S*GI) -0.07±0.50	p = 0.540 (M*GI) 0.12±0.36	p = 0.380 -0.22±0.26
		T	p = 0.363 -0.17±0.19	p < 0.001 (Y*T) -0.93±0.42 (S*T) -2.03±0.50	p = 0.350 (M*T) -0.33±0.37	p = 0.806 -0.06±0.27
(Y) -				p = 0.223		
p < 0.001	(M) -	C	p = 0.034 -0.30±0.15	(Y*C) -0.10±0.31 (S*C) -0.79±0.49	p = 0.617 (M*C) 0.14±0.28	p = 0.233 0.26±0.22
(S) -	p < 0.001					
p < 0.001	+	P	p = 0.266 -0.54±0.49	p = 0.056 (Y*P) -0.49±1.68 (S*P) -3.30 ±1.91	p = 0.774 (M*P) 0.26±0.93	p = 0.245 0.69±0.61
		IPC	p = 0.060 -1.75±0.94	p = 0.030 (Y*IPC) -2.40±1.98 (S*IPC) -6.08±2.33	p = 0.710 (M*IPC) 0.64±1.71	p = 0.661 0.54±1.25

Chizé

Control variables		Hypothesis					
Age*sex	AMY	Body mass	Par	H1 p estimate±SE	H2 p estimate±SE	H3 p estimate±SE	H4 p estimate±SE
			GI	p = 0.505 -0.14±0.22	p = 0.032 (Y*GI) 0.67±0.58 (S*GI) -1.12±0.54	p = 0.731 (M*GI) -0.15±0.44	p = 0.748 -0.17±0.54
(Y*M) - p < 0.05			T	p = 0.522 -0.10±0.16	p = 0.875 (Y*T) 0.18±0.43 (S*T) 0.19±0.42	p = 0.130 (M*T) -0.48±0.33	p = 0.618 0.26±0.55
(S*M) - p < 0.05	+	+	C	p = 0.689 -0.07±0.18	p = 0.908 (Y*C) -0.21±0.53 (S*C) -0.08±0.45	p = 0.422 (M*C) -0.32±0.42	p = 0.613 -0.20±0.41
	p < 0.001	p < 0.05	P	p < 0.001 -2.07±0.57	p = 0.381 (Y*P) 2.64±2.41 (S*P) 1.52±2.51	p = 0.724 (M*P) -0.39±1.17	p = 0.278 -1.13±1.09
			IPC	p = 0.155 -1.46±1.06	p = 0.424 (Y*IPC) -2.43±3.48 (S*IPC) -3.09±2.63	p = 0.100 (M*IPC) -3.50±2.20	p = 0.291 -2.36±2.32

Table S3. Effect of parasites (Par) alone (H1), or in interaction with age (H2), sex (H3) and average mass of young (AMY, H4) on albumin of roe deer in Chizé and Trois Fontaines (France) with parameter estimates and associated standard errors (SE).

Trois Fontaines		Hypothesis				
Control variable	Sex	H1	H2	H3	H4	
Age		Par	estimate±SE	estimate±SE	estimate±SE	
		GI	p = 0.864 0.02±0.16	p = 0.410 (Y*GI) -0.16±0.35 (S*GI) -0.59±0.45	p = 0.986 (M*GI) -0.005±0.32	p = 0.227 0.31±0.24
		T	p = 0.956 -0.009±0.17	p = 0.407 (Y*T) -0.19±0.39 (S*T) -0.62±0.48	p = 0.510 (M*T) -0.21±0.33	p = 0.507 0.10±0.25
(Y) - p < 0.001	(M) - p < 0.05	C	p = 0.343 -0.12±0.13	p = 0.077 (Y*C) -0.62±0.28 (S*C) -0.28±0.43	p = 0.564 (M*C) 0.14±0.26	p = 0.326 0.17±0.20
(S) - p < 0.001		P	p = 0.696 -0.17±0.44	p = 0.062 (Y*P) -2.41±1.53 (S*P) -4.02±1.74	p = 0.907 (M*P) -0.09±0.85	p = 0.455 0.38±0.56
		IPC	p = 0.714 0.30±0.84	p = 0.106 (Y*IPC) -2.19±1.81 (S*IPC) -4.37±2.12	p = 0.710 (M*IPC) 0.57±1.57	p = 0.360 1.11±1.15

Chizé

Age	Control variable	AMY	Body mass	Par	Hypothesis			
					H1	H2	H3	H4
				p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE	
			+					
			p < 0.05	GI	p = 0.126 -0.38±0.25	p = 0.598 (Y*GI) 0.30±0.68 (S*GI) -0.44±0.62	p = 0.810 (M*GI) -0.11±0.50	p = 0.125 0.89±0.60
			+					
			p < 0.05	T	p = 0.227 -0.24±0.21	p = 0.997 (Y*T) 0.30±0.68 (S*T) -0.44±0.62	p = 0.378 (M*T) -0.36±0.43	p = 0.529 0.36±0.60
(Y) +			+					
p < 0.01			p < 0.05	C	p = 0.429 2.74±2.06	p = 0.859 (Y*C) -0.27±0.57 (S*C) -0.18±0.50	p = 0.598 (M*C) -0.24±0.49	p = 0.268 0.47±0.45
(S) -			+					
p < 0.01			p < 0.05	P	p = 0.383 -0.55±0.65	p = 0.867 (Y*P) -0.62±2.66 (S*P) -1.21±2.80	p = 0.830 (M*P) 0.23±1.12	p = 0.785 -0.33±1.25
			+					
			p < 0.05	IPC	p = 0.272 -1.38±1.29	p = 0.487 (Y*IPC) -3.89±3.70 (S*IPC) -2.36±3.25	p = 0.798 (M*IPC) -0.53±2.17	p = 0.233 3.05±2.63

Table S4. Effect of parasites (Par) alone (H1), or in interaction with age (H2), sex (H3) and average mass of young (AMY, H4) on creatinine of roe deer in Chizé and Trois Fontaines (France) with parameter estimates and associated standard errors (SE).

Trois Fontaines		Hypothesis			
Control variable	Par	H1	H2	H3	H4
Age	AMY	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE
	GI	p < 0.001 -2.93±0.80	p = 0.147 (Y*GI) -3.22±1.70 (S*GI) -0.34±2.19	p = 0.035 (M*GI) 3.31±1.59	p = 0.730 -0.40±1.18
	T	p = 0.132 -1.30±0.87	p = 0.545 (Y*T) -1.02±2.00 (S*T) -2.59±2.40	p = 0.122 (M*T) 2.54±1.67	p = 0.783 -0.33±1.52
(Y) - p < 0.05	-	p = 0.833 0.14±0.69	p = 0.595 (Y*C) -1.35±1.43 (S*C) -1.34±2.19	p = 0.556 (M*C) 0.77±1.33	p = 0.412 0.86±1.06
(S) - p < 0.05	P	p < 0.001 -7.54±2.18	p = 0.940 (Y*P) 2.63±8.58 (S*P) 2.41±7.56	p = 0.580 (M*P) 2.22±4.10	p = 0.126 4.11±2.72
	IPC	p < 0.001 -13.90±4.03	p = 0.094 (Y*IPC) -19.04±8.91 (S*IPC) -7.47±10.47	p = 0.011 (M*IPC) 18.99±7.54	p = 0.696 -2.17±5.64

Chizé

Control variable	Par	Hypothesis			
		H1	H2	H3	H4
Body mass	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE
GI	p = 0.036 -1.80±0.87	p = 0.265 (Y*GI) 3.72±2.31 (S*GI) 1.49±2.26	p = 0.639 (M*GI) 0.80±1.75	p = 0.572 1.22±2.17	
	T	p = 0.217 -0.83±0.68	p = 0.568 (Y*T) 0.56±1.33 (S*T) -1.02±1.15	p = 0.776 (M*T) -0.36±1.32	p = 0.032 4.66±2.18
C	p = 0.869 -0.12±0.75	p = 0.980 (Y*C) -0.39±2.15 (S*C) -0.006±1.85	p = 0.843 (M*C) -0.30±1.42	p = 0.060 3.08±1.64	
	P	p = 0.616 1.14±2.29	p = 0.473 (Y*P) 9.89±10.19 (S*P) 5.26±10.60	p = 0.953 (M*P) -0.22±4.16	p = 0.368 4.11±4.68
IPC	p = 0.205 -5.24±4.18	p = 0.509 (Y*IPC) 15.24±13.84 (S*IPC) 5.48±11.40	p = 0.787 (M*IPC) 1.96±7.37	p = 0.329 9.55±9.78	

+

p < 0.001

Table S5. Effect of parasites (Par) alone (H1), or in interaction with age (H2), sex (H3) and average mass of young (AMY, H4) on fructosamine of roe deer in Chizé and Trois Fontaines (France) with parameter estimates and associated standard errors (SE).

Trois Fontaines		Hypothesis				
Control variable	AMY	Par	H1	H2	H3	H4
Age			p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE	p estimate±SE
		GI	p = 0.205 -1.38±1.10	p = 0.315 (Y*GI) -3.28±2.29 (S*GI) -0.16±2.96	p = 0.482 (M*GI) -1.49±2.15	p = 0.277 1.68±1.57
		T	p = 0.534 0.70±1.14	p = 0.646 (Y*T) -2.37±2.64 (S*T) -0.89±3.17	p = 0.418 (M*T) -1.76±2.21	p = 0.442 -1.25±1.64
(Y) - p < 0.05 (S) + p < 0.05	+ p < 0.001	C	p = 0.358 0.82±0.89	p = 0.015 (Y*C) -1.70±1.83 (S*C) 6.28±2.76	p = 0.580 (M*C) 0.93±1.73	p = 0.411 1.12±1.39
		P	p = 0.674 -1.23±2.93	p = 0.446 (Y*P) -12.73±10.03 (S*P) -9.65±11.41	p = 0.982 (M*P) 0.12±5.58	p = 0.580 -4.58±3.66
		IPC	p = 0.858 0.94±5.43	p = 0.025 (Y*IPC) -31.72±11.94 (S*IPC) -10.76±14.04	p = 0.969 (M*IPC) -0.44±10.38	p = 0.529 -4.73±7.60

Chizé

Control variable AMY	Par	Hypothesis			
		H1 p estimate±SE	H2 p estimate±SE	H3 p estimate±SE	H4 p estimate±SE
GI		p = 0.116	p = 0.794	p = 0.464	p = 0.357
		-2.07±1.33	(Y*GI) -2.46±3.83 (S*GI) -1.08±3.49	(M*GI) -2.00±2.79	3.07±3.40
T		p = 0.053	p = 0.230	p = 0.672	p = 0.201
		-2.04±1.06	(Y*T) -0.96±2.72 (S*T) -4.33±2.98	(M*T) 0.90±2.19	4.14±3.29
C		p = 0.265	p = 0.723	p = 0.742	p = 0.038
		-1.19±1.08	(Y*C) -1.23±3.20 (S*C) 1.35±2.78	(M*C) -0.76±2.38	5.04±2.45
P		p = 0.494	p = 0.800	p = 0.852	p = 0.647
		-2.06±3.06	(Y*P) 6.90±14.88 (S*P) -9.81±15.64	(M*P) 1.09±6.00	3.14±7.00
IPC		p = 0.056	p = 0.510	p = 0.915	p = 0.185
		-10.53±5.55	(Y*IPC) -22.89±20.59 (S*IPC) -7.93±18.10	(M*IPC) -1.21 ±11.82	19.06±14.61

3. Haematological parameters do senesce in the wild: evidence from different populations of a long-lived mammal (Article 3)

Maël Jégo^{1,2*}, Jean-François Lemaître¹, Gilles Bourgoïn^{1,2}, Gilles Capron³, Claude Warnant³, François Klein³, Emmanuelle Gilot-Fromont^{1,2}, Jean-Michel Gaillard¹

En révision dans Journal of Evolutionary Biology

¹*Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France*

²*Université de Lyon, VetAgroSup, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France*

³*Office Nationale de la Chasse et de la Faune Sauvage, Centre National de Recherches Appliquées sur les Cervidés-Sanglier, 1 Place Exelmans, F-55000 Bar-le-duc, France*

* Corresponding author: Maël Jégo: mael.jego@vetagro-sup.fr or jego.mael@gmail.com;

Tel: +33 (0)4 72 44 80 18; Fax: +33 (0)4 72 43 13 88

3.1. Abstract

Increasing evidence of senescence has been reported from long-term studies of wild populations. However, most studies have focused on life history traits like survival, reproduction or body mass, generally from a single intensively monitored population. However, variation in the intensity of senescence across populations, and to a lesser extent between sexes, is still poorly understood. In addition, the pattern of age-specific changes in haematological parameters remains virtually unknown to date for any population of vertebrate living in the wild. Using repeated blood samples collected from known-aged (2 to 15 years of age) roe deer (*Capreolus capreolus*) from two populations facing highly different environmental conditions, we filled the gap. In particular, we investigated age-specific changes in hematocrit, albumin and creatinine. We reported clear evidence of senescence in all haematological parameters. Moreover, senescence patterns differed between sexes and populations. The rate of senescence was higher in males than in females for hematocrit with no site difference. On the other hand, the rate of senescence in creatinine was higher at Trois Fontaines than at Chizé with no sex difference. Our findings provide a first demonstration of age-specific declines in haematological parameters in wild populations of large herbivores, and show that the process of senescence in vertebrates is not restricted to body mass or fitness components. We also demonstrate that the senescence pattern of haematological parameters is context-dependent and varies both between sexes and according to environmental conditions.

Keywords: albumin, aging, *Capreolus capreolus*, hematocrit, life-history, roe deer, vertebrate

3.2. Introduction

The process of senescence is commonly defined as a deterioration of cellular and physiological functions with increasing age, progressively leading to a decline in performance-related traits, such as reproduction or survival (Monaghan et al. 2008). A large number of case studies have now documented senescence in wild vertebrates but these studies remain mostly focused on actuarial (i.e. survival) and reproductive senescence (see Nussey et al. 2013 for a recent review). Therefore, compared to humans or model organisms, very little is known about the potential decline in physiological parameters with increasing age in animals living in the wild that often suffer from harsh climatic conditions and resource limitation. Among physiological parameters, haematological parameters are particularly relevant since they are known to reflect not only body condition (Ezenwa et al. 2012) but also reproductive (Ots et al. 1998; Nadolski 2006) and survival (Milner et al. 2003) performances. However, age-specific declines in such traits in wild mammals remain poorly studied, whereas senescence in the level of hemoglobin has already been reported in humans (Eisenstaedt et al. 2006). Until now, the few studies that have investigated age-dependence in haematological parameters in wild mammalian species simply compared young and adults and often failed to detect an age effect (e.g. Rosef et al. (2004) in free-ranging red deer, *Cervus elaphus*; López-Olvera et al. (2006) in chamois, *Rupicapra pyrenaica*, Rafaj et al. (2011) in captive red deer, *Cervus elaphus*). To our knowledge, only one study has provided evidence of age-related decline in haematological parameters, which involved a decrease of the mean hematocrit and hemoglobin values of reindeer (*Rangifer tarandus granti*) and caribou (*Rangifer tarandus*) with age (McEwan and Whitehead 1969). However, this study was performed on captive animals and there is evidence that the care provided in zoos can influence biological performance when compared to wild animals (Lemaître et al. 2013). Therefore, studying senescence patterns of haematological parameters in the wild, would

allow understanding whether and how age-related declines in physiological parameters underpin the process of reproductive and actuarial senescence commonly reported in free-ranging populations of vertebrates (Nussey et al. 2013).

We aimed here to fill the gap by providing an analysis of full age-dependence in haematological parameters in a wild mammal. We used data collected in two populations of roe deer (*Capreolus capreolus*) intensively monitored at the individual level (Chizé and Trois Fontaines in France, see Gaillard et al. 2003) to assess age-specific changes in three haematological parameters. The roe deer is a particularly relevant model because senescence in survival and reproduction has been repeatedly reported in these populations (Gaillard et al. 1993; Loison et al. 1999), but the underlying factors causing these declines in performance remain unidentified. We first measured hematocrit, which is the fraction of whole blood comprised of erythrocytes that provides information about individual nutritional status and reflects an animal's oxygen-carrying capacity in muscle (Del Giudice et al. 1992). Moreover, hematocrit may contribute to individual fitness. Indeed, although the relationship between hematocrit and survival could involve non-linearities (Bowers et al. 2014), there is evidence that a reduction of hematocrit concentration can cause a decrease of ability to carry oxygen leading to a reduction of cardiac efficiency (Birchard 1997; Schuler et al. 2010). Second, we investigated albumin, which plays a key role in maintaining osmotic pressure and fluid distribution between blood vessels and tissues. As albumin is the most abundant blood protein, albuminemia is a reliable indicator of nutritional status in ruminants and hypoalbuminemia reveals a cachectic state resulting from starvation (Stockham and Scott 2008). Third, we measured the concentration of creatinine in the plasma. Creatinine is the result of creatine degradation in muscular cells and is eliminated through the glomerular filtration in kidneys (Stockham and Scott 2008). Variations in the level of creatinine reflect

total body muscle mass, and is negatively related to the efficiency of the renal filtration (Stockham and Scott 2008).

After providing clear evidence of senescence in these haematological parameters, we compared senescence patterns in both absolute and relative (to body mass) scales between populations and between sexes. Senescence in body mass has been recently reported to occur in females of wild large herbivores, including roe deer (Nussey et al. 2011). In addition, Gilot-Fromont et al. (2012) showed that body mass is associated with haematological parameters among roe deer. Therefore, haematological parameters should decrease with increasing age more strongly when analyzed on an absolute scale than relative to body mass. If changes in body mass capture the whole age-specific variation in physiological parameters, we expect haematological parameters to remain constant with age once body mass variation has been accounted for.

Environmental conditions can influence both the timing and the intensity of senescence in survival and reproduction in wild vertebrates (Nussey et al. 2007; Bouwhuis et al. 2010). For instance, in large herbivores, species feeding mostly on grass have higher rates of actuarial senescence in free-ranging conditions than in protected environments (Lemaître et al. 2013). The two roe deer populations we studied live in different environments with a poor habitat quality in the Chizé forest and a highly productive habitat in the Trois Fontaines forest (Pettorelli et al. 2006). We previously reported that haematological parameters and body mass were lower in Chizé than in Trois Fontaines (Gilot-Fromont et al. 2012), suggesting that resource availability does influence haematological parameters. However, the influence of habitat quality on patterns of physiological senescence has remained unexplored. In addition, senescence patterns often differ between sexes both in invertebrates (e.g. Zajitschek et al. 2009) and vertebrates (Loison et al. 1999; Lemaître and Gaillard 2013), for which a steeper rate of actuarial senescence is commonly observed in males compared to females. The roe

deer is not an exception to the rule (Gaillard et al. 1993). However, evolutionary causes of between-sex differences remain unclear and debated (Maklakov and Lummaa 2013). So far, sex-differences in physiological senescence have only been documented in humans with a less pronounced decline of hemoglobin in women compared to males (Nilsson-Ehle et al. 2000). Assessing whether physiological senescence occurs in mammals in the wild would improve our understanding of the sex-differences in age-specific survival, because the diversity of environmental conditions in the wild is likely to modify senescence patterns reported from laboratory or captive conditions (Kawasaki et al. 2008; Lemaître et al. 2013).

Overall, we predict that i) haematological parameters (i.e. hematocrit, albumin and creatinine concentration) should decline with increasing age for both sexes in both populations according to the only study of haematological parameters performed so far in a wild mammal species in captive conditions (i.e. McEwan and Whitehead 1969 on reindeer, *Rangifer tarandus*) and according to studies in humans (e.g. Eisenstaedt et al. 2006), ii) a more intense senescence in haematological parameters in the population with more limited resources (Chizé) than in the population with more favorable environmental conditions (Trois Fontaines), iii) a steeper rate of senescence in physiological parameters in males than in females, and iv) a steeper decrease of haematological parameters with age when considering an absolute scale than relative to body mass.

3.3. Material and methods

3.3.1. Ethics

All necessary permits were obtained for the described field studies. The protocol of capture and blood sampling of roe deer were performed under the authority of the ONCFS and have been approved by the Director of Food, Agriculture and Forest (Prefectoral order 2009-14 from Paris). This permission is given at the national level. The land manager of both sites, the

Office National des Forêts (ONF), authorized the study of the population (Partnership Convention ONCFS-ONF dated 2005-12-23).

3.3.2. Study sites

We used data from two contrasting populations of European roe deer. Both sites are enclosed forests managed by the Office National des Forêts, in which roe deer populations have been intensively monitored by the Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage since more than three decades.

The Réserve Biologique Intégrale of Chizé is a 2,614-ha enclosed forest located in western France (46°05'N, 0°25'W). This site has a temperate oceanic climate, with Mediterranean influences, including mild winters and hot dry summers. The forest has a low productivity due to poor quality soils and frequent summer droughts (Pettorelli et al. 2006) and thus offers a poor habitat to roe deer. In contrast, the Territoire d'Etude et d'Expérimentation of Trois Fontaines (1,360 ha), located in North-Eastern France (48°43'N, 4°55'E), has a continental climate characterized by moderately severe winters, and warm and rainy summers. This site has high quality soils and offers habitats of high quality to roe deer.

3.3.3. Data collection

Roe deer are small, forest-dwelling cervids with a low sexual size dimorphism. Only males carry antlers. Roe deer can live up to 14 (males) and 17 (females) years (Loison et al. 1999). Survival of roe deer is low and variable from birth to weaning (Plard et al. 2014), increases up to 2 years of age, when it remains quite high and constant for about 6 years (prime-age stage), and then decreases from 8 years of age onwards (senescent stage) (Gaillard et al. 1993). Roe deer start reproducing at 2 years of age, but while most females give birth (generally to twins) at 2 years of age, most males become territorial and thus mate only from 3 years of age onwards (Andersen et al. 1998).

The study period was December 2009 to March 2013. Every winter (December–March), roe deer were captured using drive netting (see Gaillard et al. 1993 for further details). Captured roe deer were identified, sexed and weighed. We collected 4 mL of blood (EDTA and serum tube) at the jugular vein of each adult known-aged roe deer caught. Blood samples were stored between 4 and 6 degrees, then were received at the laboratory within 40 hours and analyzed within 4 hours after reception. Haematological and biochemical assays were performed at the Biochemical and Endocrinological laboratory, VetAgro-Sup, France. We obtained complete blood counts using an ABC Vet automaton (Horiba Medical, Montpellier, France). Red blood cell counts were measured by impedance technology considering parameters for bovine samples. Hemoglobin concentration was measured following cyan methaemoglobin conversion at 550 nm. Hematocrit (%) was calculated by numeric integration. Biochemical parameters were analyzed with a Konelab K30 ISE automatic analyser (Thermo Electron SAS, Clinical Chemistry & Automation Systems, Eragny Parc, BP 249, 95615 Cergy-Pontoise, France). Creatinine, in $\mu\text{mol/L}$, was measured by enzymatic photometric determination at 540 nm using the reagents Creatinine (Enzymatic) 98 18 45 provided by Thermo Electron SAS. The measuring range is 10-10,000 $\mu\text{mol/L}$, the detection limit (zero sample + 3 SD) is 2 $\mu\text{mol/L}$ and the within-run and between-run errors ranged between 0.3% and 2.1%. Proteins (albumin in g/L) were separated and quantified by electrophoresis, performed using an automatic gel electrophoresis processor HYDRASYS (Sebia, Parc Technologique Léonard de Vinci, CP8010 Lises, 91008 Evry Cedex). Total proteins were measured with a refractometer.

3.3.4. *Data analysis*

To assess age-specific changes in haematological parameters, we included each of these parameters at a time as the response variable, age as a covariate, and both year of sampling and individual identity as random effects to avoid pseudo-replication issues (sensu Hurlbert

1984) and thereby associated confounding effects of individual heterogeneity (Van de Pol and Verhulst 2006), and to account for possible differences in the assays across years.

To assess senescence, we only included roe deer from 2 years of age onwards, i.e. having reached the minimum age generally required to reproduce (Gaillard et al. 1992 on females, Vanpé et al. 2009 on males). All haematological parameters investigated correlated each other on a statistical basis, but the strength of the correlation was consistently weak (Appendix 1, Table S1). We calculated repeatability as the ratio of the between-group variance over the sum of between-group variance and within-group variance (Nakagawa and Schielzeth 2010). Moreover, haematological parameters for fawns were consistently lower than those of adults, although not always on a statistical basis at Trois Fontaines from using Student-t tests (Chizé: mean of hematocrit (in %): 51.48 ± 0.65 for fawns, 53.95 ± 0.39 for adults ($t_{215} = 3.22$; $P = 0.001$); mean of albumin (g/L): 31.78 ± 0.66 for fawns, 34.46 ± 0.35 for adults ($t_{215} = 4.02$; $P = 0.0001$); mean of creatinine ($\mu\text{mol/L}$): 84.27 ± 2.04 for fawns, 107.94 ± 1.63 for adults ($t_{215} = 7.74$; $P < 0.0001$); Trois Fontaines: mean of hematocrit (in %): 53.77 ± 0.60 for fawns, 53.74 ± 0.39 for adults ($t_{238} = -0.03$; $P = 0.970$); mean of albumin (g/L): 35.35 ± 0.49 , for fawns, 37.43 ± 0.37 for adults ($t_{238} = 3.37$; $P = 0.0009$); mean of creatinine ($\mu\text{mol/L}$): 117.70 ± 3.45 for fawns, 119.13 ± 1.69 for adults ($t_{238} = 0.37$; $P = 0.710$). To avoid overly complex age-specific models, we excluded haematological parameters of fawns from this analysis of senescence patterns. Although the three haematological parameters were inter-related in a statistically significant way (Table S1), the highest correlation (0.34) was below the threshold above which multicollinearity problems have to be accounted for (Graham 2003).

To assess age-specific variation in haematological parameters, we fitted models with different onsets of senescence: a linear or quadratic change from 2 years of age (first age to reproduce) onwards, and a linear or quadratic change from 8 years of age (onset of actuarial

senescence in roe deer, Festa-Bianchet et al. 2003) onwards. Two-way interactions among age, sex, and site were included. To assess the specific impact of body mass on haematological parameters, the procedure of model selection was performed both with and without including body mass as a covariate. The model with the lowest AIC was selected. When two competing models had a difference in AIC less than 2, we retained the model with the lowest number of parameters to satisfy the parsimony criterion (Burnham and Anderson 2002).

All analyses were carried out in R, v. 2.15.3 (R Development Core Team, 2013). Results are presented as mean \pm standard error.

3.4. Results

We collected 47 blood samples in 2010, 91 blood samples in 2011, 73 blood samples in 2012 and 109 in 2013. We analyzed senescence patterns in haematological parameters from 170 blood samples at Trois Fontaines (67 samples from males including 1 individual captured in three different years, 14 individuals captured in two different years and 36 individuals captured only once; and 103 samples from females including 8 individuals captured in three different years, 17 individuals captured in two different years, and 45 individuals captured only once) and 150 blood samples at Chizé (54 samples from males including 2 individuals captured in three different years, 6 individuals captured in two different years, and 36 individuals captured only once; and 96 samples from females including 1 individual captured in four different years, 6 individuals captured in three different years, 15 individuals captured in two different years and 44 individuals captured only once). The repeatability differed among haematological parameters, being lowest for albumin (hematocrit: 0.43; albumin: 0.17; creatinine: 0.34). There was no detectable differences of sex distribution between sites ($\chi^2 = 0.395$; $P = 0.530$). The age distribution differed between sites ($\chi^2 = 24.441$; $P = 0.002$)

(Appendix 1, Table S2) because of an excess of very young (2 years-old) and very old (older than 10 years of age) roe deer at Trois Fontaines compared to Chizé. However, roe deer aged 7 to 9 were over-represented at Chizé, leading the proportion of old individuals to be similar in both sites.

As expected, we found evidence of senescence in body mass in both sexes and in both populations (Appendix 1, Table S3). Patterns of senescence in body mass were similar across males of both populations (Wald test: difference of slope = 0.04; $t_{130} = 0.84$; $P = 0.159$, Appendix 1, Table S3, Table 1) and between males and females at Chizé (Wald test: difference of slope = 0.05; $t_{185} = 1.76$; $P = 0.08$, Appendix 1, Table S3, Table 1). Haematological parameters for males tended to be slightly lower than those of females (mean of hematocrit (in %): 52.77 ± 5.43 for males, 54.56 ± 5.17 for females; mean of albumin (g/L): 34.96 ± 5.20 for males, 37.04 ± 4.81 for females; mean of creatinine ($\mu\text{mol/L}$): 109.70 ± 22.51 for males, 114.41 ± 23.16 for females). Senescence patterns varied widely among haematological parameters (see below) but each of the three parameters we studied increased with increasing body mass (Table 2). For all haematological parameters, the model including body mass was selected when compared to the equivalent model without body mass (for hematocrit: $\Delta\text{AIC} = 4.405$, for albumin: $\Delta\text{AIC} = 4.995$, for creatinine: $\Delta\text{AIC} = 12.831$, Table S4).

3.4.1. Hematocrit

For hematocrit, we selected the model including body mass and a quadratic effect of age with interactive effects between the quadratic term and sex. Hematocrit increased with body mass (slope of 0.30 ± 0.12 , Table 2) and was higher in males than in females (difference of 0.03 ± 0.01) (Table 2, Fig. 1a). Senescence in hematocrit started at around 7 years of age for roe deer females, and at around 6 years for roe deer males. Senescence rates in hematocrit did not differ between sites.

3.4.2. *Albumin*

For albumin, we selected the model including body mass, site and a quadratic effect of age. Albumin increased with body mass (slope of 0.19 ± 0.10 , Table 2) and was higher at Trois Fontaines than at Chizé (difference of 2.08 ± 0.54). The rate of senescence did not differ between sexes or sites (Table 2, fig. 1b). Senescence in albumin started at around 4 years of age for roe deer females and males.

3.4.3. *Creatinine*

For creatinine, we selected the model including body mass, sex and a linear effect of age with interactive effects between the linear term and site. Creatinine increased with body mass (slope of 2.12 ± 0.55 , table 2) and was lower in males than in females (difference of -7.07 ± 2.52). The senescence rate was higher in Trois Fontaines (-3.54 ± 0.52) than in Chizé (-1.46 ± 1.37) (Table 2, fig. 1c). Moreover, no interaction between sex and age occurred.

Table 1. Threshold regressions of body mass on age in both sexes and both populations.

Displayed is the senescence rate (with standard errors).

Parameter	Sex		Trois Fontaines $\beta \pm SE$	Chizé $\beta \pm SE$
Body mass		intercept	20.00 \pm 0.95	16.65 \pm 0.80
	Males	Age	1.58 \pm 0.36	1.41 \pm 0.29
		age ²	-0.11 \pm 0.02*	-0.07 \pm 0.02
		intercept	20.70 \pm 0.70	15.25 \pm 0.78
	Females	Age	0.62 \pm 0.24	1.72 \pm 0.27
		age ²	-0.03 \pm 0.01*	-0.12 \pm 0.02*

*indicates statistically significant Wald tests when comparing models

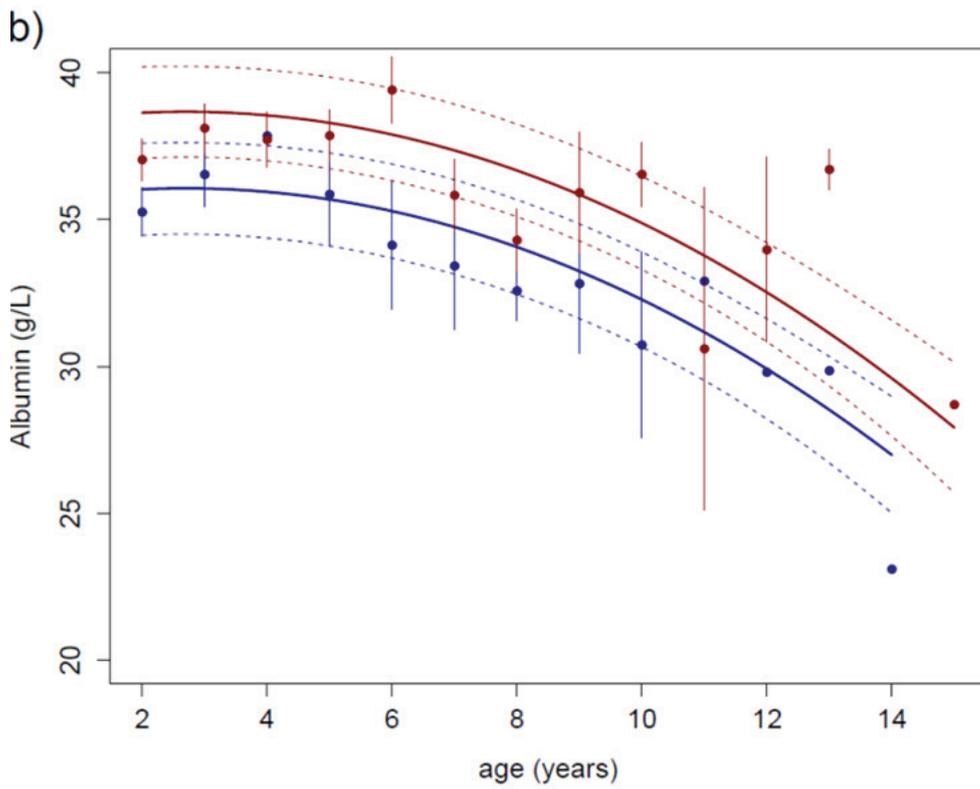
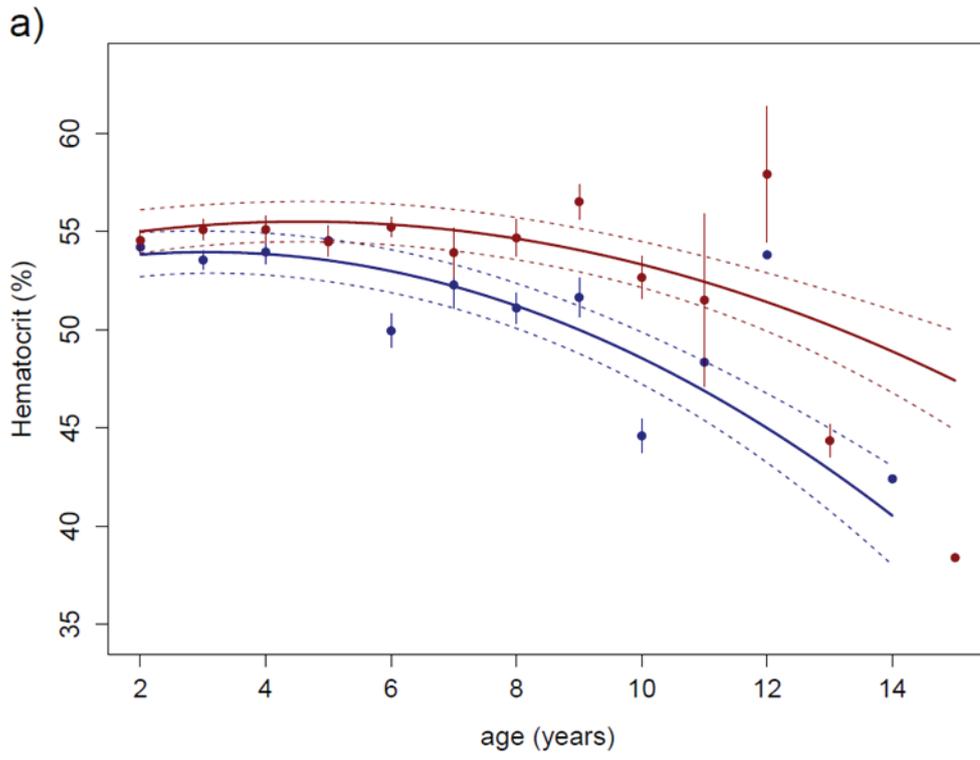
Table 2. Effect of age alone or in interaction with sex or site on haematological parameters with parameter estimates (β), associated standard errors (SE), and statistical significance of the effect sizes (p-values of Wald tests).

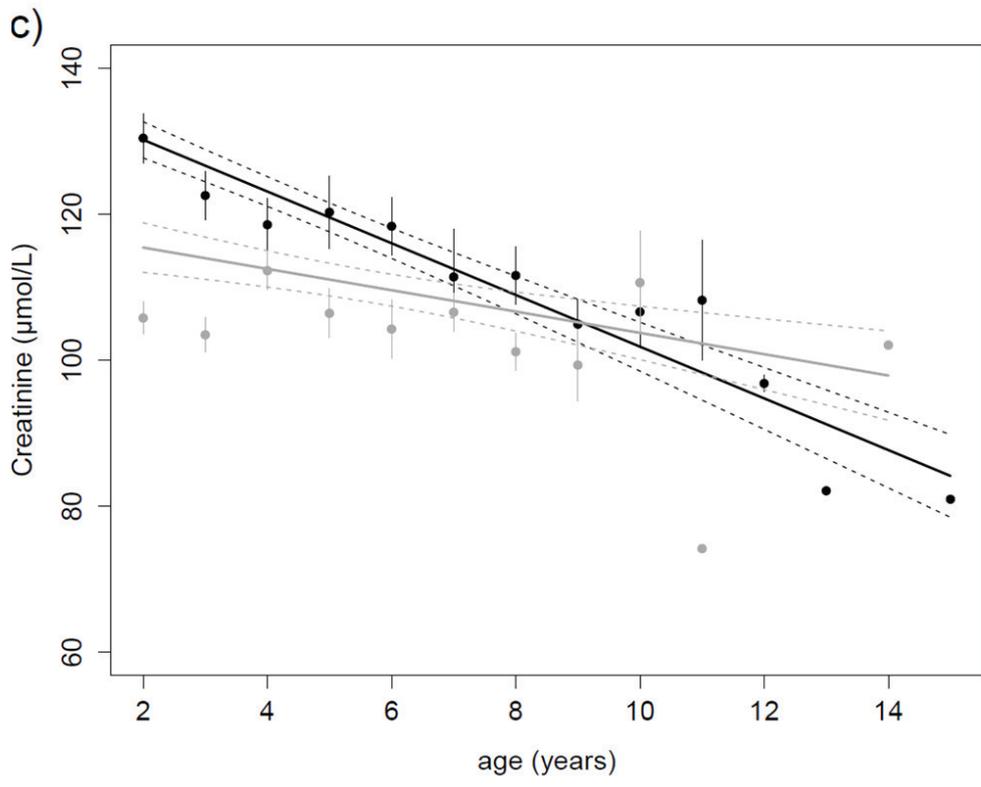
Haematological Parameter	Variable	$\beta \pm SE$	P
Hematocrit	Intercept	45.60 \pm 2.63	P<0.001
	Sex (Males)	-1.02 \pm 0.79	P=0.197
	Age (years)	0.68 \pm 0.37	P=0.066
	Age ²	-0.07 \pm 0.03	P=0.020
	Body mass	0.37 \pm 0.11	P=0.018
	Sex(Males):age ²	-0.03 \pm 0.01	P=0.003
Albumin	Intercept	33.81 \pm 2.63	P<0.001
	Site(Chizé)	-2.08 \pm 0.54	P<0.001
	Sex (Males)	-2.60 \pm 0.44	P<0.001
	Age (years)	0.38 \pm 0.31	P=0.220
	Age ²	-0.07 \pm 0.02	P<0.001
	Body mass	0.19 \pm 0.10	P=0.057
Creatinine	Intercept	86.31 \pm 13.00	P<0.001
	Site (Chizé)	-14.01 \pm 5.20	P=0.007
	Sex (Males)	-7.51 \pm 2.43	P=0.002
	Age (years)	-3.74 \pm 0.49	P<0.001
	Body mass	2.31 \pm 0.52	P<0.001
	Site(Chizé):age	2.20 \pm 0.81	P=0.007

Fig. 1. Age-related decline in haematological parameters.

Senescence patterns of hematocrit (%) and albumin (g/L) in male and female roe deer (respectively (a) and (b)) with predictions based on the model selected by AIC (blue points corresponding to the average value per age for males, blue line corresponding to the predicted values for males and dotted blue lines corresponding to standard errors for males; red points corresponding to the average value per age for females, red line corresponding to the predicted values for females and dotted red lines corresponding to standard errors for females).

Senescence patterns of creatinine ($\mu\text{mol/L}$) in roe deer at Trois Fontaines and Chizé (c) with predictions based on the model selected by AIC (black points corresponding to the average value per age at Trois Fontaines, black line corresponding to the predicted values at Trois Fontaines and dotted black lines corresponding to standard errors at Trois Fontaines; grey points corresponding to the average value per age at Chizé, grey line corresponding to the predicted values at Chizé and dotted grey lines corresponding to standard errors at Chizé).





3.5. Discussion

Our study reveals clear evidence that haematological parameters do show senescence in mammalian populations in the wild, and adds to the compelling evidence that ageing can impact a large range of phenotypic traits in wild populations, including reproductive performance (e.g. Gaillard et al. 2003), immunological performance (e.g. Nussey et al. 2012), body mass (e.g. Nussey et al. 2011) or secondary sexual traits (e.g. Vanpé et al. 2007).

Our results obtained in two different populations and over a large range of ages (from 2 to 15 years) show that in roe deer, haematological parameters are decreasing from prime to old ages with different intensity depending on the focal parameter, sexes, populations and on the scale at which haematological parameters are considered (absolute or relative to body mass). In accordance with our first prediction, all haematological parameters investigated declined with increasing age. In roe deer, there is also evidence of senescence in survival from 7-8 years of age onwards in both sexes at Chizé and Trois Fontaines (Gaillard et al. 1993; Loison et al. 1999; Gaillard et al. 2004), and evidence of senescence in fecundity from 8 years onwards for females (Hewison and Gaillard 2001). Senescence in body mass starts at around 9 years of age for roe deer females at Trois Fontaines, and then accelerates at 13 years of age (Nussey et al. 2011). With our restricted dataset, senescence in body mass occurred at around 7 years of age for males and 9 years of age for females at Trois Fontaines, but started at around 7 years for females and 9 years for males at Chizé (Fig. S1). Therefore, age-related declines in hematocrit we reported for males and females in both populations closely match age-specific declines in body mass of female roe deer but albumin and creatinine concentrations started to decrease at an earlier age than body mass (Fig. 1b and 1c).

In large herbivores, increasing tooth wear with age causes a decrease in food intake (Kojola et al. 1998), which leads to a decrease in the amount of nutrients available for the metabolism (Sams et al. 1998) and probably a decrease in physiological parameters. Both

nutrient deficiencies and chronic parasitism were thus probably acting in the studied populations. Moreover, these two causes should interact, as food restriction is likely to cause a low body condition, associated to low values of neutrophil/lymphocyte ratio, haptoglobin, alpha-2 globulin and eosinophils in the studied populations (Gilot-Fromont et al. 2012). The decrease in immune functions related to the lack of energy should in turn increase parasitism, giving rise to a vicious circle (Beldomenico and Begon 2010). We still found evidence of senescence in haematological parameters after having accounted for body mass variation with age although a positive co-variation occurred between body mass and physiological parameters (Gilot-Fromont et al. 2012). Nussey et al. (2011) suggested that a decline in body mass could involve the loss of muscle mass with age. McArdle et al. (2002) showed that creatinine is a by-product of muscle metabolism and evidence of a decline in muscles with age has recently been reported in mammals (Hindle et al. 2009 on shrews, *Blarina brevicauda* and *Sorex palustris*; Hindle et al. 2010 on shrews, *Blarina brevicauda*). However, the senescence pattern of creatinine we reported for roe deer does not appear to be closely linked with body mass and consequently with muscle loss. Senescence in haematological parameters and senescence in body mass could thus involve different mechanisms. Indeed, the decline of haematological parameters could involve the accumulation of deterioration of cellular damage, whereas the decline of body mass in wild populations could involve a loss of skeletal mass, tooth wear, or foraging behavior (Nussey et al. 2011).

On the contrary to our second prediction, senescence in hematocrit and albumin was not more intense in Chizé than in Trois Fontaines. Moreover, for creatinine concentration the rate of senescence was higher in Trois Fontaines than in Chizé. Creatinine concentrations in roe deer were lower at Chizé than at Trois Fontaines during prime-age adulthood but the pattern was reversed at old ages. We suggest that roe deer at Chizé are more often starving

than at Trois Fontaines. Indeed, a same creatinine concentration (approximately 117 $\mu\text{mol/L}$) for a roe deer is observed at 3 years of age at Chizé and at 7 years of age at Trois Fontaines.

Sex difference in senescence patterns occurred for hematocrit. Hematocrit was lower in males than in females and the senescence rate was higher in males than in females. Evidence that males show more rapid actuarial senescence than females is now well documented in several populations of large herbivores in the wild (Nussey et al. 2013). Specifically for roe deer, there is clear evidence that annual adult survival is lower in males than in females (Gaillard et al. 1993). This could explain our finding of a higher senescence rate in males compared to females and of lower values for all haematological parameters in males. Toïgo and Gaillard (2003) found that sex differences in adult survival are more likely to occur when resources are scarce because males are more sensitive to starvation than females.

While the occurrence of senescence in survival and reproduction seems to be the rule in birds and mammals (Nussey et al. 2013), our findings provide a first clear evidence of senescence in haematological parameters in a wild mammal since until now empirical evidence of decline in haematological parameters with age were limited to laboratory models such as rats (Wu et al. 2008) or house mice (Garratt et al. 2011). However, whether the pervasiveness of senescence might be generalized to all physiological parameters in wild species will require further investigations.

Acknowledgements

We thank all the ONCFS staff volunteers who organized the roe deer captures and Céline Dussart for her help in field and laboratory analyses. We are also grateful to Mathieu Douhard, Marlène Gamelon, Michael Garratt and two anonymous reviewers for helpful comments on previous drafts.

3.6. Appendix 1

Table S1. Correlation matrix among haematological parameters. Displayed are the slopes with SE and R².

	Hematocrit	Albumin
Hematocrit	X	
Albumin	0.34 ± 0.05 P<0.001 R ² = 0.10	X
Creatinine	0.04 ± 0.01 P<0.001 R ² = 0.03	0.05 ± 0.01 P<0.001 R ² = 0.07

Table S2. Distribution of sex and age of roe deer in the populations of Trois Fontaines and Chizé between 2009 and 2013.

		Site		
		Trois Fontaines	Chizé	Total
Sex	Male	67	54	121
	Female	103	96	199
	Total	170	150	320
Age	2	45	23	68
	3	30	28	58
	4	23	21	44
	5	10	15	25
	6	19	11	30
	7	6	13	19
	8	11	20	31
	9	5	11	16
	10	9	6	15
	11	4	1	5
	12	4	0	4
	13	3	0	3
	14	0	1	1
	15	1	0	1
	Total	170	150	320

Table S3. Model selection for the effects of age on body mass of both sexes in both populations.

Displayed are the AIC of each model with degrees of freedom (df), and the difference in AIC between each candidate model and the selected model (in bold). Null is the constant model without age; linear is the model with age in years; quadratic is the model with age and age²; threshold is the model with a threshold age at the onset of senescence.

Parameter	Model	Trois Fontaines						Chizé					
		Males			Females			Males			Females		
		df	AIC	ΔAIC	df	AIC	ΔAIC	df	AIC	ΔAIC	df	AIC	ΔAIC
Body mass	Null	4	309.2	13.2	4	446.0	4.1	4	298.2	26.1	4	500.2	34.1
	Linear	5	308.9	12.9	5	444.5	2.6	5	281.3	9.2	5	486.8	20.7
	Quadratic	6	296.0	0	6	441.9	0	6	272.1	0	6	466.1	0
	Segmented	5	308.8	12.8	5	444.5	2.6	5	281.3	9.2	5	486.8	20.7

Table S4. Model selection for the effect of age on hematocrit (a), albumin (b) and creatinine (c). Displayed are the AIC of each model with degrees of freedom (df), and the difference in AIC between each candidate model and the selected model.

Haematological parameter	model	df	AIC	Δ AIC
	site + sex + age + age ² + sex:age ² + body mass	10	1908.808	0
	sex + age + age² + sex:age² + body mass	9	1909.054	0.246
	site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ² + body mass	11	1910.702	1.894
	site + sex + age + sex:age + body mass	9	1911.577	2.769
	site + sex + age + age ² + body mass	9	1912.943	4.135
	sex + age + age ² + body mass	8	1913.248	4.44
Hematocrit	site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ² + sex*site*age ² + body mass	13	1913.268	4.46
	site + sex + age + age ² + sex*site*age ² + body mass	13	1913.268	4.46
	site + sex + age + sex:age + site:age + body mass	10	1913.503	4.695
	sex + age(threshold) + sex:age(threshold) + body mass	8	1914.273	5.465
	site + sex + age + age ² + site:age ² + body mass	10	1914.521	5.713
	sex + age(threshold) + body mass	7	1914.667	5.859

sex + age + sex:age + body mass	8	1914.957	6.149
site + sex + age(threshold) + sex:age(threshold) + body mass	9	1915.098	6.29
site + sex + age + sex:age + site:age + sex*site*age + body mass	12	1915.488	6.68
site + sex + age + sex*site*age + body mass	12	1915.488	6.68
site + sex + age(threshold) + body mass	8	1915.559	6.751
site + sex + age + body mass	8	1916.34	7.532
site + sex + age(threshold) + sex:age(threshold) + site:age(threshold) + body mass	10	1917.007	8.199
site + sex + age(threshold) + site:age(threshold) + body mass	9	1917.109	8.301
sex + age + age ² + sex:age ²	8	1917.305	8.497
site + sex + age + site:age + body mass	9	1918.14	9.332
site + sex + age + age ² + sex:age ²	9	1919.12	10.312
<hr/>			
site + sex + age + age ² + site:age ² + body mass	10	1750.416	0
site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ² + body mass	11	1751.703	1.287
site + sex + age + age² + body mass	9	1751.798	1.382
site + sex + age + age ² + sex:age ² + body mass	10	1752.685	2.269
site + sex + age + age ² + site:age ²	9	1752.745	2.329
site + sex + age + age ²	8	1753.542	3.126

Albumin

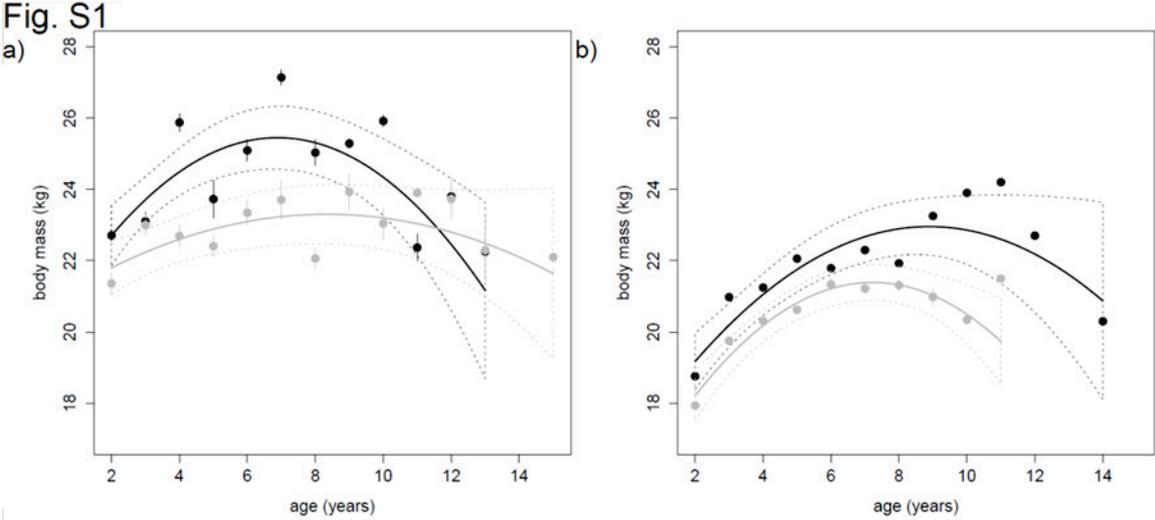
site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ²	10	1754.07	3.654
site + sex + age + age ² + sex:age ²	9	1754.514	4.098
site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ² + sex*site*age ² + body mass	13	1754.868	4.452
site + sex + age + age ² + sex*site*age ² + body mass	13	1754.868	4.452
site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ² + sex*site*age ²	12	1757.422	7.006
site + sex + age + age ² + sex*site*age ²	12	1757.422	7.006
site + sex + age + body mass	8	1758.957	8.541
site + sex + age + sex:age + body mass	9	1759.42	9.004
site + sex + age + site:age + body mass	9	1759.484	9.068
site + sex + age + sex:age + site:age + body mass	10	1760.094	9.678
site + sex + age + sex:age + site:age + sex*site*age + body mass	12	1762.17	11.754
site + sex + age + site:age + body mass	9	2811.837	0
site + sex + age + age ² + site:age ² + body mass	10	2813.247	1.41
site + sex + age + sex:age + site:age + body mass	10	2813.807	1.97
site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ² + body mass	11	2815.035	3.198
sex + age + body mass	7	2815.865	4.028
sex + age + age ² + body mass	8	2816.952	5.115

Creatinine

site + sex + age + body mass	8	2817.206	5.369
site + sex + age + sex:age + site:age + sex*site*age + body mass	12	2817.69	5.853
site + sex + age + sex*site*age + body mass	12	2817.69	5.853
sex + age + sex:age + body mass	8	2817.751	5.914
sex + age + age ² + sex:age ² + body mass	9	2818.33	6.493
site + sex + age + age ² + sex:age ² + site:age ² + sex*site*age ² + body mass	13	2818.595	6.758
site + sex + age + age ² + sex*site*age ² + body mass	13	2818.595	6.758
site + sex + age + age ² + body mass	9	2818.666	6.829
site + sex + age + sex:age + body mass	9	2819.1	7.263
site + age + site:age + body mass	8	2819.354	7.517
site + sex + age + age ² + sex:age ² + body mass	10	2820.067	8.23
site + age + age ² + site:age ² + body mass	9	2821.982	10.145

Fig. S1. Age-related differences in body mass depending on population and sex.

Predictions based on the model selected by AIC (black points corresponding to the average values per age, black line corresponding to the predicted values and dotted black lines corresponding to standard errors; grey points corresponding to the average values per age; grey line corresponding to the predicted values and grey dotted lines corresponding to standard errors).



4. Conclusion

Pour l'article 2, les prédictions de départ étaient qu'une corrélation négative devait être observée entre les parasites et les indicateurs de la condition physique, avec un effet plus marqué chez les mâles, les jeunes et les sénescents et enfin lorsque les ressources sont limitées. Nous avons pu montrer que la relation entre le parasitisme et les paramètres hématologiques et biochimiques testés, à l'exception de l'albumine, est effectivement négative. De plus, l'intensité de la relation varie avec l'âge, le sexe et les ressources.

Concernant la différence entre mâles et femelles, le déclin des paramètres hématologiques avec le parasitisme aurait dû être plus prononcé chez les mâles que chez les femelles. Au contraire, des différences entre les sexes n'ont été observées qu'avec la créatinine pour deux mesures du parasitisme (les strongles gastrointestinaux et l'indice de diversité parasitaire), et seulement dans la population de Trois Fontaines. De plus, cette corrélation montre un effet négatif plus prononcé chez les femelles que chez les mâles. Ceci peut s'expliquer par le fait que le système immunitaire chez les femelles peut être compromis par la gestation.

De la même manière, les données ne semblent pas apporter de soutien à l'hypothèse de l'effet des ressources. Une explication possible à ce résultat est que même les mauvaises années, les ressources ne sont pas assez limitantes, notamment à de Trois Fontaines, pour qu'un effet apparaissent. Pour tester cette hypothèse, des analyses sur une autre population, dans un milieu plus limitant que celui des deux populations suivies ou une étude de type expérimental avec des individus dans des enclos soumis à une alimentation régulée pourraient être envisagées.

Les données montrent un effet de l'âge avec une corrélation négative entre parasitisme et paramètres physiologiques plus forte chez les jeunes et les sénescents que chez les adultes, qu'il est possible d'attribuer à la mise en place de l'immunité chez les jeunes et l'immunosénescence chez les plus âgés. Compte-tenu que ces classes d'âge sont aussi les plus

souvent et les plus lourdement parasitées (Body et al. 2011), ce résultat corrobore l'idée que ces classes d'âge sont les plus fortement touchées par l'impact du parasitisme.

Dans l'article 3, nous avons prédit un déclin des paramètres hématologiques avec l'âge, avec une sénescence plus intense chez les mâles, ou lorsque les ressources sont plus limitées. L'article 3 de ce chapitre montre que la sénescence est présente sur des paramètres hématologiques et biochimiques dans des populations sauvages avec des variations pour chacun des traits en fonction du site mais également du sexe. Alors que le taux de sénescence de l'hématocrite apparaît comme plus prononcé chez les mâles que chez les femelles comme prédit, aucune variation liée au site n'a pu être mise en avant. A l'inverse, pour la créatinine, le taux de sénescence est plus fort à Trois Fontaines qu'à Chizé mais aucune variation liée au sexe n'a pu être décelée. Pour finir, le taux de sénescence pour l'albumine ne varie ni avec le site, ni avec le sexe. Ainsi, trois paramètres différents de la condition physique varient chacun en fonction de différents traits. Ces deux articles (2 et 3) proposent donc une vision des variations de la condition physique qui corroborent l'hypothèse du cercle vicieux proposé par Beldomenico et Begon (2010). Un individu dans une bonne condition physique, qui dispose de beaucoup de ressources, peut allouer plus d'énergie dans l'immunité qu'un individu en mauvaise condition physique. Le résultat pour l'hôte en mauvaise condition physique est donc une plus grande sensibilité aux agents pathogènes, déclenchant un cercle vicieux où la condition physique est de plus en plus pauvre et l'infection de plus en plus sévère, pouvant affecter sa survie et sa reproduction et conduire à sa mort (Beldomenico et Begon 2010). En effet, les auteurs suggèrent que les parasites, en prélevant les ressources énergétiques de l'hôte, affectent sa condition physique et par conséquent la capacité de l'hôte à monter une réponse immunitaire efficace. La diminution de la prise alimentaire entraînant une diminution des nutriments disponibles (Sams et al. 1998) pourrait également avoir une conséquence sur la capacité de l'hôte à monter une réponse immunitaire. Ainsi, l'augmentation du parasitisme

avec l'âge (Body et al. 2011) associée à cette diminution des nutriments pourraient interagir et moduler la réponse immunitaire chez les populations sauvages de chevreuils.

L'existence de cette synergie entre la condition physique et le parasitisme devra donc être considérée afin d'expliquer les variations d'immunocompétence.

CHAPITRE IV
VARIATIONS DE L'IMMUNOCOMPÉTENCE CHEZ LE
CHEVREUIL

1. Introduction

Dans ce quatrième chapitre, nous abordons l'étude des variations de l'immunocompétence dans deux populations contrastées de chevreuils. Dans un premier temps, alors que nous avons pu observer des variations entre la condition physique et le parasitisme, nous avons mené une étude exploratoire sur la relation qui existait entre la condition physique et l'immunocompétence. D'après la littérature (chapitre I), nous avons constaté que la condition physique des individus peut influencer sur leur système immunitaire. Pour rappel, les micronutriments, oligoéléments ou nutriments apparaissent comme essentiels au maintien d'une réponse immunitaire efficace. Il apparaît donc que l'acquisition des ressources constitue un élément important au maintien d'une bonne immunocompétence (Norris et Evans 2000). C'est dans ce contexte que nous avons étudié le lien entre la condition physique et les paramètres immunitaires dans les deux populations de chevreuils vivant dans des milieux où les ressources disponibles diffèrent (Article 4).

L'article 5 de ce chapitre, se réfère à l'hypothèse du handicap d'immunocompétence proposé par Folstad et Karter (1992). Chronologiquement, Zahavi (1975) propose que l'extravagance des caractères sexuels secondaires présente un coût que seuls les mâles de bonne qualité phénotypique peuvent tolérer. L'hypothèse proposée par la suite par Hamilton et Zuk (1982) stipule que l'expression des caractères sexuels secondaires serait un signal honnête corrélé à sa capacité à résister aux agents pathogènes. Folstad et Karter (1992) formalisent l'hypothèse du handicap d'immunocompétence en intégrant les deux hypothèses précédentes (Zahavi 1975 et Hamilton et Zuk 1982) en proposant que la testostérone a à la fois un effet stimulant sur les caractères sexuels secondaires et un effet suppresseur sur l'immunocompétence. Alors que certaines études supportent l'hypothèse d'un effet immunosuppresseur de la testostérone (Faivre et al. 2003 ; Mougeot et al. 2004), d'autres un effet « immuno-redistributeur » (Braude et al. 1999), et d'autres aucun effet (Paz Nava et al. 2001), nous nous proposons,

dans ce contexte, d'étudier le lien entre la longueur des bois, principal caractère sexuel secondaire chez le chevreuil, et l'immunocompétence, caractérisée par un ensemble de mesures, définies dans la figure 1 adaptée de Schmid-Hempel et Ebert (2003).

2. Immune Phenotype and Body Condition in Roe Deer: Individuals with High Body Condition Have Different, Not Stronger Immunity (Article 4)

Emmanuelle Gilot-Fromont^{1,2*}, Maël Jégo^{1,2}, Christophe Bonenfant¹, Philippe Gibert³, Benoit Rannou², François Klein³, Jean-Michel Gaillard¹

Publié dans PLoS ONE

DOI: 10.1371/journal.pone.0045576

1 Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, Villeurbanne, France,

2 Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France,

3 Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Studies and Research Department, Paris, France

Corresponding author: emmanuelle.gilotfromont@vetagro-sup.fr

2.1. Abstract

An efficient immunity is necessary for host survival, but entails energetic costs. When energy is limited, immunocompetence and body condition should co-vary positively among individuals and, depending on body condition, individuals should allocate more either in innate immunity or in adaptive response. We tested whether immune phenotype depends on body condition in large mammals, using data from two contrasted populations of roe deer *Capreolus capreolus* in France. Roe deer living at Chizé, a forest with poor habitat quality, were expected to show lower values for body condition and immune parameters than roe deer at Trois Fontaines, a forest with high habitat quality. From 285 blood samples collected between December 2009 and March 2011, we measured seven metabolic parameters and ten immunological parameters. A Principal Component Analysis showed that all indicators of body condition co-varied positively and were lowest at Chizé. Several immunological indicators correlated to body condition and differed between Trois Fontaines and Chizé. However, high body condition was not associated to a high average level of immunocompetence, but instead to high levels of indicators of acute inflammatory innate response, while low body condition was associated to high levels of monocytes and lymphocytes, possibly reflecting adaptive immunity. Limited data suggest that the difference between populations was not related to the presence of specific parasite species, however parasite exposure and stress have to be investigated to gain a more complete understanding of the determinants of immunity.

2.2. Introduction

The immune function confers protection to hosts against pathogens, thus identifying the factors causing variation in immunity is required to understand the cost of parasitism in hosts. The immune system first develops following antigen stimulation (Horrocks et al. 2011). However, immune functions are energetically costly to develop, maintain and use (Lochmiller and Deerenberg 2000) thus the energetic balance of individuals should also be considered. When resources are limited, trade-offs should occur between immunocompetence and competing functions. Variability in resource acquisition should thus lead to variable general level of immunocompetence among individuals (Norris and Evans 2000). Food restriction has been experimentally shown to limit several components of immunity like cellular response against gastrointestinal parasites (Valderrábano et al. 2006) or levels of antibody (Martin et al. 2007; Bourgeon et al. 2010). Individual follow-up has also suggested that low body condition is frequently followed by infection in field voles (Beldomenico et al. 2008b). However, reducing immunological variation to the immunosuppression/enhancement gradient does not fully capture the observed variation in immunity (Martin et al. 2006b). The immune response includes innate and adaptive components, which interact together but may show different costs and benefits depending on the species and individual considered. The innate response provides a rapid and largely non-specific response, while adaptive immunity confers long-term, more specific protection. Recent experimental work showed that innate immunity, which relies on strong cellular response, is costly to maintain and to use, and entails strong immunopathological costs (Klasing 2004). In contrast, the cost of adaptive response is mainly due to its development (Klasing 2004). On the other hand, the benefit of each component differs: in particular, adaptive immunological memory is most useful in individuals that are expected to encounter the same pathogen several times during their life. Building on these observations, Lee (2006) proposed the general prediction that, in individuals experiencing the

highest energetic demands, the costliest defences, such as the innate inflammatory response, should be down-regulated, while the cheapest defenses (such as adaptive antibody-based response) should be up-regulated. This prediction should apply at both interspecific, with fast-living species expected to have more innate oriented immunity than slow-living species, and intra-specific levels, with individuals experiencing strong energetic demand predicted to have relatively high levels of adaptive immunity. In mice and chicken, comparing lineages selected for fast-living and slow-living traits confirmed these predictions (Leshchinsky and Klasing 2001; Ksiazek and Konarzewski 2012). In mallards, innate and adaptive immunity responded differently to a fasting-refeeding experiment (Bourgeon et al. 2010). Whether the innate/adaptive balance correlates with body condition (a proxy of an individual's ability to acquire resources) in natural populations has received little empirical support despite body condition correlated to innate response in several bird species (Møller and Petrie 2002; Masello et al. 2009; Krams et al. 2011). The roe deer *Capreolus capreolus* is a relevant model to test the relationship between immune phenotype and body condition in the wild: having low body reserves (Andersen et al. 2000), roe deer cannot compensate for high immunological effort. We measured body condition and immunological parameters in roe deer captured in two populations with contrasting food resource availability. We expected that (H1) body condition should be higher in the population having access to more food resources, (H2) overall, immune parameters should increase with body condition, and (H3) immunity should be oriented towards innate response when body condition is high.

2.3. Materials and Methods

2.3.1. Ethics

All necessary permits were obtained for the described field studies. The protocol of capture and blood sampling of roe deer under the authority of the ONCFS have been approved by the

Director of Food, Agriculture and Forest (Prefectoral order 2009–14 from Paris). This permission is given at the national level. The land manager of both sites, the Office National des Forêts (ONF), permitted the study of the populations (Partnership Convention ONCFS-ONF dated 2005–12–23).

2.3.2. Study Sites and Captures

The Chizé forest is located in Western France (46°05'N, 0°25'W) with a low productivity, this forest offers a poor habitat to roe deer. In contrast, the Trois Fontaines forest located in North-Eastern France (48°43'N, 2°61'W) is highly productive (Gaillard et al. 1993). During the 2006–2010 period, the population growth rate was close to 0 at Chizé and 1.25 at Trois Fontaines and generation time was much longer at Chizé (about 7 years) than at Trois Fontaines (about 5 years) (Gaillard and Bonenfant, unpubl. data). As part of a long-term monitoring program, 9 to 12 days of capture were organized in each population between December and March, both in 2009–2010 and 2010–2011. Roe deer were captured using drive-netting (Pettorelli et al. 2006) and blood samples were collected at the jugular vein. Samples were received at the laboratory within 40 hours after sampling and analyzed within 4 hours after reception. The sex, age (fawns vs older) and body mass (to the nearest 50g) of each captured roe deer were also recorded.

2.3.3. Estimating Body Condition

We measured body condition using age class-specific body mass (MASS in kg) as well as six parameters designed to obtain detailed information on the metabolism of oxygen, proteins and carbohydrates. We first estimated the aerobic capacity using red blood cell count (RBC in 10¹²/L) and hemoglobin concentration (HGB in g/dL). These indicators that reflect the presence of anemia have been previously used to assess body condition (Beldomenico et al. 2008b). These measurements were issued from a complete blood count performed using an

ABC Vet automaton (Horiba Medical, Montpellier, France). White and red blood cell counts (WBC, RBC) were measured by impedance technology considering parameters for bovine samples, since the size of blood cells is comparable between the two species (Ursache et al. 1980). Haemoglobin concentration was measured following cyan methemoglobin conversion at 550 nm, the most classical method in mammals (Stockham and Scott 2008). An experienced laboratory technician performed a differential count of 100 WBCs and evaluated RBC, WBC and platelet morphology. Clotted and/or hemolytic serum samples were discarded. The level of protein resources was estimated using albumin content (ALB in g/L), creatinin concentration (CREA in micromol/L), and urea (URE in mmol/L), which have all been previously used as indicators of body condition (Sams et al. 1998). Albumin content is used to reflect the general level of available protein resources in serum (Stockham and Scott 2008). In Ungulates, albumin level has been shown to be sensitive to population density, suggesting that this indicator may reflect the availability of resources (Sams et al. 1998). Creatinin is produced during catabolism of muscular proteins, and reflects the intensity of muscular metabolism (Stockham and Scott 2008), while urea reflects the waste of the protein metabolism (Stockham and Scott 2008). Classical biochemical methods were used to obtain these measurements. The total protein content of the serum was first measured using a refractometer (Stockham and Scott 2008). Proteins were then separated into albumin, alpha-1, alpha-2, beta and gamma-globulins and quantified by electrophoresis, using an automatic agarose gel electrophoresis processor HYDRASYS (Sebia, Evry, France). Urea and creatinine analyses were performed on a Konelab 30i automaton (Fisher Thermo Scientific, Cergy-Pontoise, France) using Thermo scientific reagents. To assess the level of carbohydrates, we used the level of fructosamine (FRU in micromol/L), which includes all carbohydrates combined to proteins and reflects glycemia during the two weeks preceding sampling (Stockham and Scott 2008). Compared to glucose level, fructosamine concentration, being

determined over several weeks before capture, has the advantage of being independent from capture stress. Fructosamin assays were performed on a Konelab 30i automaton (Fisher Thermo Scientific, Cergy-Pontoise, France) using ABX Pentrafructosamine reagents (Horiba, Montpellier, France).

2.3.4. Measuring Immune Phenotype

As immunity has both innate and adaptive components that may have different determinants, and includes numerous cellular as well as humoral effectors, multiple measures reflecting these different aspects have to be analysed simultaneously (Adamo 2004). Here, ten immune parameters were estimated using haematological parameters and specific assays. Concerning cellular immunity, neutrophils (NEUTRO in $10^{12}/L$) and monocytes (MONO in $10^{12}/L$) counts reflect acute and chronic inflammatory responses, respectively, and both may increase after infection. Eosinophils (EOSINO in $10^{12}/L$) are specifically induced by Th2 responses, but may be also present in other contexts like hypersensitivity (Roitt 2001). Lymphocytes (LYMPHO in $10^{12}/L$) counts include both T and B cells, the latter being particularly involved in the production of antibodies and thus in adaptive responses (Roitt 2001). These parameters were issued from the white blood cell count described above and from the distribution of white blood cells, which was determined by examination of wright-giemsa-stained blood smears. The neutrophils/lymphocyte ratio (N/L, dimensionless) was used as an integrative indicator of the inflammatory state (De Jager et al. 2010), but this parameter is also known to be modified in stressful conditions (Davis et al. 2008). Humoral aspects were first assessed using the levels of alpha-2 globulins (ALPHA2 in g/L) and haptoglobin (HAP in g/L). Alpha-2 globulins are a complex group of proteins that are produced during inflammatory response. Haptoglobin belongs to alpha-2 globulins, and is part of acute-phase proteins (APPs), a group of proteins which concentration changes following external or internal challenges such as trauma, inflammation or infection. In large herbivores, APP concentrations have been shown

to increase during sarcoptic mange infestation (Rahman et al. 2010). Haptoglobin analyses were performed on a Konelab 30i automaton (Fisher Thermo Scientific, Cergy-Pontoise, France) using phase Haptoglobin assay (Tridelta Development LTD, County Kildare, Ireland) chromogenic kit. Humoral innate immunity was also assessed by the levels of natural antibodies and complement. Natural antibodies are circulating antibodies that are present in the absence of any previous exposure to antigens. Their level is thus independent from the exposure of individuals to infection, but they are correlated to the ability to produce antibodies after a challenge (Matson et al. 2005) and have been used as a measure of immune allocation that correlates with fitness in large herbivores (Graham et al. 2010). Their presence is revealed by hemagglutination (HA in $-\log_2$ (dilution)), that measures the ability of samples to agglutinate exogenous cells. The complement is a group of proteins that acts through chain reactions and causes the lysis of exogenous cells in the presence of an antigen-antibody complex. They can thus be revealed by their ability to cause hemolysis (HL in $-\log_2$ (dilution)) (Matson et al. 2005). We used the hemagglutination-hemolysis protocol defined in (Matson et al. 2005), modified using chicken red blood cells as target cells. Finally, we estimated the level of circulating antibodies, that are produced during adaptive response. The total amount of circulating antibodies has been used as a measurement of allocation in long-term immunity (Bourgeon et al. 2010). Here, we used the level of gamma-globulins (GAMMA in g/L) derived from the protein analysis described above as an estimator of total antibodies, since gamma-globulins are essentially constituted of circulating antibodies (Stockham and Scott 2008). Overall, our main indicators of innate immunity were the neutrophil and monocyte counts, N/L ratio, alpha-2 globulin, haptoglobin and hemolysis, while hemagglutination and gammaglobulins were more reflecting adaptive response. Eosinophil and lymphocyte counts may reflect both aspects. Haematological and biochemical assays were performed at the Biochemical and Endocrinological laboratory, VetAgro-Sup,

France, while the hemagglutination-hemolysis assay was performed at the UMR 5558, Villeurbanne, France.

2.3.5. *Data Analysis*

As body condition and immune phenotype were estimated using seven and ten parameters respectively, analyzing all possible relationships would lead to redundancies and high type I error. We thus analyzed the overall correlation pattern using a Principal Component Analysis (PCA). We then tested whether individuals from Chizé and Trois Fontaines differed in terms of body condition (hypothesis H1) and immune phenotype by comparing scores on the principal components (PCs), using linear models. Because the two populations differed in average score on PC1 (see results), we tested the contrast between populations for each variable using t-tests, or Wilcoxon tests when normality was not met.

To test our prediction that immunity correlates with body condition (H2, H3), we first defined a synthetic variable summarising body condition. This body condition index was the first principal component of a second PCA, including only body condition estimates for the same dataset, and showing a gradient similar to the one found in the complete PCA (not shown). We tested the relationship between each immune parameter and the body condition index using ANCOVAs to account for the between-population difference in immune phenotype. Variables were log-transformed or analyzed as presence/absence when normality was not met. All statistical procedures were performed using R software (R, 2009).

2.4. **Results**

We analyzed 149 individuals from Trois Fontaines and 136 from Chizé (n = 285). The proportion of males (0.47 vs. 0.41) did not differ between populations (Chi-square test, P= 0.325), while the proportion of fawns (0.33 vs. 0.18) was lower in Chizé (P = 0.007). The first principal component of PCA (PC1) captured 19.79% of the total inertia and was much more

important than all following axes (Fig. 1), leading to retain only PC1 in the interpretation. All metabolic parameters correlated negatively with PC1. This first axis thus reflects a gradient of body condition, with individuals of high body condition having negative scores. As expected from hypothesis (H1) predicting a higher body condition in the population having access to more food resources, the ranking of roe deer along PC1 markedly differed between Chizé (mean score \pm S.E = 1.10 ± 0.13) and Trois Fontaines (-1.00 ± 0.12 , $P < 0.001$, $R^2 = 0.32$) with deer of highest body condition (low scores on PC1) belonging mostly to Trois Fontaines (Fig. 2). Accordingly, when taken separately, body mass and all metabolic parameters except URE were the highest at Trois Fontaines (all $P < 0.001$). Because the age structure differed between Chizé and Trois Fontaines (i.e., larger proportion of fawns at Trois Fontaines), we tested if the difference between populations was confounded by an age effect. We found that the same patterns occurred ($P < 0.001$) whether accounting for age or not.

Several immune parameters also varied along PC1. However, contrarily to expected from (H2), no general trend towards higher level of immunity at high body condition was observed. The strongest positive correlations occurred between PC1 scores and gamma-globulins ($r = 0.50$), haptoglobin ($r = 0.27$) and lymphocyte count ($r = 0.22$), while negative correlations were obtained between PC1 and N/L ratio ($r = -0.41$), hemolysis ($r = -0.32$) and neutrophil count ($r = -0.30$). Roe deer at Trois Fontaines had higher neutrophil counts ($P = 0.001$) and hemolysis ($P = 0.001$). Again, these differences were confirmed after accounting for between-population difference in age structure, except for the N/L ratio that was significantly higher at Trois Fontaines only when the effect of age was accounted for ($P = 0.012$).

Body condition was therefore associated with immune phenotype, and this relationship remained after accounting for between-population differences in immune parameters. Once the contrast in immune parameters between populations was accounted for, body condition index was positively correlated with N/L ratio ($P = 0.006$), eosinophil count ($P = 0.032$),

haptoglobin ($P = 0.005$), alpha-2 globulins ($P < 0.001$) and hemolysis ($P = 0.038$), and negatively associated with lymphocyte ($P = 0.008$) and monocyte counts ($P = 0.009$). These results are not supporting the hypothesis (H2) that high body condition should be associated with a high level of all immune parameters. Instead, high body condition was associated with high levels of N/L ratio, eosinophil count, alpha-2 globulin, haptoglobin and hemolysis, and low levels of lymphocyte and monocyte counts. Whether these results support hypothesis (H3) is discussed below.

Figure 1. Body condition and immunocompetence. Principal Component Analysis for metabolic and immune parameters in two contrasting populations of roe deer in France. A: decomposition of variance among principal components; B: correlation circle showing the projection of all variables on principal components 1 (x axis) and 2 (y-axis). See text for definition of variables. doi:10.1371/journal.pone.0045576.g001

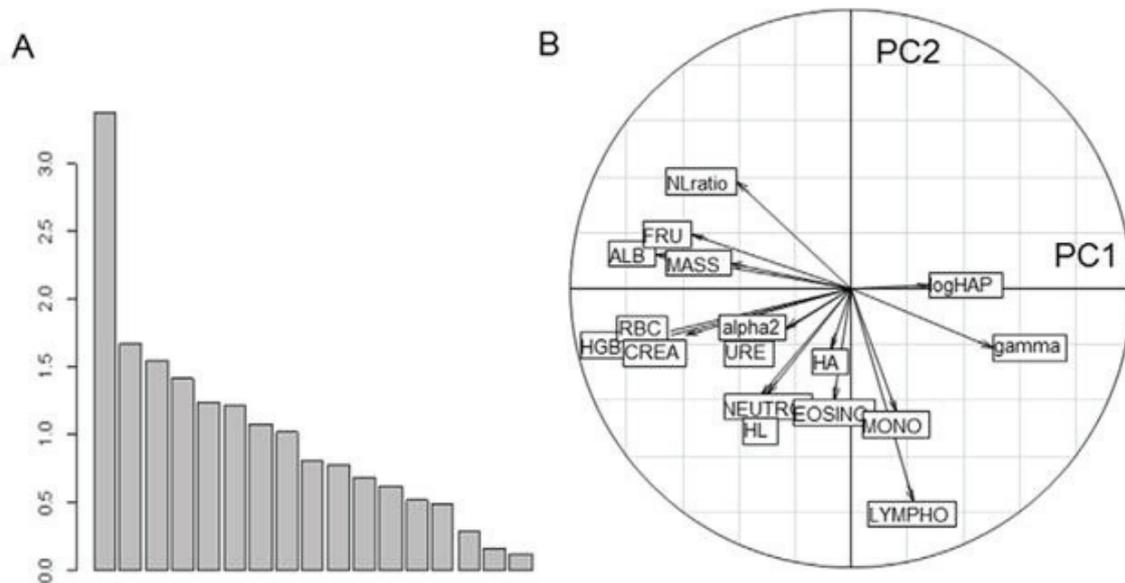
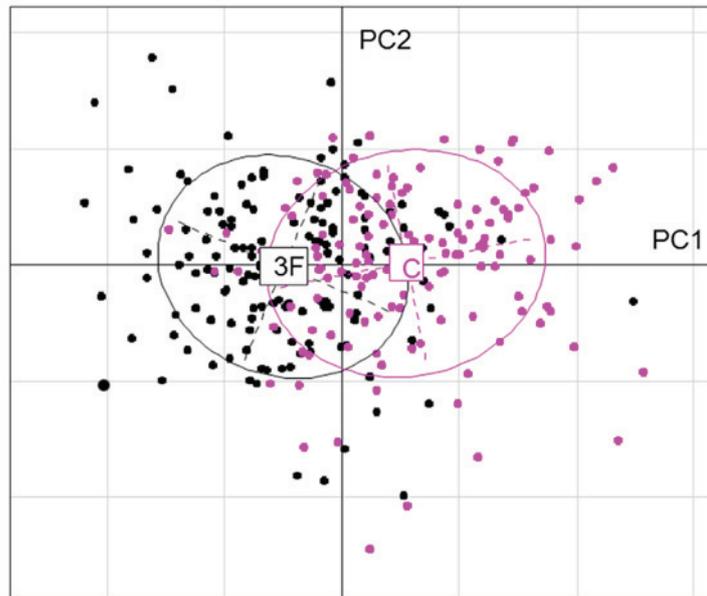


Figure 2. Contrast between populations. Projection of individuals from the two populations (C = Chizé, 3F = Trois Fontaines) on the first two principal component (displayed in the PC1-

PC2 plane). doi:10.1371/journal.pone.0045576.g002



2.5. Discussion

Measuring immunocompetence in wild populations is challenging, because of the limited access to animals, the impossibility to observe them for long periods and the stress induced by the capture. A limited set of immunological assays can be performed in these conditions. Moreover, these should be interpreted keeping in mind that the correlation between results of the assays and pathogen resistance is pathogen-dependent (Adamo 2004) and has generally not been assessed in wild species. All indicators used to measure body condition co-varied positively, thus an overall metric of body condition can be defined based on classical measures of mass and metabolic parameters. As expected, body condition was much lower at Chizé than at Trois Fontaines. The low values of protein and carbohydrates reserves at Chizé suggest that resource limitation lowers the amount of nutrients available for the metabolism, as previously reported in white-tailed deer *Odocoileus virginianus* (Sams et al. 1998). Immune parameters were, however, not consistently highest at Trois Fontaines or in roe deer with high body condition. The parameters associated with high body condition and/or Trois Fontaines population (neutrophil count, N/L ratio, alpha-2 globulin, haptoglobin and hemolysis) are clearly those expected to increase during a non-specific, acute and innate response. In contrast, individuals with low body condition or living at Chizé showed higher lymphocytes and monocytes counts (at low body condition) and high levels of gamma-globulins (at Chizé). This pattern is more difficult to interpret due to the low specificity of our indicators: because variations in T and B cells cannot be separated, lymphocyte count is not a straightforward indicator, and only gamma-globulins can be interpreted as a clear measure of adaptive immunity. This measure was higher at Chizé, but not in individuals having low body condition, within populations. Finally, at the level of population, although we compared only two sites, the contrast between Chizé and Trois Fontaines is consistent with species-level predictions that a slow pace of life, like observed at Chizé (Nilsen et al. 2009), should be

associated with adaptive immunity (Lee 2006). At the individual level, due to the lack of clear relationship between body condition and adaptive response, our results partly support the prediction that, depending on their nutritional demands, individuals should allocate more resources either to innate, nonspecific response or to adaptive (specifically, antibody-based) immunity (Lee 2006). Other determinants may also cause specific variations of the same parameters. The first possible confounding cause involves acute or chronic stress, which may modify leukocyte counts and N/L ratio (Davis et al. 2008). Here, we measured creatine-kinase (CK) and aspartate transaminase (AST) as indirect indicators of acute stress in all captured roe deer. CK and AST reflect tissue injury and may increase dramatically after acute exercise, immobilization or cold exposure (Sanchez et al. 2002; Stockham and Scott 2008). On average, CK and AST were similar at Chizé and Trois Fontaines and independent of body condition (not shown), suggesting that capture condition and tissue damage were of the same intensity in the two populations. We have no indication on how chronic stress may vary between populations. However the relationship between N/L ratio and body condition was maintained after considering the contrast between populations. Thus, the leukocyte distribution varied within populations among individuals experiencing similar capture conditions. We cannot reject the hypothesis that the immune phenotype observed in roe deer with high body condition, in particular high level of N/L ratio, might be due to stress in these individuals. Other factors like sex, age and pregnancy may modulate immunity, thus these factors should be taken into account to explain the individual-level variation. Here, because the age structure differed between populations, we took the effect of age into account when comparing Chizé and Trois Fontaines. However, differences in age structure did not account for the differences we reported between populations. Finally, individuals in low body condition might have experienced parasite infections that specifically entail adaptive immunity responses, thus parasite status has to be considered to interpret immune variation.

Here, the parasite load has not been taken into account at the individual level. However, preliminary data and previous studies suggest that parasite burden is comparable between the two sites: in both populations, pathogens frequently encountered (prevalence > 30%) include *Anaplasma phagocytophilum*, *Trichuris capreoli* and other gastro-intestinal strongyles (Segonds-Pichon 2001; Body et al. 2011). Less frequent pathogens (prevalence between 5 and 30%) include *Toxoplasma gondii* (Gotteland et al. submitted) and *Varestrongylus capreoli* (Segonds-Pichon 2001). A third group of parasites are occasionally found in both populations: *Coxiella burnetii*, *Nematodirus europaeus*, *Dictyocaulus noerneri*. Only *Capillaria* sp. has been found occasionally at Chizé and not at Trois Fontaines (Ferté et al., unpublished data). Other non-detected pathogens may be present at different levels in both populations. Here we have no clear indication of such situation since neutrophil and monocyte counts, which both increase after bacterial infection, do not show the same pattern. Overall we found that the immune phenotype differed between populations and varied with body condition. Individuals living in a population with high resources and having high body condition showed high levels of parameters related to innate immunity, while the pattern was less clear for adaptive immunity. To further explore the variations in immune phenotype, monitoring individual trajectories while taking into account age, gender, pregnancy status, parasite pressure and direct measures of stress, could help identifying causes and consequences of the immune functioning.

Acknowledgments

The authors thank Gilles Capron, Thibaud Amblard and all the ONCFS staff volunteers who organized the roe deer captures, and Céline Dussart and Vincent Girardot for their help in field and laboratory analyses. We are also grateful to three anonymous referees for constructive comments on a previous draft of that work.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EGF FK PG BR.

Performed the experiments: MJ FK BR PG EGF.

Analyzed the data: EGF JMG CB MJ.

Contributed reagents/materials/analysis tools: BR FK PG.

Wrote the paper: EGF CB JMG.

3. Male roe deer trade their immune system for sexual ornamentation in the wild (Article 5)

Maël Jégo^{1,2*}, Gilles Bourgoïn^{1,2}, Jean-François Lemaître¹, François Klein³, Laurent Crespin^{1,4}, Jean-Michel Gaillard¹, Emmanuelle Gilot-Fromont^{1,2}

Manuscrit en préparation

¹Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

²Université de Lyon, VetAgroSup, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France

³Office Nationale de la Chasse et de la Faune Sauvage, Centre National de Recherches Appliquées sur les Cervidés-Sanglier, 1 Place Exelmans, F-55000 Bar-le-duc, France

⁴INRA, UR346 d'Epidémiologie Animale, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

Author for correspondence : Maël Jégo, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE cedex, France.

E-mail: mael.jego@vetagro-sup.fr or jego.mael@gmail.com

3.1. Abstract

Trade-offs between immune system and other costly life-history traits are central to eco-immunology theory. However, how secondary sexual characters influence the efficiency of the immune system is still controversial. Current hypotheses state that testosterone enhances sexual traits with either suppression (immunocompetence handicap hypothesis) or redistribution (immunoredistribution hypothesis) of immune properties. We tested the relationships between antler size (an approximate measure of testosterone) and various components of immunity from data collected in two populations of roe deer *Capreolus capreolus* in France. We expected that males with larger antlers should show a trade-off with immune components. Moreover, we expected an immunosuppression or immunodistribution within different components of immunity. We found a decrease of leucocytes with increasing absolute antler size and a decrease of neutrophils with increasing both absolute and relative antler size. We also observed a decrease in levels of gammaglobulins with the absolute antler size but an increase with the relative antler size. These results support the idea that a trade-off with secondary sexual ornaments may constrain the cellular immune components. Moreover, we discussed the role of testosterone as a direct or indirect effect on immune components in relationship with body condition.

Keywords: immune system, sexual selection, antler, trade-off, immunosuppression

3.2. Introduction

One pivotal assumption in ecological immunology is that trade-offs should occur between immune defenses and other biological functions that all directly contributing to an animal's fitness (Norris and Evans 2000). As the immune system is costly in terms of production, maintenance or activation (Klasing 2004), improving the immune system lead to decrease energy allocation to other functions like reproduction (Allander 1997), survival (Moret and Schmid-Hempel 2000) or growth (Soler et al. 2003). Moreover, traits signaling the intensity of sexual selection like weapon size might also be affected (Kotiaho 2001).

The Immunocompetence handicap hypothesis states that high level of circulating testosterone should stimulate allocation to sexual ornaments at the cost of immunosuppressive effects, leading large weapons to be displayed only by the best males (Folstad and Karter 1992). So testosterone is expected to reduce immunocompetence. However, while increased levels of testosterone leads to immunosuppression (Mougeot et al. 2006), only weak evidence supports that high levels of testosterone suppress immunity (Roberts 2004).

Braude et al. (1999) postulated that rather than being immune suppressive effect of testosterone could drive the allocation of immune resources to body part most likely to be wounded. So, testosterone may not have suppressive effects on all immune components, but on the contrary, could reallocate towards innate immunity, i.e. the first lines immune defenses. Immunoredistribution hypothesis proposed an enhanced of innate immunity, as neutrophils or macrophages, to response to potential injury and a decreased of adaptive immunity, with lymphocytes for example. Evidence of immunoredistribution by testosterone, with an increase of innate immunity (i.e. neutrophils) and decrease of adaptive immunity (i.e. lymphocytes) has been reported on a gazelle species, *Nanger granti* (Ezenwa et al. 2012). But studies reported that testosterone may compromise both innate and acquired immune functions (Greives et al. 2006). Findings suggest that testosterone depending on the among

resources available have or not suppressive effect on all component of the immune function (Duckworth et al. 2001). Taking advantages of the monitoring of two populations of roe deer living in highly different contrasted environments, we tested the prediction that testosterone negatively influence the whole immune functions only in strongly limited populations. We tested the relationships between absolute and relative (to body mass) antler size and different components of the immune system on male roe deer (*Capreolus capreolus*) from two different populations. Many studies provided evidence that testosterone concentration is associated with antler growth in deer species (see review by Bartoš et al. 2012). Consequently, antler size can be related to testosterone concentrations. A trade-off should occur between antler size and immune components, being more pronounced when resources are scarce. Moreover, males with larger antlers size should suffer from immunosuppression or exhibit immunoredistribution to different components of immune system, with an increase of innate immunity and a decrease of adaptive immunity.

3.3. Material and methods

3.3.1. Study site and data collection

We used data from two contrasting populations of European roe deer. Both sites are enclosed forests managed by the Office National des Forêts, in which roe deer populations have been monitored by the Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage since three decades.

The Réserve Biologique Intégrale of Chizé is a 2,614-ha enclosed forest located in western France (46°05'N, 0°25'W). This site has a temperate oceanic climate and the forest has a low productivity due to poor soil and offers a poor habitat quality to roe deer. In contrast, the Territoire d'Etude et d'Expérimentation of Trois Fontaines (1,360 ha), located in North-Eastern France (48°43'N, 4°55'E), has a continental climate, a high quality soils and offers a high habitat quality to roe deer (Gaillard et al. 1993).

Every winter between 2009 and 2013, roe deer were caught using drive netting (Pettorelli et al. 2006) We recorded antler size and the exact age of males captured (when marked as newborn or at an age of 8 months). Blood samples were also collected at the jugular vein and fecal matter was collected *per rectum*.

Immune innate and adaptive cellular immunity were determined by counting 100 leucocytes subpopulations of Wright-Giemsa-stained (Sigma-Aldrich) blood smears. Lymphocytes include lymphocytes T and lymphocytes B cells, which are involved in the production of antibodies (Roitt 2001). Neutrophils reflect acute inflammatory responses (Roitt 2001). To assess cellular components in numeration ($10^3/\text{mm}^3$), we multiplied lymphocytes and neutrophils proportion by total white blood cell, measured by impedance technology (ABC Vet, Horiba Medical, Montpellier). We measured the level of circulating antibodies using gamma-globulins (g/L) and the ability of samples to lyse using the hemagglutination-hemolyse protocol defined in Matson et al. (2005), modified using chicken red blood cells as target cells.

3.3.2. *Statistical analysis*

Because antlers were measured during the growing period, some roe deer were captured with antlers still growing (i.e. still in velvet) and other with fully grown antlers. Consequently, to make antler size measurements comparable, we adjusted the antler size still growing to the median Julian date of captures in each population (January 20th at Trois Fontaines and February 7th at Chizé). Then, we replicated the analyses on velvet antler size adjusted for capture date and on fully grown antler size.

We included only roe deer from 2 years of age (i.e. minimum age to reproduce, Vanpé et al. 2009)). To access relative antler size, we used residuals from the selected model allometric

models between antler size and body mass as a measure of relative antler size (Vanpé et al. 2007).

A linear mixed model was fitted for each immune component by including individual identity as a random effect, and age, site and antler size (either absolute or relative measure) as independent variables to allow testing hypotheses using Likelihood-Ratio-Tests with Maximum Likelihood estimation method applied by deleting each variable in turn. P-value < 0.05 was considered as statistically significant. However, with the Maximum Likelihood method and variable gamma globulins, some models did not reach convergence (likely because of the small number of individuals with repeated observations) and therefore the LRT was not available for some effects. Then we used a parametric bootstrap approach as recently recommended by Thai et al. (2013) for linear mixed models and assessed the significance of each effect by bootstrapping both random effects and residuals from the full model (Olden and Jackson 2000) with the Restricted Maximum Likelihood method.

3.4. Results

We collected 102 samples (56 at Trois Fontaines and 46 at Chizé) from which 15 samples including antler size and blood were taken in 2010, 30 samples in 2011, 21 samples in 2012 and 36 samples in 2013. Three individuals were captured in three different years, 13 in two years and 67 in only one year. At Chizé, 38 males had still growing antlers and 8 had fully grown antlers. At Trois Fontaines, 29 males had still growing antlers and 27 had fully grown antlers. Consequently, in this study, 35 males were fully grown antlers and 67 males were still growing antlers.

There was an interaction between leucocytes count and population for both absolute and relative full antler size (Table 1). Leucocytes count decreased with increasing antler size at Trois Fontaines (Fig 1) but not at Chizé, where an increasing trend occurred. Likewise, an

interaction between neutrophils count and population occurred for both relative and absolute full antler size (Table 1). Neutrophils count decreased with increasing antler size at Trois Fontaines, but not at Chizé (Fig 2). For relative velvet antler size but not for their absolute size, an interaction occurred between leucocytes count and population (Table 2). Leucocytes count decreased with relative antler size at Trois Fontaines, but not at Chizé (Fig 3). Gammaglobulins increased with relative full antler size (Table 3, fig S1) but decreased with increasing absolute velvet antler size (Table 4, Fig S2). For other immune components, including lymphocytes and hemolysis, there was no detectable variation in relation to either absolute or relative size of either full or velvet antlers (Table 1; Table 2).

Figure 1. Effect of absolute antler size of roe deer with fully grown antlers on leucocyte counts at Trois Fontaines (black points corresponding to the average value per age, black line corresponding to the predicted values and dotted black lines corresponding to standard errors).

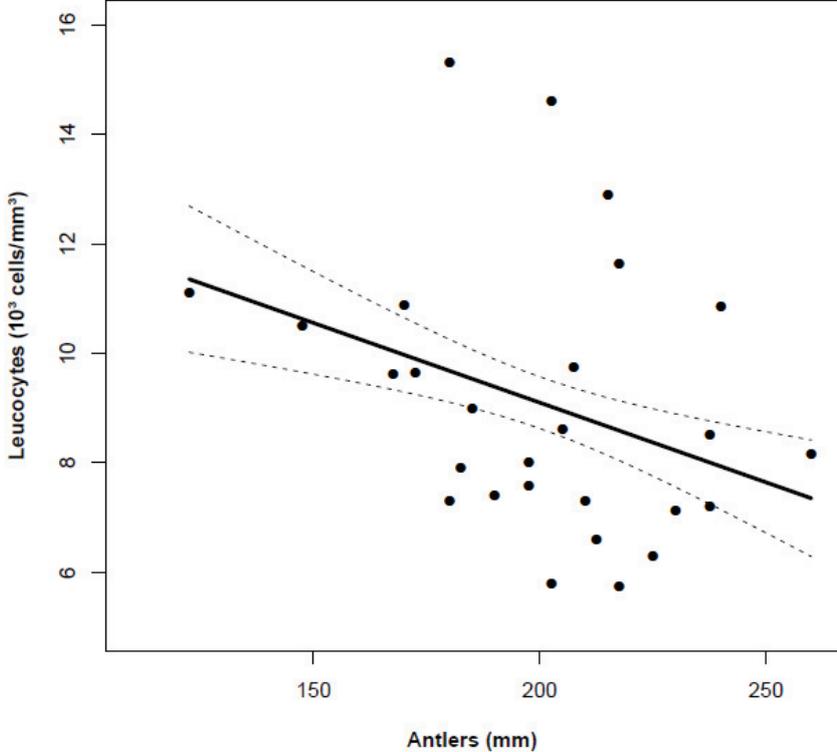


Figure 2. Effect of relative antler size of roe deer with fully grown antlers on neutrophil counts (black points corresponding to the average value per age at Trois Fontaines, black line corresponding to the predicted values at Trois Fontaines and dotted black lines corresponding to standard errors at Trois Fontaines; grey points corresponding to the average value per age at Chizé, grey line corresponding to the predicted values at Chizé and dotted grey lines corresponding to standard errors at Chizé).

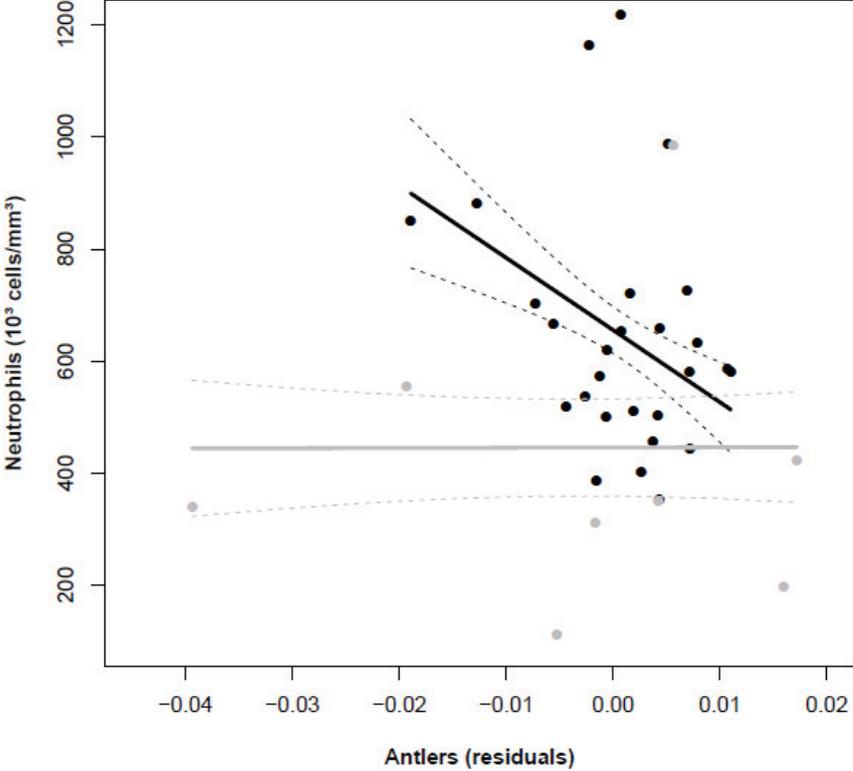
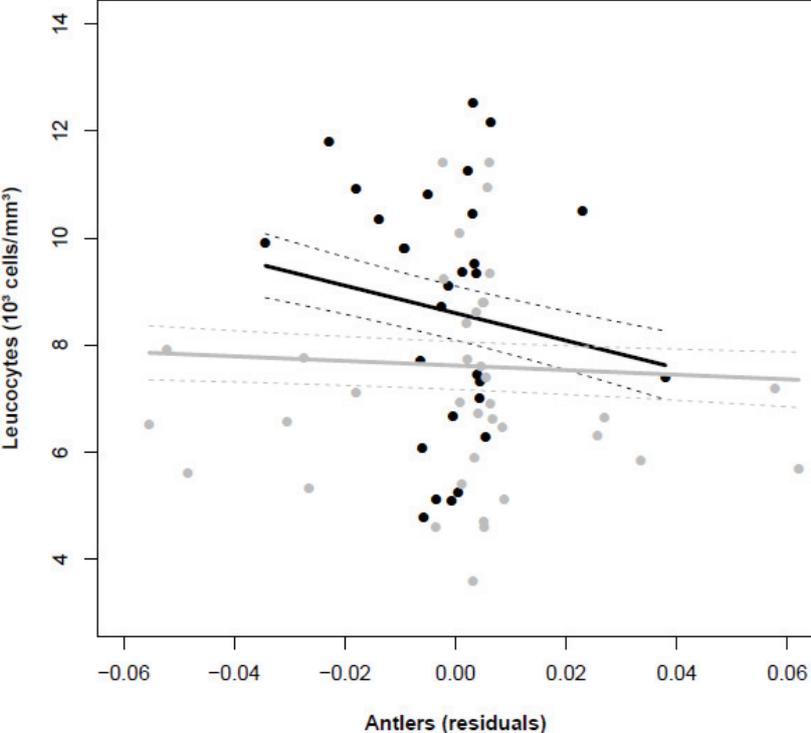


Figure 3. Effect of relative antler size of roe deer with still grown antlers on leucocytes counts (black points corresponding to the average value per age at Trois Fontaines, black line corresponding to the predicted values at Trois Fontaines and dotted black lines corresponding to standard errors at Trois Fontaines; grey points corresponding to the average value per age at Chizé, grey line corresponding to the predicted values at Chizé and dotted grey lines corresponding to standard errors at Chizé).



3.5. Discussion

We found a decrease of leucocytes and neutrophils count for both increasing absolute and relative full antler size and relative velvet size at only one of our study site, Trois Fontaines. Moreover, the concentration of gamma globulins decreased with increasing absolute full antler size and increased with relative velvet antler size, without any difference between populations.

Leucocytes count provides an integrative measure of cellular immunity, including leucocytes subsets both in adaptive immunity (lymphocytes T CD4+) and innate immunity (monocytes). Moreover, leucocyte counts are widely used as indices of condition (Yochem et al. 2008). In our study, we found a decrease of leucocytes count with increasing antler size. The same pattern of variation was observed using neutrophils count.

In the same populations, Gilot-Fromont et al. (2012) found that roe deer with high body condition allocated more in innate immunity, the most energetically costly immune response (Klasing 2004). In contrast, the levels of immunoglobulins G (IgG) were higher in roe deer with low body condition, i.e. at Chizé. We found no variation of immune components with increasing antler size at Chizé. First, we suggested that the small sample size for full antler size ($n = 6$) could explain the absence of variation. Consequently, no firm conclusion can yet be drawn. However, no variation in leucocytes count was detected with increasing velvet antler size, in spite of larger sample sizes. The absence of variation of immune components with antler size at Chizé may involve the down-regulation of innate immunity because of competition for limited resources between immunocompetence and other costly activities. We thought that the increase of gamma globulins with increasing relative velvet antler size was due to the small sample size observed at Chizé and the increase of leucocytes count with increasing absolute fully grown antlers at Chizé was driven by only one individual.

At Trois Fontaines, a trade-off occurred between a secondary sexual character like antler and immunocompetence, in accordance with the trade-off hypothesis in agreement with previous studies of trade-offs between immune functions and fitness-related traits (Norris and Evans 2000) or secondary sexual character (Verhulst et al. 1999). The central idea behind “sexual ornament is an honest signal of male quality” (Zahavi 1975) is the antagonism between secondary sexual character and the ability of host to respond efficiently to counter or limit infection, i.e. immunocompetence. Two hypotheses could be proposed to explain this antagonism. First, based on resource allocation principle, secondary sexual character and immune system are competing for the same resources (Stearns 1992). Secondly, a third component, testosterone could impact positively the secondary sexual character and negatively the immune system (Folstad and Karter 1992) or reallocate immune resources (Braude et al. 1999).

Consequently, we suggest that the trade-off we found at Trois Fontaines could be explained by immunosuppressive effects of testosterone, in agreement with Folstad and Karter (1992). In support, Greives et al. (2006) found a negative correlation between plasma testosterone and components of innate immunity and an experimental study of lizards suggested that correlation between testosterone and immunocompetence could arise in the wild as a consequence of variation in food and/or energy availability (Ruiz et al. 2010). However, Ezenwa et al. (2012) found that testosterone was positively correlated with neutrophils proportion. On the contrary of our expectation, our results failed to support the hypothesis of immunoredistribution because no increase of neutrophils or decrease of lymphocytes was detected.

We suggest that the trade-off could be mediated by resources limitation and testosterone relationships. Several studies have shown that there is a metabolic cost of immune defense and showed that the nutritional cost of using the non-specific immunity is very high with

medium cost of maintenance (Klasing 2004). There is evidence that a short-term decrease in food intake can reduce immunocompetence (Moret and Schmid-Hempel 2000), suggesting that a trade-off between sexual characters and immunocompetence could be driven by the direct effects of energy reallocation to costly metabolic functions. The relationship between high circulating levels of testosterone with increased metabolic rate could lead to a decrease of energy available for costly functions, including the capacity to amount an immune response (Duckworth et al. 2001). Finally, circulating levels of testosterone might act as a direct or indirect immunosuppressive effect. Indeed, androgen receptors occur in both types of immune cells (Tanriverdi et al. 2003), but studies, especially in birds, rather support an indirect effect of testosterone by triggering the secretion of glucocorticoids, known to be immunosuppressive (Owen-Ashley et al. 2004) or a consequence of energy reallocation.

Table 1. Effect of absolute and relative antler size in roe deer with fully grown antlers on immune components

Absolute scale						
	Intercept	Age (years)	Population	Antler	Antler*site	P
	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	
WBC	17.01 \pm 3.39	-0.50 \pm 0.16	-15.56 \pm 5.68	-0.03 \pm 0.01	0.07 \pm 0.03	0.018
LY	402.82 \pm 145.03	-14.10 \pm 7.13	-320.44 \pm 237.61	-0.63 \pm 0.68	1.49 \pm 1.31	0.223
NE	1318.79 \pm 297.04	-37.54 \pm 14.44	-1149.40 \pm 505.49	-2.58 \pm 1.40	5.08 \pm 2.73	0.053
GA	21.99 \pm 6.53	0.15 \pm 0.24	-7.92 \pm 8.24	-0.01 \pm 0.03	0.01 \pm 0.04	> 0.05
HL	4.14 \pm 9.95	-0.17 \pm 0.39	6.12 \pm 12.28	0.002 \pm 0.041	-0.02 \pm 0.06	0.586
Relative scale						
	Intercept	Age (years)	Population	Antler	Antler*site	P
	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	
WBC	11.22 \pm 0.88	-0.48 \pm 0.17	-2.98 \pm 1.08	-127.65 \pm 75.79	145.21 \pm 88.86	0.082
LY	270.52 \pm 36.93	-12.94 \pm 7.24	-44.25 \pm 43.25	-668.16 \pm 3167.61	2241.98 \pm 3837.97	0.691
NE	808.90 \pm 74.25	-37.01 \pm 14.54	6209.71 \pm 95.96	-12888.52 \pm 6397.94	12926.22 \pm 6828.54	0.043
GA	20.80 \pm 1.63	-0.04 \pm 0.18	-5.09 \pm 1.95	92.60 \pm 17.47	-38.98 \pm 102.54	> 0.05
HL	4.72 \pm 5.13	-0.20 \pm 0.38	1.31 \pm 2.36	47.51 \pm 202.23	-122.82 \pm 222.67	0.472

Antler*site: interaction between antler size and site from the full model; Antler: main effect of antler size from the full model; P: p-value of the Likelihood Ratio Test; $\beta \pm SE$: coefficients estimated from the linear mixed model with standard error using Trois Fontaines site as reference for interactions; WBC: leucocytes count; LY: lymphocytes count; NE: neutrophils count; GA: gammaglobulins concentration (g/L); HL: hemolysis (score of dilution)

Table 2. Effect of absolute and relative antler size in roe deer with still growing antlers on immune components

Absolute scale						
	Intercept	Age (years)	Population	Antler	Antler*site	P
	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	
WBC	7.74 ± 2.00	0.16 ± 0.11	0.52 ± 2.51	0.0005 ± 0.01	-0.01 ± 0.015	0.514
LY	199.90 ± 87.42	1.72 ± 5.24	6.77 ± 112.83	0.10 ± 0.51	-0.27 ± 0.66	0.662
NE	559.07 ± 157.71	10.03 ± 9.18	10.79 ± 200.77	-0.19 ± 0.93	-0.34 ± 1.19	0.772
GA	25.74 ± 2.42	0.38 ± 0.16	-6.42 ± 3.68	-0.04 ± 0.02	8.45 ± 3.44	> 0.05
HL	0.44 ± 2.52	0.12 ± 0.11	-2.38 ± 2.45	0.0006 ± 0.011	0.017 ± 0.014	0.192
Relative scale						
	Intercept	Age (years)	Population	Antler	Antler*site	P
	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	$\beta \pm SE$	
WBC	7.98 ± 0.71	0.12 ± 0.10	-0.98 ± 0.67	-25.70 ± 9.87	21.41 ± 10.85	0.041
LY	216.14 ± 33.41	1.62 ± 5.20	-963.26 ± 1703.86	-963.26 ± 1703.86	981.26 ± 1882.30	0.588
NE	525.67 ± 58.41	10.09 ± 9.09	-45.92 ± 52.62	-982.22 ± 1575.72	136.57 ± 1724.92	0.970
GA	19.34 ± 1.09	0.33 ± 0.17	-5.77 ± 0.99	-27.65 ± 20.75	8.12 ± 4.15	> 0.05
HL	0.31 ± 1.72	0.13 ± 0.12	0.43 ± 0.65	-8.84 ± 37.30	35.35 ± 41.66	0.341

Antler*site: interaction between antler size and site from the full model; Antler: main effect of antler size from the full model; P: p-value of the Likelihood Ratio Test; $\beta \pm SE$: coefficients estimated from the linear mixed model with standard error using Trois Fontaines site as reference for interactions; WBC: leucocytes count; LY: lymphocytes count; NE: neutrophils count; GA: gammaglobulins concentration (g/L); HL: hemolysis (score of dilution)

Table 3. Effect of absolute and relative antler size alone in roe deer with fully grown antlers on immune components

Absolute scale					
	Intercept $\beta \pm SE$	Age (years) $\beta \pm SE$	Population $\beta \pm SE$	Antler $\beta \pm SE$	P
WBC	13.12 \pm 3.05	-0.44 \pm 0.17	-2.97 \pm 1.22	-0.01 \pm 0.01	0.441
LY	310.85 \pm 121.04	-12.31 \pm 6.95	-54.95 \pm 46.13	-0.21 \pm 0.57	0.691
NE	1040.19 \pm 260.12	-33.78 \pm 14.61	-230.02 \pm 1.24	-1.27 \pm 1.24	0.292
GA	21.99 \pm 6.53	0.15 \pm 0.24	-7.92 \pm 8.24	-0.01 \pm 0.03	> 0.05
HL	6.34 \pm 8.20	-0.19 \pm 0.38	1.14 \pm 2.59	-0.002 \pm 0.01	0.776
Relative scale					
	Intercept $\beta \pm SE$	Age (years) $\beta \pm SE$	Population $\beta \pm SE$	Antler $\beta \pm SE$	P
WBC	10.88 \pm 0.88	-0.43 \pm 0.17	-2.90 \pm 1.11	-20.89 \pm 39.47	0.605
LY	265.55 \pm 35.55	-12.06 \pm 7.01	-44.93 \pm 42.77	870.44 \pm 1740.87	0.596
NE	773.73 \pm 74.95	-30.80	-208.05 \pm 99.49	-1622.65 \pm 2402.55	0.512
GA	20.80 \pm 1.63	-0.04 \pm 0.18	-5.09 \pm 1.95	92.60 \pm 17.47	< 0.05
HL	4.92 \pm 5.03	-0.20 \pm 0.37	1.12 \pm 2.29	-18.17 \pm 29.18	0.443

Antler: Main effect of antler size from the additive model ; P: p-value of the Likelihood Ratio Test; $\beta \pm SE$: coefficients estimated from the linear mixed model with standard error using Trois Fontaines site as reference for interactions; WBC: leucocytes count; LY: lymphocytes count; NE: neutrophils count; GA: gammaglobulins concentration (g/L); HL: hemolysis (score of dilution)

Table 4. Effect of absolute and relative antler size alone in roe deer with still growing on immune components

Absolute scale					
	Intercept $\beta \pm SE$	Age (years) $\beta \pm SE$	Population $\beta \pm SE$	Antler $\beta \pm SE$	P
WBC	8.68 \pm 1.32	0.16 \pm 0.11	-1.00 \pm 0.68	-0.005 \pm 0.007	0.459
LY	226.35 \pm 60.22	1.78 \pm 5.20	-39.06 \pm 28.49	-0.06 \pm 0.326	0.849
NE	591.73 \pm 106.75	10.16 \pm 9.11	-45.60 \pm 53.14	-0.40 \pm 0.58	0.476
GA	25.74 \pm 2.42	0.38 \pm 0.16	-6.42 \pm 3.68	-0.04 \pm 0.02	< 0.05
HL	-1.08 \pm 2.16	0.12 \pm 0.11	0.37 \pm 0.64	0.01 \pm 0.007	0.116
Relative scale					
	Intercept $\beta \pm SE$	Age (years) $\beta \pm SE$	Population $\beta \pm SE$	Antler $\beta \pm SE$	P
WBC	7.81 \pm 0.71	0.16 \pm 0.10	-1.01 \pm 0.67	-7.77 \pm 4.55	0.091
LY	216.88 \pm 33.19	1.67 \pm 5.17	-38.93 \pm 28.51	-159.14 \pm 719.60	0.819
NE	527.64 \pm 58.15	9.65 \pm 8.98	-45.41 \pm 52.62	-857.65 \pm 582.83	0.136
GA	19.34 \pm 1.09	0.33 \pm 0.17	-5.77 \pm 0.99	-27.65 \pm 20.75	> 0.05
HL	0.43 \pm 1.71	0.13 \pm 0.12	0.41 \pm 0.65	19.42 \pm 16.72	0.198

Antler: Main effect of antler size from the additive model ; P: p-value of the Likelihood Ratio Test; $\beta \pm SE$: coefficients estimated from the linear mixed model with standard error using Trois Fontaines site as references for interactions; WBC: leucocyte counts; LY: lymphocyte counts; NE: neutrophil counts; GA: gammaglobulins concentration (g/L); HL: hemolysis (score of dilution)

3.6. Appendix 1

Figure S1. Effect of relative antler size of roe deer with fully grown antlers on gammaglobulins (black points corresponding to the average value per age at Trois Fontaines, black line corresponding to the predicted values).

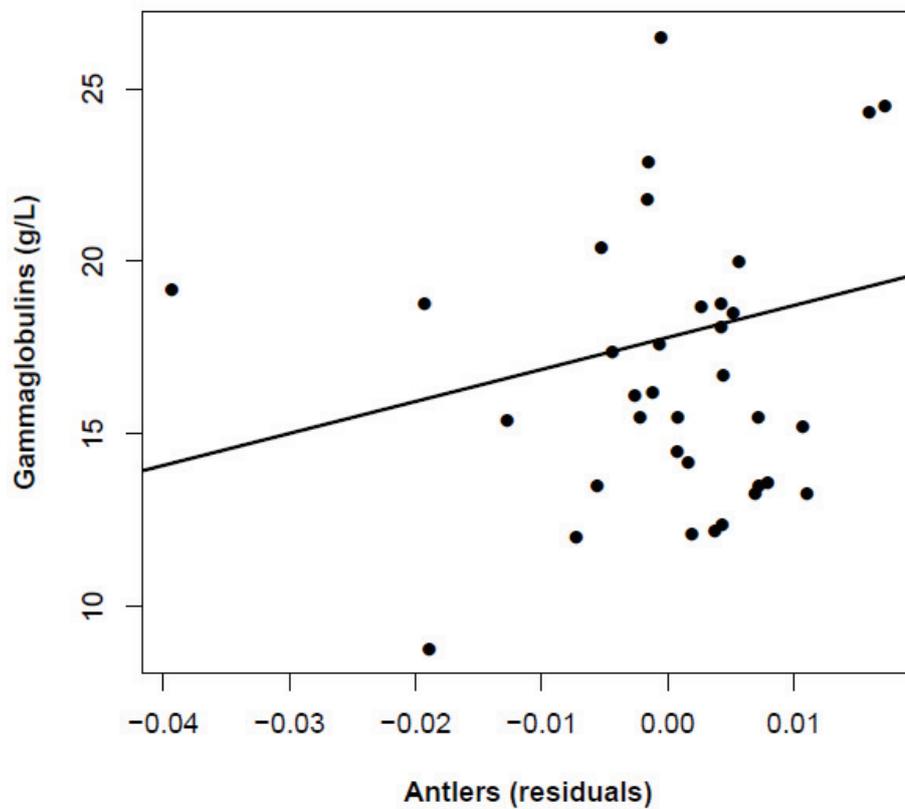
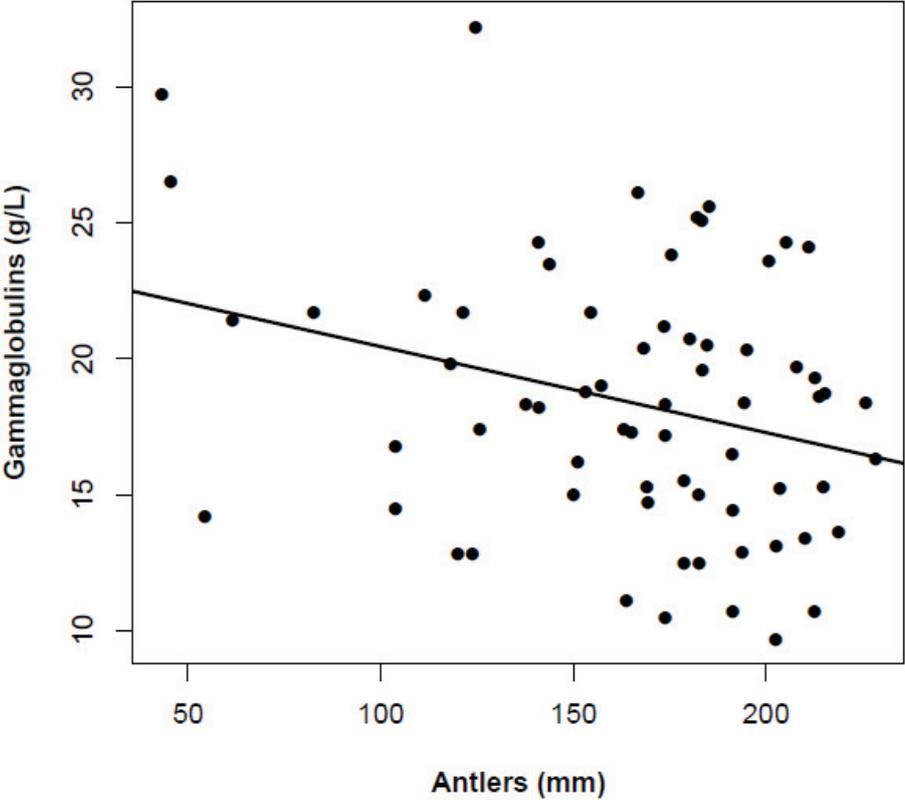


Figure S2. Effect of absolute antler size of roe deer with still velvet antlers on gammaglobulins (black points corresponding to the average value per age at Trois Fontaines, black line corresponding to the predicted values).



4. Conclusion

Les prédictions principales de l'article 4 étaient que les individus devaient être en meilleure condition physique lorsque les ressources sont plus importantes et que les paramètres immunologiques sont positivement corrélés à la condition physique. De plus, nous nous attendions à ce que l'immunité soit davantage orientée vers la réponse innée lorsque les individus sont en bonne condition physique, du fait du coût relativement important de ce type de réponse. Nous avons montré que le lien entre condition physique et immunocompétence ne se présente pas sous la forme « bonne condition-bonne immunocompétence » et inversement, mais révèle une relation plus subtile. Les indicateurs de la condition physique semblent tous covarier positivement. Nous confirmons aussi que les individus de Chizé présentent une moins bonne condition physique que ceux de Trois Fontaines. De plus, comme prédit, une bonne condition physique est corrélée à une immunité tournée vers la réponse innée (neutrophiles, ratio neutrophile / lymphocyte, ou haptoglobine, complément). A l'inverse, les individus en mauvaise condition présentent des niveaux de lymphocytes, monocytes et gammaglobulines plus élevés.

La première explication possible de ces variations de l'immunocompétence est qu'elles seraient liées aux agents pathogènes présents, qui pourraient moduler cette réponse immunitaire, suggérant des réponses immunitaires spécifiques dans chacune des populations. Une autre explication possible de ce résultat est qu'il serait lié au coût de l'immunité. Comme expliqué dans le chapitre I, le coût nutritionnel d'utilisation de l'immunité innée est plus élevé que celui de l'immunité adaptative (Klasing 2004). Il est donc possible de supposer que les individus de Trois Fontaines, ayant une meilleure condition physique que les individus de Chizé, sont plus aptes à utiliser les composantes de l'immunité innée afin de lutter efficacement contre les agents pathogènes.

Dans l'article 5, nous avons abordé le compromis entre les caractères sexuels secondaires et l'immunité chez les mâles dans le cadre de la sélection sexuelle. Nous avons testé l'hypothèse d'un compromis entre les bois et les paramètres immunitaires en s'appuyant sur le fait que ces deux fonctions sont coûteuses, mais nous avons également considéré la possibilité que cette relation fasse intervenir la testostérone comme composante immunosuppressive. En accord avec l'hypothèse du compromis, nous avons mis en évidence que les mâles avec les bois les plus longs présentaient des niveaux de leucocytes et de neutrophiles plus faibles que les individus avec les bois les plus courts. Concernant les individus de Chizé, le faible nombre d'individus ayant des bois durs (i.e. croissance finie) rend l'interprétation difficile. Nous suggérons que le compromis entre les bois et l'immunité pourrait être causé à la fois par les ressources disponibles mais également et de manière directe et indirecte par la testostérone. La testostérone pourrait agir de manière directe car des récepteurs ont été trouvés sur les cellules immunitaires d'une part, agir de manière indirecte car des taux élevés de testostérone associés à un taux métabolique fort pourrait entraîner une diminution de l'énergie disponible pour les fonctions coûteuses, dont la réponse immunitaire.

DISCUSSION GÉNÉRALE

De nombreuses études proposent que la prise en compte des trois facteurs que sont la valeur sélective de l'hôte, les densités parasitaires ainsi que les réponses immunitaires, est essentielle pour la compréhension des relations hôtes-pathogènes dans le contexte de l'écologie évolutive (Martin et al. 2011).

En conséquence, nous avons, dans cette thèse, analysé simultanément ces trois facteurs dans deux populations de chevreuils. L'ensemble des résultats obtenus a permis non seulement la mise au point d'un ensemble de marqueurs et d'indicateurs de l'état de santé des chevreuils, en incluant la condition physique, le parasitisme et surtout la compétence immunitaire, mais également de comprendre le lien entre la compétence immunitaire et l'état de santé à l'échelle individuelle. Les paragraphes suivants discuteront tout d'abord les possibilités de mesurer l'immunocompétence dans les populations sauvages, puis les résultats concernant le parasitisme, la condition physique et l'immunocompétence, avant de proposer des perspectives de recherche et des pistes pratiques d'utilisation des méthodes mises au point.

1. Comment mesurer l'immunité dans les populations sauvages

L'étude des fonctions immunitaires des animaux sauvages dans le cadre de l'éco-immunologie (Sheldon et Verhulst 1996 ; Martin et al. 2011) a mené à d'importantes découvertes. Parmi elles, le coût de l'activité immunitaire, les compromis entre l'immunité et d'autres fonctions physiologiques et l'activité immunitaire comme une composante de la sélection sexuelle. Les compromis entre l'immunité et les autres fonctions ou activités impliquent que l'immunocompétence peut être limitée par les ressources et que l'investissement dans une des composantes de l'histoire de vie peut se faire au détriment de l'immunocompétence. Ces variations dans le choix d'investissement dans l'immunité entraîne ainsi des variations des défenses immunitaires au sein et entre les espèces (Nelson et Demas 1996 ; Martin et al. 2001 ; Tella et al. 2002 ; Martin et al. 2006a).

Ces enjeux justifient de poursuivre l'analyse de l'immunité dans les populations sauvages, même si les travaux sur l'immunité en populations sauvages ont des limites méthodologiques importantes à l'heure actuelle.

1.1. Contraintes liées au suivi de terrain

1.1.1. Le suivi des populations

L'étude des espèces non domestiques dans le milieu naturel engendre une multitude de contraintes, et le suivi des populations de chevreuils utilisé dans cette thèse n'échappe pas à cette règle. Ici, les données sont issues de captures hivernales qui demandent de nombreux moyens en personnels (entre 100 et 250 personnes environ), en matériel et en matière d'organisation, pendant une saison où les conditions météorologiques sont parfois défavorables.

A titre d'exemple des difficultés rencontrées, la distance qui sépare les sites d'étude des laboratoires d'analyse impose une contrainte forte pour les échantillons qui contiennent des matériaux fragiles (cellules vivantes) nécessitant un stockage ou une analyse après la réalisation du prélèvement. Pour Trois Fontaines, des trajets allers et retours dans la même journée ont été réalisés lors de chaque session de capture pour pouvoir rapporter les échantillons moins de 24h après les prises de sang. Il a été impossible de procéder de la même manière à Chizé. En effet, les échantillons ont été envoyés par la poste et ont été reçus 24 à 48h après la prise de sang. L'analyse des données issues du typage lymphocytaire montre que le délai écoulé entre la prise de sang et la congélation a une influence sur la proportion de plusieurs sous-populations de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). De plus, même lorsque la distribution de PBMC n'a pas été affectée par le délai entre la prise de sang et la congélation, le temps écoulé pourrait affecter la fonction des cellules de l'immunité mais également dégrader les protéines.

1.1.2. Le suivi longitudinal par capture physique des chevreuils

Les chevreuils sont capturés physiquement, marqués, différents prélèvements sont effectués puis les individus sont relâchés. Pour atteindre un nombre de captures suffisant en termes de puissance statistique, cela impose tout d'abord que la probabilité de recapture soit élevée : c'est le cas à Chizé et à Trois Fontaines (le taux de capture pour le chevreuil de plus d'un an est de 0,5 pour Chizé et Trois Fontaines, Gaillard et al. 1993).

L'objectif était à l'origine, de capturer au minimum 75 individus d'âge connu par population et par année. Dans le cadre de cette thèse, les captures ont permis de récolter les données sur un nombre important d'individus par année et par population. Concernant les captures de Trois Fontaines, 125 individus ont été capturés en 2010, 79 individus en 2011, 85 individus en

2012 et 78 individus en 2013. A Chizé, 74 individus ont été capturés en 2010, 86 individus en 2011, 83 individus en 2012 et 78 individus en 2013.

La deuxième contrainte est le fait que les chevreuils sont physiquement capturés à l'aide de filets, ce qui engendre un stress de capture. Ce stress impliquait également de choisir des indicateurs qui n'étaient pas affectés par le stress. Par exemple, la mesure de la fructosamine a été privilégiée par rapport à la mesure de la glycémie, trop fortement affectée par le stress aigu. Par contre, nous ne disposons pas d'information complète sur la réponse des indicateurs mesurés au stress de la capture. Une mesure parallèle du niveau de stress (cortisol ou indicateur associé) permettrait d'analyser si les captures ont eu un effet sur les paramètres mesurés et si une prise en compte du niveau de stress variable permettrait d'améliorer l'analyse. Nous discuterons plus bas de l'impact du stress sur le système immunitaire.

La troisième contrainte est spécifique aux protocoles consistant à suivre des animaux de manière longitudinale, pour de nombreux paramètres simultanément (condition physique, parasitisme, immunité). Elle impose tout d'abord que toutes les analyses pertinentes soient faites à toutes les captures. Par exemple, les macroparasites sont détectés par coproscopie à partir de la matière fécale récoltée *per rectum* lors de la manipulation des chevreuils. Si le rectum est vide au moment du prélèvement, l'absence de données a des répercussions sur l'analyse dans son ensemble. Ensuite le suivi longitudinal implique que les animaux capturés et relâchés puissent poursuivre le cours de leur vie sans que l'étude les perturbe. L'estimation de la faune parasitaire est ainsi faite par coproscopie, bien que l'autopsie de l'animal et le prélèvement direct dans le tractus digestif permettraient de meilleures estimations mais nécessiteraient de sacrifier ou induiraient un stress trop important pour l'animal.

1.2. Principes de mesure de l'immunocompétence

1.2.1. Prendre en compte la complexité du système immunitaire

Tester l'ensemble des hypothèses qui lient la complexité du système immunitaire aux concepts de biologie évolutive nécessite d'utiliser des outils adaptés. Un des points soulevés par certains auteurs est l'utilisation d'une seule mesure qui caractérise l'ensemble de l'immunocompétence (Martin et al. 2006b), ce qui engendre une « sursimplification » du système immunitaire. Or, les différentes mesures possibles de l'immunité ne sont pas toutes corrélées entre elles (Faivre et al. 2003 ; Mallon et al. 2003), rendant les conclusions difficilement généralisables.

Pour éviter cette « sursimplification » des fonctions immunitaires, nous avons adapté le modèle conceptuel des composantes des défenses immunitaires (Schmid-Hempel et Ebert 2003) dans le cadre de nos études. Nous nous sommes proposés de décomposer le système immunitaire en quatre quadrants de base : les deux principaux gradients se réfèrent d'une part au gradient cellulaire-humoral et d'autre part, au gradient inné-acquis. Ainsi, il est possible de caractériser l'ensemble des fonctions immunitaires par des mesures dans chacun des quadrants, mais aussi de prendre en considération les coûts relatifs dans chacune des branches de l'immunité. L'utilité d'utiliser ce modèle conceptuel a d'ailleurs été montrée dans le cadre d'études visant à analyser les coûts des différents quadrants chez les moineaux, *Passer domesticus*, à la lumière des autres coûts physiologiques auxquels ils sont soumis (Martin et al. 2006a).

Cependant, ce modèle a principalement été adapté pour mettre en évidence des compromis entre une fonction et les différents quadrants de l'immunité. Ce modèle ne prend donc pas en compte les compromis qui peuvent exister entre les différentes voies immunitaires au sein d'un quadrant. Ce modèle mériterait donc d'être complété en distinguant par exemple, les

voies Th1 et Th2, qui, comme nous l'avons vu, sont impliquées dans les réponses liées à l'entrée respectivement d'un microparasite et d'un macroparasite. Plusieurs études montrent que ces deux voies se régulent mutuellement négativement (Jolles et al. 2008).

1.2.2. Extrapoler les connaissances d'une espèce domestique dans une espèce sauvage

Les fonctions immunitaires restent difficiles à caractériser dans les populations sauvages car, bien que le système immunitaire des mammifères soit en général bien connu, les connaissances sur les espèces domestiques ne sont pas toujours extrapolables aux espèces sauvages (Adamo 2004 ; Keil et al. 2001 ; Martin 2011). A titre d'exemple, dans notre cas du marquage leucocytaire, les anticorps monoclonaux qui croisent pour le bovin, l'ovin ou le caprin n'ont pas croisé pour le chevreuil. Il y a donc une nécessité de mettre au point des tests spécifiques pour comprendre les variations des différents traits liés à la faune sauvage.

1.2.3. Tests descriptifs et fonctionnels

Alors que le test descriptif prend en compte l'histoire parasitaire de l'hôte, le test fonctionnel reflète davantage la capacité de l'hôte à répondre à une stimulation. De plus, des études ont également mis en avant l'effet seuil dans les tests descriptifs (Adamo 2004) : les changements observés dans les niveaux des composantes de l'immunité pourraient ne pas avoir d'effet sur les performances immunitaires (Keil et al. 2001). En suivant ce raisonnement, on peut supposer que les variations des concentrations des différentes composantes de l'immunité n'aient finalement aucun impact significatif sur l'immunocompétence de l'hôte. Par exemple, Wilson et al. (2001) montrent chez la souris que la réduction d'environ 40 % du nombre de cellules « *Natural Killers* » circulants n'entraîne aucune modification de la capacité des hôtes à répondre à un agent pathogène.

Les tests fonctionnels reflètent davantage la capacité de l'hôte à répondre à une stimulation. Ainsi, une mesure interprétable de l'immunocompétence requiert l'utilisation conjointe de tests descriptifs et fonctionnels.

1.3. Tests proposés chez le chevreuil

Afin d'identifier les variations du système immunitaire chez le chevreuil et tester nos hypothèses, nous avons mis au point un ensemble de méthodes permettant de caractériser et de mesurer la réponse immunitaire dans chacun des quadrants du modèle conceptuel adapté à notre étude, avec des mesures à la fois descriptives et fonctionnelles.

1.3.1. Caractérisation des leucocytes

Tout d'abord, la cross-réactivité entre les différentes sous-populations de leucocytes et les anticorps monoclonaux constitue une étape préliminaire mais primordiale puisque les sous-populations lymphocytaires ne sont pas discernables morphologiquement. La caractérisation du système immunitaire à l'aide d'anticorps monoclonaux a permis de discriminer différentes sous-populations de leucocytes, en particulier des monocytes et des sous-populations de lymphocytes. Nous avons montré que les distributions de monocytes varient avec la population, et que les sous-populations de lymphocytes diffèrent avec l'âge.

A côté de cette description, nous avons vu que les capacités fonctionnelles des acteurs de l'immunité doivent être mesurées pour pleinement estimer la fonctionnalité de l'immunité. Dans ce but, nous avons entrepris de mettre au point des méthodes permettant de mesurer la capacité de chacune des sous-populations de lymphocytes à effectuer une prolifération clonale. Les résultats préliminaires montrent que la stimulation par le PMA ionomycine permet d'observer des variations entre les individus dans la prolifération clonale des lymphocytes T pour une concentration de 10 µg/mL. De plus, la stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) permettrait de compléter l'information de prolifération clonale une

fois l'isolement des lymphocytes B fait et surtout une fois que la concentration qui permet d'observer des variations sera déterminée. Les futures recherches devront se focaliser sur la finalisation de la mise en place de ces deux méthodes de mesures chez le chevreuil.

Une fois ces tests mis au point, il serait envisageable d'aller plus loin pour mettre en évidence les compromis possibles entre les différentes voies du système immunitaire comme par exemple les réponses Th1/Th2. Les vertébrés répondent différemment au contact d'un microparasite intracellulaire (comme certains virus ou protozoaires, avec une réponse « *T helper* » de type 1) et à celui d'un macroparasite (par exemple un nématode qui induit une réponse « *T helper* » de type 2). Or ces deux réponses sont antagonistes et la stimulation de l'une entraîne l'inhibition de l'autre (Fenton et al. 2008 ; Jolles et al. 2008). Dans les populations naturelles de buffles *Syncerus caffer*, Ezenwa et al. (2010) ont montré que les individus résistants à l'infection par les nématodes présentent une réponse Th1 plus faible que les autres et que la suppression de la réponse induite contre les helminthes facilite l'infection par la tuberculose bovine. De plus, des niveaux élevés de glucocorticoïdes peuvent provoquer une suppression de l'axe de l'immunité Th1 au profit de la voie Th2 (Elenkov 2006) et des carences en micronutriments de type Zinc, peuvent également affecter la voie Th1 (Prasad 2000).

L'étude de ces deux réponses chez le chevreuil permettrait de mettre en évidence des compromis au sein des individus dans leurs réponses à l'entrée des agents pathogènes de nature différente. En effet, les chevreuils, comme la plupart des hôtes, sont infectés par une multitude de parasites et l'infection, par exemple par des helminthes, peut compromettre la capacité à répondre et contrôler une infection par un microparasite intracellulaire.

1.3.2. Fonctionnalité des monocytes

Une autre sous-population de leucocytes a été particulièrement étudiée pendant cette thèse, celle des monocytes, dans le but de mettre au point un test fonctionnel capable de mesurer la capacité phagocytaire chez le chevreuil. Précurseurs des macrophages, les monocytes caractérisent l'immunité innée cellulaire. Peu d'études en éco-immunologie se sont attachées à l'effet des cellules phagocytaires, principalement à cause de la difficulté de la mise au point de la méthode pour l'étudier (Grasman 2002). Cependant, l'étude de l'activité phagocytaire présente un intérêt crucial en éco-immunologie. En effet, la survie et les fonctions des cellules phagocytaires seraient dépendantes des concentrations hormonales dans le sang ; on observe par exemple une immunosuppression par les androgènes et les glucocorticoïdes (Slater et Schreck 1997). De plus, des patrons de sénescence ont été observés dans l'activité phagocytaire ainsi que dans l'expression des CD16, marqueur des NK, macrophages, monocytes (Butcher et al. 2001). Cependant, à la lumière des premiers résultats que nous avons acquis, le test de phagocytose chez le chevreuil nécessite encore quelques contrôles et mises au point. D'une part, il est nécessaire de confirmer la phagocytose à l'aide de l'anticorps secondaire. D'autre part, certains résultats tendent à montrer que la phagocytose observée ne reflète finalement qu'une liaison simple entre les cellules immunitaires et le Zymosan. Ainsi donc, il est essentiel de contrôler plusieurs paramètres afin de valider le test fonctionnel, tels que la préparation des cellules spécifiques pour ce test, la quantité de Zymosan, et le temps de contact entre le Zymosan et les cellules immunitaires. Nous verrons en perspectives que de nouveaux moyens techniques de mesure de la phagocytose seront probablement prochainement disponibles et pourraient faciliter certaines de ces étapes.

2. Variations des deux déterminants de l'immunocompétence : la condition physique et le parasitisme

2.1. Relations entre condition physique et parasitisme

Nous avons montré dans un premier temps qu'il existait des liens entre l'abondance parasitaire et la condition physique, mesurée par des paramètres hématologiques et biochimiques (Article 2). Cette étude était justifiée par le fait que ces deux éléments étant les principaux déterminants de l'immunocompétence, il était donc important de connaître leurs relations pour prendre en compte des possibles confusions dans le lien avec l'immunité. Les résultats montrent une corrélation négative entre l'abondance parasitaire et plusieurs paramètres physiologiques (l'hématocrite, la créatinine et la fructosamine). Ce résultat conforte l'hypothèse que des paramètres plus détaillés que la masse corporelle peuvent être utilisés afin de mettre en évidence l'impact du parasitisme sur les performances physiologiques de l'hôte. En effet, alors qu'aucune corrélation entre la masse corporelle et l'abondance des différentes espèces ou groupes d'espèces parasites n'a pu être mise en évidence à Chizé, une corrélation marquée a pu être observée avec des paramètres comme l'hématocrite ou la créatinine (Article 2). Il n'est pas possible, dans le cadre de cette étude, de mettre en évidence les liens de causalité entre ces deux déterminants. D'après Beldomenico et Begon (2010), la synergie entre la condition physique et les infections pourrait résulter à l'origine de la faible condition physique des individus, entraînant une prédisposition à l'infection qui, elle-même, engendrerait une diminution de la condition physique. Plusieurs pistes permettraient d'aller plus loin dans la causalité, comme une étude longitudinale, avec éventuellement des captures plus fréquentes (mensuelles) qui permettrait de comprendre la synergie condition physique / infection ; par ailleurs, la manipulation du système en vermifugeant une partie des individus pourrait apporter des éléments de preuve de causalité.

Compte tenu de la difficulté de recapture des chevreuils (moyens financiers et humains), cette étude serait aussi envisageable pour une autre espèce de mammifères plus facilement recapturable.

2.2. Implication sur la connaissance de la pathogénie des parasites

Les résultats de l'article 2 apportent également des connaissances nouvelles sur les conséquences physiologiques du parasitisme. Au contraire de certaines études qui ont montré que l'infestation par les nématodes gastrointestinaux pouvait mener à une hypoprotéïnémie, notamment une hypoalbuminémie (Saddiqi et al. 2012), et dans certains cas, à une anémie (Parkins et Holmes 1989). Nous n'avons trouvé aucun lien entre l'albumine et l'abondance des parasites testés dans aucune des deux populations. On peut supposer que les parasites testés ici n'engendrent pas de fuites protéiques (inflammations digestives, modifications du métabolisme ...) car aucune diminution de l'albumine n'a été observée, ou que celle-ci est remplacée rapidement.

Ces résultats peuvent aussi donner lieu à des applications: par exemple, une corrélation négative ayant été montrée entre l'hématocrite et l'abondance parasitaire dans notre étude, ce paramètre sanguin pourrait être utilisé comme un indicateur de la présence de nématodes gastrointestinaux hématophages (Chiejina et al. 2010 ; Saddiqi et al. 2012).

2.3. La relation parasitisme-condition physiologique se modifie avec l'âge

Notre étude a également permis de montrer l'importance de l'âge dans les relations entre hôtes et parasites et l'impact sur les performances physiologiques avec une corrélation négative entre parasitisme et paramètres physiologiques plus marquée chez les jeunes et les animaux âgés.

Les jeunes faons âgés de moins de 6 mois acquièrent leur immunité contre les nématodes gastrointestinaux à un rythme plus lent que les adultes (Coop et Holmes 1996). De plus,

l'histoire parasitaire chez les faons est plus courte que les adultes et ils n'ont donc pas encore été exposés à autant de parasites que les adultes. Par conséquent, la mise en place d'une réponse immunitaire efficace chez les jeunes et l'immunocompétence plus forte chez les adultes pourraient expliquer ces résultats.

Chez les animaux âgés, la sénescence est définie comme une détérioration progressive des performances cellulaires et des fonctions physiologiques qui mène progressivement à un déclin de la survie et de la reproduction (Monaghan et al. 2008).

Nous avons pu montrer que l'effet négatif du parasitisme sur les performances physiologiques de l'hôte chez les animaux âgés peut être expliqué par deux scénarios non mutuellement exclusifs. En effet, de récentes recherches ont mis en évidence de l'immunosénescence chez plusieurs espèces, comme l'Homme (Pawelec et al. 1999), les animaux domestiques (Blasco 2002) mais également en faune sauvage, par exemple chez le Diamant mandarin, *Taeniopygia gutatta*, et le mouton de Soay, *Ovis aries* (Hausmann et al. 2005 ; Nussey et al. 2012). Le second scénario envisageable est que la diminution de la prise alimentaire avec l'âge entraînerait des carences en nutriments indispensables pour l'hôte pour maintenir sa réponse immunitaire. Ces carences favoriseraient le déclin des performances physiologiques (Kojola et al. 1998), incluant les paramètres hématologiques et biochimiques mais également le maintien du système immunitaire, et auraient pour conséquence une augmentation de l'abondance parasitaire, menant à un cercle vicieux (Beldomenico et Begon 2010).

L'étude de la sénescence des paramètres hématologiques et biochimiques chez le chevreuil (Article 3) permet d'apporter de premiers éléments sur ces hypothèses. Ainsi, nous avons montré qu'il existait un déclin des paramètres physiologiques, incluant l'hématocrite, l'albumine et la créatinine, avec l'âge. Nous avons mis en évidence que la sénescence des paramètres hématologiques était contexte-dépendante et que les patrons de sénescence variaient selon le sexe et les ressources disponibles. Les résultats de ces travaux corroborent

l'hypothèse que l'augmentation du parasitisme chez les individus sénescents peut être une conséquence indirecte de la diminution de la prise alimentaire, entraînant des carences en nutriments.

3. Variations de l'immunité

Dans un second temps, nous avons montré qu'il existait des variations de l'immunocompétence modulées par plusieurs facteurs, principalement la condition physique (Article 4), l'âge (Article 1), la population et le sexe.

3.1. Effet population

Nous avons montré que les individus de Trois Fontaines présentent une meilleure condition physique que les individus de Chizé mais que les paramètres immunitaires n'étaient pas tous liés de la même manière à la condition physique (Article 4). En effet, les individus de Trois Fontaines possèdent, en moyenne, davantage de neutrophiles, et de capacité d'hémolyse que ceux de Chizé.

Le marquage des PBMC nous a permis de confirmer que l'immunité chez les individus de Trois Fontaines est davantage tournée vers l'immunité innée, par rapport à ceux de Chizé (Article 1). En effet, la proportion de marqueur des monocytes CD14 est supérieure à Trois Fontaines par rapport à Chizé. Pour rappel, les monocytes, et ce récepteur en particulier, ont un rôle majeur dans la réponse inflammatoire (Auffray 2009).

Une hypothèse pour expliquer ces différences est qu'elles proviennent d'une condition physique très différente d'un site à l'autre.

3.2. Lien avec la condition physique

On a observé que les individus en bonne condition physique présentaient une immunité plutôt tournée vers la réponse innée en comparaison avec des individus en mauvaise condition

physique qui présentaient une immunité tournée vers l'acquis (Article 4). Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de supposer que les individus en bonne condition physique peuvent investir dans les composantes les plus coûteuses de l'immunité, en l'occurrence ici l'innée (Klasing 2004). Cependant, ces variations observées, comme suggéré plus haut, pourraient ne pas avoir de conséquences sur l'efficacité de l'immunocompétence chez les individus ayant une faible condition physique. En effet, pour rappel, Adamo (2004) suggère la possibilité qu'il y ait plus de « *Natural Killers* » circulants que nécessaire, qualifiant cet excès de cellules circulantes comme les réserves immunitaires. Le bénéfice de l'utilisation d'énergie dans le but de créer des réserves immunitaires pourrait résulter du fait que les coûts de développement de certaines composantes soient plus élevés que d'autres. Ainsi, la création de réserves immunitaires lorsque les conditions sont favorables pourrait prévenir le déclin des fonctions immunitaires et la capacité des hôtes à monter une réponse immunitaire en période de famine, comme par exemple, l'immunoreforcement hivernal (Sinclair et Lochmiller 2000). Ces variations saisonnières de l'immunité pourraient être étudiées chez le chevreuil, notamment en effectuant des mesures répétées sur les individus, durant des périodes pré-hivernales, hivernales et post-hivernales.

3.3. Evolution de l'immunité avec l'âge

Actuellement, toutes les données issues du suivi longitudinal des chevreuils n'ont pas encore été étudiées du point de vue des variations de l'immunité avec l'âge. En fait, seules les informations issues du marquage des PBMC chez 112 individus ont été analysées (n = 60 à Trois Fontaines et n = 53 à Chizé).

Elles ont permis de montrer que les chevillards présentent un pourcentage plus élevé de lymphocytes T CD8⁺ et lymphocytes B activés que les adultes et inversement pour les lymphocytes T CD4⁺ (Article 1). Ces résultats sont conformes avec l'hypothèse que

l'immunité évolue avec l'âge depuis une immunité innée vers une immunité adaptative. Concernant l'évolution de l'immunité chez les individus âgés, la même étude a détecté un effet de l'âge pour les lymphocytes B activés avec un déclin entre les individus âgés de 2 ans et les plus âgés mais uniquement pour Trois Fontaines.

Les autres résultats disponibles à partir de cette étude, concernant l'ensemble des paramètres immunitaires sur tous les individus capturés depuis 5 ans permettront d'aller plus loin dans cette analyse, en particulier d'aborder directement l'hypothèse d'immunosénescence évoquée plus haut (Nussey et al. 2012).

4. Parasites, immunocompétence et sélection sexuelle

Nous avons évalué le lien entre l'immunocompétence et les caractères sexuels secondaires chez les chevreuils mâles durant la période de croissance des bois, ce qui coïncide avec la période de restriction des ressources alimentaires (Article 5). Nous avons utilisé les bois des chevreuils comme principal caractère sexuel secondaire mais également comme une mesure approximative du niveau de testostérone. Nous avons tout d'abord établi que les caractères sexuels secondaires semblent affecter principalement les composantes cellulaires de l'immunité. En effet, les individus avec les bois les plus grands présentent des concentrations de leucocytes et de neutrophiles inférieures à ceux qui possèdent des bois plus petits. Cette tendance est surtout observée pour les individus de Trois Fontaines. *A contrario*, aucune variation statistiquement significative n'a été observée pour les lymphocytes et la capacité du sérum à lyser les cellules exogènes. Une diminution des gammaglobulines a été trouvée mais uniquement pour les bois en velours.

Les résultats de notre étude supportent l'hypothèse qu'il existerait un compromis entre les caractères sexuels secondaires et certaines composantes de l'immunité et tendent à suggérer un effet immunosuppresseur de la testostérone.

Il serait intéressant de reprendre maintenant l'étude et de se focaliser sur les individus de Trois Fontaines pour les individus qui possèdent des bois durs (c'est-à-dire ceux dont la pousse des bois est finie) car trop peu d'individus ont été capturés à Chizé pour pouvoir tirer des conclusions définitives pour cette catégorie d'individus. Cette analyse permettrait de confirmer ou d'infirmier les tendances déjà observées. Il serait également très intéressant, une fois les tests fonctionnels finalisés, de reprendre l'analyse en étudiant le compromis entre les caractères sexuels secondaires et les composantes fonctionnelles de l'immunité. Cette analyse permettrait de tester, par exemple, l'hypothèse de l'effet seuil, qui stipule que les changements observés dans les niveaux des composantes de l'immunité pourraient ne pas avoir d'effet sur les performances immunitaires (revue dans Adamo 2004).

5. Applications possibles à la gestion des espèces de cervidés

Depuis une trentaine d'années, les populations d'ongulés sauvages en Europe ont connu une forte croissance démographique. Cette modification de densité a eu plusieurs conséquences sur les paramètres fondamentaux des populations d'ongulés ; parmi elles, le régime alimentaire, les interactions avec l'Homme et les dégâts aux cultures mais également les risques sanitaires. En effet, les fortes densités ont pour conséquences l'augmentation de la vitesse de transmission, de la durée de persistance des pathogènes et une diminution de la résistance des individus (Gortazar et al. 2006). Dans ce contexte, l'utilisation d'outils et d'indicateurs adaptés doivent refléter ces changements. Un indicateur écologique doit être utilisé pour prédire des signes avant-coureurs de changements écologiques qui peuvent être

anticipés par une action de gestion (Dale et Beyeler 2001). D'après les auteurs, cet indicateur doit être facile à mesurer et sensible aux contraintes du système. Pour pouvoir proposer des indicateurs de changement écologique basés sur la relation hôtes-pathogènes, il faut d'abord comprendre les relations entre les parasites et la dynamique des populations. Ainsi, le déroulement de cette thèse était décliné à l'origine en plusieurs points : (i) finaliser la mise au point d'indicateurs de la condition physique et de l'immunocompétence, (ii) mieux comprendre les interdépendances entre condition physique, immunocompétence et parasitisme, avec (iia) les liens entre compétence immunitaire et condition physique, (iib) lien condition physique et parasitisme, et (iic) les régulations entre les différentes voies de l'immunité.

Nous avons vu que des indicateurs de la condition physique par des mesures hématologiques pouvaient refléter l'état parasitaire pour des espèces de macroparasites.

Pour les mesures de l'immunocompétence, il est difficile d'envisager des mesures de marquage leucocytaire et prolifération lymphocytaire comme indicateur de changement écologique. Ces mesures sont coûteuses à la fois en de temps et en argent d'une part, et il serait nécessaire de les valider, comme décrit plus haut dans la thèse, d'autre part. En revanche, le test d'hémagglutination-hémolyse et la numération formule (y compris le nombre de leucocytes total) pourraient être utilisés comme indicateurs de changements écologique. En effet, il a été montré que le test H AHL pouvait être relié à la valeur sélective de l'hôte (Rossi et al. 2013) et pourrait constituer une bonne approximation de l'évolution des maladies. Les leucocytes pourraient également être utilisés comme un indicateur de la condition physique (Yochem et al. 2008). En supposant que les performances baissent lorsque la densité augmente, il est possible de s'attendre à une diminution de l'immunité lorsque la densité augmente. Cependant, des études ont montré que cette relation ne permet qu'un suivi des

populations au cours du temps et ne permet pas de comparer des populations de densité différentes (Møller et al. 2006).

6. Perspectives

Le travail réalisé au cours de cette thèse montre l'intérêt d'étudier l'immunocompétence par un ensemble de mesures, à la fois descriptives et fonctionnelles dans un contexte d'éco-immunologie. Plus précisément, dans notre cas, les connaissances solides en dynamique de populations chez les chevreuils de Trois Fontaines et Chizé, permettent maintenant de considérer des enjeux à l'échelle populationnelle. Mais avant cela, plusieurs aspects nécessiteraient d'être approfondis.

6.1. Perspectives méthodologiques

Les tests utilisés jusqu'ici dans un cadre expérimental ne sont pas tous adaptés à devenir des tests de routine, ni même des tests utilisables pour le suivi à long terme des populations. Si le test d'hémagglutination-hémolyse nécessite peu de moyens, la cross-réactivité des anticorps monoclonaux avec les sous-populations de leucocytes et surtout la prolifération lymphocytaire nécessitent des compétences techniques mais ont également un coût élevé en temps (déplacements, manipulations, accès à du matériel spécifique), et financier (moyens humains, matériels, ...). Ces derniers tests ne seront probablement pas utilisables dans la suite du suivi des populations, faute de ces moyens.

Compte-tenu du fait que l'éco-immunologie est en plein développement, de nombreuses pistes d'amélioration se dessinent pour disposer d'outils plus performants. Il serait donc intéressant d'envisager d'autres pistes, permettant de mener à un résultat similaire sans pour autant engendrer les forts coûts décrits ci-dessus, comme par exemple l'activité de

phagocytose sur directement à partir de sang total. En partenariat avec le Pr Stéphane Bétouille du laboratoire Interactions Animal-Environnement de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, un essai de faisabilité a été réalisé et a permis, à partir d'un prélèvement (4 ml de sang total hépariné) d'effectuer la distribution leucocytaire, de mesurer une activité de phagocytose à l'aide de billes de latex fluorescentes (Annexe 7), mais également l'activité mitochondriale, l'activité oxydative et la mortalité cellulaire. Ces résultats encourageants permettent d'ouvrir une seconde voie vers la caractérisation de l'immunocompétence dans les populations sauvages. Ainsi, s'il est possible de mettre les moyens nécessaires pour que ces tests soient utilisés en routine pour caractériser l'ensemble de l'immunocompétence ou de finaliser la mise en place de tests plus simples et moins onéreux, cela permettra d'aborder sereinement la prochaine étape, c'est-à-dire le lien entre immunité et performances démographiques des populations.

Il est également essentiel de développer au moins un test pour l'ensemble des quadrants. Pour cela, par exemple, nous proposons de compléter les informations concernant l'immunité innée en mesurant la capacité du plasma à tuer les bactéries (Tielemann et al. 2005 ; Schneeberger et al. 2014) c'est-à-dire mesurer la concentration en lysozymes responsable de la digestion enzymatique des structures cellulaires des agents pathogènes. L'exploration des différentes méthodes descriptives et fonctionnelles pour caractériser l'ensemble des différentes composantes de l'immunité permettra par la suite de cibler les méthodes dans un souci de compromis coût/pertinence.

6.2. Lien entre physiologie et immunité

Pour poursuivre l'étude sur le lien entre les caractères sexuels secondaires et l'immunité, une étape essentielle serait de mesurer la concentration de testostérone chez les chevreuils mâles. Plusieurs méthodes sont envisageables pour mesurer la testostérone chez les chevreuils, à

l'aide du plasma (Malo et al. 2009), des fèces (Ezenwa et al. 2012). Le plasma est disponible pour l'ensemble des individus déjà capturés depuis le début de la thèse, cela permettrait d'utiliser l'ensemble des données déjà récoltées. La mesure de la testostérone permettrait de relier les variations de celle-ci aux caractères sexuels secondaires d'une part, mais également de mettre en lien ces mesures avec des mesures fonctionnelles de l'immunité, comme par exemple l'activité phagocytaire (Gil et Culver 2011).

Plus largement, il serait intéressant de doser d'autres hormones, comme les oestrogènes chez les femelles et les mâles, qui pourraient être impliquées dans la régulation des caractères sexuels secondaires (Price et Allen 2004).

Enfin, une question majeure serait de comprendre l'influence du stress sur l'immunocompétence, à la fois le stress aigu de capture et le stress chronique engendré par les conditions environnementales. Il faut pour cela mesurer le niveau de corticostéroïdes, avec là aussi différentes sources possibles, comme le sang, les fèces ou les poils (Creel et al. 2009 ; Gil et Culver 2011 ; Ezenwa et al. 2012). Nous avons évoqué plus haut les effets du stress sur les différents indicateurs. De nombreuses études ont montré que le stress était associé à une réduction des niveaux des composantes de l'immunité principalement due à l'augmentation des niveaux de corticostéroïdes plasmatique (Sapolsky 1992). Par exemple, il a été montré qu'un stress chronique pouvait réduire les niveaux d'éosinophiles (Rothenberg et Hogan (2006). Chez les rongeurs, Martin (2009) a montré que l'effet du stress pouvait dépendre de la durée ; à court-terme, il y aurait un renforcement de l'immunité alors qu'à long-terme le stress aurait un effet immunosuppresseur. Plus précisément, les organismes qui subissent un stress à long-terme investiraient dans l'immunité non spécifique. Ces arguments s'ajoutent donc à ceux énoncés plus haut de l'importance d'une mesure de stress.

Cette mesure des corticostéroïdes permettrait également de compléter les informations pour l'étude du compromis entre les caractères sexuels secondaires et les différentes composantes de l'immunité.

6.3. Dimorphisme sexuel de l'immunité

Sachant qu'il a été reconnu que les mâles et les femelles diffèrent dans leurs prévalences et leurs intensités parasitaires, avec des mâles plus parasités que les femelles, notamment chez les mammifères, il serait intéressant d'explorer et tester les hypothèses sous-jacentes, telles que l'hypothèse du handicap d'immunocompétence (Folstad et Karter 1992) ou encore l'hypothèse du principe de Bateman dans le cadre de l'immunité (Rolf 2002) qui suggère que la différence observée dans l'immunité entre mâles et femelles résulte de leurs trajectoires d'histoire de vie différentes. Pour cela, il faudrait tester un effet sexe sur les différentes composantes de l'immunité, en ne prenant en compte que les individus adultes (du fait principalement de la mise en place de l'immunité chez les jeunes), matures sexuellement.

6.4. Lien avec la reproduction et la survie

Enfin, et pour revenir aux propos de l'introduction générale, en exploitant les ressources de l'hôte, les parasites vont causer des dommages qui, *in fine*, impactent la valeur sélective de l'hôte. Ainsi, à l'image d'autres études notamment sur les oiseaux, il serait intéressant de relier ces variations dans l'immunocompétence à la survie ou la reproduction. Très peu d'études sont disponibles sur ce sujet à ce jour. Par exemple, Graham et al. (2010) ont mis en relation les concentrations des anticorps antinucléaires avec une réduction de la reproduction mais parallèlement à une augmentation de la survie durant les hivers rudes. Très récemment, Schneeberger et al. (2014) ont montré que les individus avec un nombre de leucocytes ou une concentration d'IgG plus élevés que la moyenne présentaient une plus faible probabilité de survie sur les six prochains mois chez une espèce de chauves-souris insectivore, *Saccopteryx*

bilineata. Cette étude relie donc les composantes de l'immunité à la survie dans des populations sauvages. Les informations disponibles sur les deux populations de chevreuils devraient permettre dans un avenir proche de tester le lien avec ces paramètres, lorsqu'un nombre suffisant d'individus testés sera réobservé les années suivantes pour la survie et le succès reproducteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamo SA. 2004 How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour* **68**, 1443-1449.
- Allander K. 1997 Reproductive investment and parasite susceptibility in the Great Tit. *Functional Ecology* **11**, 358-364.
- Andersen R, Duncan P, Linnell JDC. 1998 The European roe deer: the biology of success. Scandinavian. University Press, Oslo, Norway.
- Andersen R, Gaillard JM, Linnell JCD, Duncan P. 2000 Factors affecting maternal care in a income breeder, the European roe deer. *Journal of Animal Ecology* **69**, 672-682.
- Andersson M, Iwasa Y. 1996 Sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 53-58.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. 2009 Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Reviews of Immunology* **27**, 669-692.
- Baermann G, 1917 Eine einfache Methode zur Auffindung vor Ankylostomum (Nematoden). In: Larven in Erdproben. Meded. Geneesk Laborat. Weltever Feestbundel, pp. 41.
- Baker RL, Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Audho JO, Thorpe W. 2003 Resistance and resilience to gastro-intestinal nematode parasites and relationships with productivity of Red Maasai, Droper and Red Maasai x Dorper crossbred lambs in the sub-humid tropics. *Journal of Animal Science* **76**, 119-136.
- Bartoš L, Bubenik GA, Kuzmova E. 2012 Endocrine relationships between rank - related behavior and antler growth in deer. *Frontiers in Biosciences* **4**, 1111-1126.
- Bateman AJ. 1948 Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**, 349-368.
- Beldomenico PM, Begon M. 2010 Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends in Ecology and Evolution* **25**, 21-27.
- Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008a The dynamics of health in wild field vole populations: a haematological perspective. *Journal of Animal Ecology* **77**, 984-997.
- Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008b Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proceedings of the Royal Society B* **275**, 1753-1759.
- Birchard GF. 1997 Optimal hematocrit: theory, regulation and implications. *American Zoologist* **37**, 65-72.
- Blasco MA. 2002 Immunosenescence phenotypes in the telomerase knockout mouse. *Seminars in Immunopathology* **24**, 75-85.

- Body G, Ferté H, Gaillard JM, Delorme D, Klein F, Gilot-Fromont E. 2011 Population density and phenotypic attributes influence the level of nematode parasitism in roe deer. *Oecologia* **167**, 635-646.
- Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. 1998 A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *The Journal of Experimental Medicine* **188**, 2381-2386.
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, Haussy C, Chastel O, Faivre B, Sorci G. 2003 Assessing the cost of mounting an immune response. *The American Naturalist* **161**, 367-379.
- Bourgeon S, Kauffmann M, Geiger S, Raclot T, Robin JP. 2010 Relationships between metabolic status, corticosterone secretion and maintenance of innate and adaptive humoral immunities in fasted re-fed mallards. *Journal of Experimental Biology* **213**, 3810-3818.
- Bouwhuis S, Charmantier A, Verhulst S, Sheldon BC. 2010 Individual variation in rates of senescence: natal origin effects and disposable soma in a wild bird population. *Journal of Animal Ecology* **79**, 1251-1261.
- Bowers EK, Hodges CJ, Forsman AM, Vogel LA, Masters BS, Johnson BGP, Thompson CF, Sakaluk S. 2014 Neonatal body condition, immune responsiveness, and hematocrit predict longevity in a wild bird population. *Ecology* (doi.org/10.1890/14-0418.1)
- Braude S, Tang-Martinez Z, Taylor GT. 1999 Stress, testosterone, and the immunoredistribution hypothesis. *Behavioral Ecology* **10**, 345-350.
- Brommer JE. 2004 Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proceedings of the Royal Society London B* **271**, S110-S113.
- Buchan GS, Griffin JF. 1990 Identification of heterologous monoclonal antibodies that cross-react with cervine leukocyte subpopulations. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **24**, 247-257.
- Buchanan KL, Evans MR, Goldsmith AR. 2003 Testosterone, dominance signaling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **55**, 50-59.
- Buehler DM, Tieleman BI, Piersma T. 2009 Age and environment affect constitutive immune function in Red Kongs (*Calidris canutus*). *Journal of Ornithology* **150**, 815-825.
- Burnham KP, Anderson DR. 2002 Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2nd edn. Springer-Verlag, New York.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997 Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology* **83**, 575-583.

- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'mahony D, Lord JM. 2001 Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *Journal of Leukocyte Biology* **70**, 881-886.
- Casto JM, Nolan VJr, Ketterson ED. 2001 Steroid hormones and immune function: experimental studies in wild and captive dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *The American Naturalist* **157**, 408-420.
- Chandra RK. 1997 Nutrition and the immune system: an introduction. *The American Journal of Clinical Nutrition* **66**, 460S-463S.
- Chandra RK. 1999 Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proceedings of the Nutrition Society* **58**, 681-683.
- Chiejina SN, Behnke JM, Musongong GA, Nnadi PA, Ngongeh LA. 2010 Resistance and resilience of West African dwarf goats of the Nigerian savanna zone exposed to experimental escalating primary and challenge infections with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* **171**, 81-90.
- Clayton DH, Moore J. 1997 Host-parasite evolution. General principles and avian models. Oxford University Press, New York.
- Coop RL, Holmes PH. 1996 Nutrition and parasite interaction. *International Journal of Parasitology* **26**, 951-962.
- Corrigan W, Coutts AG, Watt CF, Hunter AR, Munro R. 1982 Experimental infections with *Dictyocaulus viviparus* in vaccinated and unvaccinated red deer. *Veterinary Record* **111**, 179-184.
- Costa FJV, Macedo RH. 2005 Coccidian oocyst parasitism in the blue-black grassquit: influence on secondary sex ornaments and body condition. *Animal Behavior* **70**, 1401-1409.
- Creel S, Winnie JA, Christianson D. 2009 Glucocorticoid stress hormones and the effect of predation risk on elk reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**, 12388-12393.
- Cross ML, Chinn ND, Griffin JF, Buchan GS. 1996 T cell responses to *Mycobacterium bovis* in red deer, a large animal model for tuberculosis. *Immunology and Cell Biology* **74**, 32-37.
- Dale VH, Beyeler SC. 2001 Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecological Indicators* **1**, 3-10.
- Darwin CR. 1871 The descent of man and selection in relation to sex. John Murray, London, UK.

- Davis AK, Maney DL, Maerz JC. 2008 The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* **22**, 760-772.
- Davis WC, Naessens J, Brown WC, Ellis JA, Hamilton MJ, Cantor GH, Barbosa JIR, Ferens W, Bohach GA. 1996 Analysis of monoclonal antibodies reactive with molecules upregulated or expressed only on activated lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **52**, 301-311.
- De Jager CPC, Van Wijk PTL, Mathoera RB, de Jongh-Leuvenink J, Van Der Poll T, Wever PC. 2010 Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Critical Care* **14**, R192.
- Del Giudice GD, Mech LD, Kunkel KE, Gese EM, Seal US. 1992 Seasonal patterns of weight, hematology, and serum characteristics of free-ranging female white-tailed deer in Minnesota. *Canadian Journal of Zoology* **70**, 974-983.
- Demas GE, Nelson RJ. 2011 *Ecoimmunology*. Oxford University Press, New York.
- Douhard M, Plard F, Gaillard JM, Capron G, Delorme D, Klein F, Duncan P, Loe LE, Bonenfant C. 2014. Fitness consequences of environmental conditions at different life stages in a long-lived vertebrate. *Proceedings of The Royal Society London B* **241**, 20140276.
- Duckworth RA, Mendonca MT, Hill GE. 2001 A condition dependent link between testosterone and disease resistance in the house finch. *Proceedings of the Royal Society London B* **268**, 2467-2472.
- Eisenstaedt R, Penninx BWJH, Woodman RC. 2006 Anemia in the elderly: current understanding and emerging concepts. *Blood Reviews* **20**, 213-226.
- Elenkov IJ. 2006 Glucocorticoids and the Th1/th2 balance. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1024**, 138-146.
- Ezenwa VO. 2004 Selective defecation and selective foraging: antiparasite behavior in wild ungulates? *Ethology* **110**, 851-862.
- Ezenwa VO, Ekemas LS, Creel S. 2012 Unravelling complex associations between testosterone and parasite infection in the wild. *Functional Ecology* **26**, 123-133.
- Ezenwa VO, Etienne RS, Luikart G, Beja-Pereira A, Jolles A. 2010 Hidden consequences of living in a wormy world: nematode-induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. *The American Naturalist* **176**, 613-624.
- Faivre B, Pr eault M, Salvador F, Th ery M, Gaillard M, C ezilly F. 2003 Bill colour and immunocompetence in the European blackbird. *Animal Behaviour* **65**, 1125-1131.

- Fenton A, Lamb T, Graham AL. 2008. Optimality analysis of Th1/Th2 immune responses during microparasite-macroparasite co-infection, with epidemiological feedbacks. *Parasitology* **135**, 841-853.
- Festa-Bianchet M, Gaillard JM, Côté SD. 2003 Variable age structure and apparent density dependence in survival of adult ungulates. *Journal of Animal Ecology* **72**, 640-649.
- Folstad I, Karter J. 1992 Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist* **139**, 603-622.
- Forbes, M. 2007 On sex differences in optimal immunity. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 111-113.
- Gaillard JM, Delorme D, Boutin JM, Van Laere G, Boisaubert B, Pradel R. 1993 Roe deer survival patterns : a comparative analysis of contrasting populations. *Journal of Animal Ecology* **62**, 778-791.
- Gaillard JM, Loison A, Festa-Bianchet M, Yoccoz NG, Solberg E. 2003 Ecological correlates of life span in populations of large herbivorous mammals. *Population and Development Review* **29**, 39-56.
- Gaillard JM, Sempéré AJ, Boutin JM, Van Laere G, Boisaubert B. 1992 Effects of age and body weight on the proportion of females breeding in a population of roe deer (*Capreolus capreolus*). *Canadian Journal of Zoology* **70**, 1541-1545.
- Gaillard JM, Viallefont A, Loison A, Bianchet MF. 2004 Assessing senescence patterns in populations of large mammals. *Animal Biodiversity and Conservation* **1**, 47-58.
- Garratt M, Stockley P, Armstrong SD, Beynon RJ, Hurst JL. 2011 The scent of senescence: sexual signalling and female preference in house mice. *Journal of Evolutionary Biology* **24**, 2398-2409.
- Gil D, Culver R. 2011 Male ornament size in a passerine predicts the inhibitory effect of testosterone on macrophage phagocytosis. *Functional Ecology* **25**, 1278-1283.
- Gilot-Fromont E, Jégo M, Bonenfant C, Gibert P, Rannou B, Klein F, Gaillard JM. 2012 Immune phenotype and body condition in roe deer: individuals with high body condition have different, not stronger immunity. *PloS ONE* **7**, e45576.
- Gonzalez G, Sorci G, Møller AP, Ninni P, Haussy C, De Lope F. 1999 Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Animal Ecology* **68**, 1225-1234.
- Gordon S, Taylor PR. 2005 Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* **5**, 953-964.

- Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J. 2006 Disease risks and overabundance of game species *European Journal of Wildlife Research* **52**, 81-87.
- Graham MH. 2003 Confronting multicollinearity in ecological multiple regression. *Ecology*, **84**, 2809-2815.
- Graham AL, Allen JE, Read AF. 2005 Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **36**, 373-397.
- Graham AL, Hayward AD, Watt KA, Pilkington JG, Pemberton JM, Nussey DH. 2010. Fitness correlates of heritable variation in antibody responsiveness in a wild mammal. *Science* **330**, 662-665.
- Grasman KA. 2002 Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 34-42.
- Greives TJ, Mcglathlin JW, Jawor JM, Demas GE, Ketterson ED. 2006 Testosterone and innate immune function inversely covary in a wild population of breeding dark-eyed Juncos (*Junco hyemalis*). *Functional Ecology* **20**, 812-818.
- Grenfell BT, Gulland FMD. 1995 Introduction: ecological impact of parasitism on wildlife host populations. *Parasitology* **111**, S3-S14.
- Grossman CJ. 1985 Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* **227**, 257-261.
- Hakkarainen H, Huhta E, Koskela E, Mappes T, Soveri T, Suorsa P. 2007 Eimeria-parasites are associated with a lowered mother's and offspring's body condition in island and mainland populations of the bank vole. *Parasitology* **134**, 23-31.
- Hamel S, Côté SD, Gaillard JM, Festa-Bianchet M. 2009 Individual variation in reproductive costs of reproduction: high-quality females always do better. *Journal of Animal Ecology* **78**, 143-151.
- Hamilton WD, Zuk M. 1982 Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* **218**, 384-387.
- Hanssen SA, Hasselquist D, Folstad I, Erikstad KE. 2004 Costs of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proceedings of the Royal Society London B* **271**, 925-930.
- Harthill M. 2011 Review: micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases. *Biological Trace Element Research* **143**, 1325-1336.
- Hasselquist D, Marsh JA, Sherman PW, Wingfield JC. 1999 Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **45**, 167-175.

- Hausmann MF, Winkler DW, Huntington CE, Vleck D, Sanneman CE, Hanley D, Vleck CM. 2005 Cell-mediated immunosenescence in birds. *Oecologia* **145**, 270-275.
- Hawley DM, Altizer SM. 2011 Disease ecology meets ecological immunology: understanding the links between organismal immunity and infection dynamics in natural populations *Functional Ecology* **25**, 48-60.
- Hewison AJM, Gaillard JM. 2001 Phenotypic quality and senescence affect different components of reproductive output in roe deer. *Journal of Animal Ecology* **70**, 600-608.
- Hindle AG, Lawler JM, Campbell KL, Horning M. 2009 Muscle senescence in short-lived wild mammals, the soricine shrews *Blarina brevicauda* and *Sorex palustris*. *Journal of Experimental Zoology* **311**, 358-367.
- Hindle AG, Lawler JM, Campbell KL, Horning M. 2010. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology* **155**, 427-434.
- Hoffmann PR, Berry MJ. 2008. The influence of selenium on immune responses. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**, 1273-80.
- Holmstad PR, Hudson PJ, Skorpning A. 2005 The influence of a parasite community on the dynamics of a host population: a longitudinal study on willow ptarmigan and their parasites. *Oikos* **111**, 377-391.
- Hõrak P, Saks L, Ots, Kullisaar T, Kollist H, Zilmer M. 2003 Physiological effects of immune challenge in captive greenfinches (*Carduelis chloris*). *Canadian Journal of Zoology* **81**, 371-379.
- Horrocks NPC, Matson KD, Tieleman BI. 2011 Pathogen pressure puts immune defense into perspective. *Integrative and Comparative Biology* **51**, 563-576.
- Hurlbert SH. 1984 Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* **54**, 187-211.
- Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D. 2000 Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society London B* **267**, 665-670.
- Irvine RJ, Corbishley H, Pilkington JG, Albon SD. 2006 Low-level parasitic worm burdens may reduce body condition in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology* **133**, 465-475.
- Jolles AE, Ezenwa VO, Rampal S, Etienne RS, Turner WC, Olf H. 2008. Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging african buffalo. *Ecology* **89**, 2239-2250.

- Kawasaki N, Brassil CE, Brooks RC, Bonduriansky R. 2008 Environmental effects on the expression of life span and aging: an extreme contrast between wild and captive cohorts of *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *The American Naturalist* **172**, 346-357.
- Keil D, Luebke R, Pruett S. 2001 Quantifying the relationship between multiple immunological parameters and host resistance: probing the limits of reductionism. *Journal of Immunology* **167**, 4543-4552.
- Klasing KC. 1998 Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science* **77**, 1119-1125.
- Klasing KC. 2004 The costs of immunity. *Acta Zoologica Sinica* **50**, 961-969.
- Kojola I, Helle T, Huhta E, Niva A. 1998. Foraging conditions, tooth wear and herbivore body reserves: a study of female reindeer. *Oecologia* **117**, 26-30.
- Kotiaho JS. 2001 Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biological Reviews* **76**, 365-376.
- Kram I, Cirule D, Krama T, Vrublevska J. 2011 Extremely low ambient temperature affects haematological parameters and body condition in wintering Great Tits (*Parus major*). *Journal of Ornithology* **152**, 889-895.
- Ksiazek A, Konarzewski M. 2012 Effect of dietary restriction on immune response of laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate. *Physiology and Biochemical Zoology* **85**, 51-61.
- Lecointre G, Le Guyader H. 2006 Classification phylogénétique du vivant. Third edition. Belin Science.
- Lee KA. 2006 Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integrative and Comparative Biology* **46**, 1000–1015.
- Lello J, Boag B, Hudson PJ. 2005 The effect of single and concomitant pathogen infections on condition and fecundity of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *International Journal of Parasitology* **35**, 1509-1515.
- Lemaître JF, Gaillard JM. 2013 Male survival patterns do not depend on male allocation to sexual competition in large herbivores. *Behavioral Ecology* **24**, 421-428.
- Lemaître JF, Gaillard JM, Lackey LB, Clauss M, Müller DWH. 2013 Comparing free-ranging and captive populations reveals intra-specific variation in aging rates in large herbivores. *Experimental Gerontology* **48**, 162-167.
- Leshchinsky TV, Klasing KC. 2001 Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 629-638.

- Li PL, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. 2007 Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition* **98**, 237-252.
- Lindström KM, Krakower D, Lundström JO, Silverin B. 2001 The effects of testosterone on a viral infection in greenfinches (*Carduelis chloris*): an experimental test of the immunocompetence-handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society London B* **268**, 2007-2011.
- Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000 Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**, 87-98.
- Loison A, Festa-Bianchet M, Gaillard, JM, Jorgenson J, Jullien JM. 1999 Age-specific survival in five populations of ungulates: evidence of senescence. *Ecology* **80**, 2539-2554.
- López-Olvera JR, Marco I, Montané J, Lavín S. 2006 Haematological and serum biochemical values of southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*). *Veterinary Record* **158**, 479-484.
- Lorenz K. 2007 Evolution et modification du comportement : l'inné et l'acquis. (ed. Payot).
- Maklakov A, Lummaa V. 2013 Evolution of sex differences in lifespan and aging: causes and constraints. *Bioessays* **35**, 717-724.
- Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. 2006. Immunology, seventh edition. (ed. Mosby).
- Mallon EB, Brockmann A, Schmid-Hempel P. 2003 Immune response inhibits associative learning in insects. *Proceedings of the Royal Society London B* **270**, 2471-2473.
- Malo AF, Roldan ERS, Garde JJ, Soler AJ, Vicente J, Gortazar C, Gomendio M. 2009 What does testosterone do for red deer males ? *Proceedings of the Royal Society London B* **276**, 971-980.
- Martin LB. 2009 Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *General and Comparative Endocrinology* **163**, 70-76.
- Martin LB II, Hasselquist D, Wikelski M. 2006a Investment in immune defense is linked to pace of life in house sparrows. *Oecologia* **147**, 565-575.
- Martin LB, Hawley DM, Ardia DR. 2011 An introduction to ecological immunology. *Functional Ecology* **25**, 1-4.
- Martin TE, Møller AP, Merino S, Clobert J. 2001 Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2071-2076.
- Martin LB, Navara KJ, Weil ZM, Nelson RJ. 2007 Immunological memory is compromised by food restriction in deer mice *Peromyscus maniculatus*. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **292**, 316-220.

- Martin LB II, Weil ZM, Nelson RJ. 2006b Refining approaches and diversifying directions in ecoimmunology. *Integrative and Comparative Biology* **46**, 1030-1039.
- Masello JF, Choconi RG, Helmer M, Kremberg T, Lubjuhn T, Quillfeldt P. 2009 Do leucocytes reflect condition in nestling burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus* in the wild? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **152**, 176-181.
- Matson KD, Ricklefs RE, Klasing KC. 2005 A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**, 275-286.
- Mauck RA, Matson KD, Philipsborn J, Ricklefs RE. 2005 Increase in the constitutive innate humoral immune system in Leach’s Storm-Petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) chicks is negatively correlated with growth rate. *Functional Ecology* **19**, 1001-1007.
- McArdle A, Vasilaki A, Jackson M. 2002. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews* **1**, 79-93.
- McDade TW. 2003 Life history theory and the immune system: Steps toward a human ecological immunology. *American Journal of Physical Anthropology* **122**, 100-125.
- McEwan EH, Whitehead PE. 1969 Changes in the blood constituents of reindeer and caribou occurring with age. *Canadian Journal of Zoology* **46**, 1031-1036.
- Milner JM, Stien A, Irvine J, Albon SD, Langvatn R, Ropstad E. 2003 Body condition in Svalbard reindeer and the use of blood parameters as indicators of condition and fitness. *Canadian Journal of Zoology* **81**, 1566-1577.
- Møller AP, Haussy C. 2007 Fitness consequences of variation in natural antibodies and complement in the Barn Swallow *Hirundo rustica*. *Functional Ecology* **21**, 363-371.
- Møller AP, Martín-Vivaldi M, Merino, Soler JJ. 2006 Density-dependent and geographical variation in bird immune response *Oikos* **115**, 463-474.
- Møller AP, Petrie M. 2002 Condition dependence, multiple sexual signals, and immunocompetence in peacocks. *Behavioral Ecology* **13**, 248-253.
- Monaghan P, Charmantier A, Nussey DH, Ricklefs RE. 2008 The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology* **22**, 371-378.
- Moore SL, Wilson K. 2002 Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science* **297**, 2015-2018.
- Moreno J, Sanz JJ, Arriero E. 1999 Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society London B* **266**, 1105-1109.

- Moret Y, Schmid-Hempel P. 2000 Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**, 1166.
- Mougeot F, Redpath SM, Pieltney SB. 2006 Elevated spring testosterone increases parasite intensity in male red grouse. *Behavioral Ecology* **17**, 117-125.
- Nadolski J, Swarska J, Kalinski A, Banbura M, Sniegula R, Banbura J. 2006 Blood parameters as consistent predictors of nestling performance in great tits (*Parus major*) in the wild. *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology* **143**, 50-54.
- Nakagawa S, Schielzeth H. 2010 Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data,: a practical guide for biologists. *Biological Reviews* **85**, 935-956.
- Nelson RJ, Demas GE. 1996 Seasonal changes in immune function. *The Quarterly Review of Biology* **71**, 511-548.
- Newey S, Shaw DJ, Kirby A, Montieth P, Hudson PJ, Thirgood SJ. 2005 Prevalence, intensity and aggregation of intestinal parasites in mountain hares and their potential impact on population dynamics. *International Journal of Parasitology* **35**, 367-373.
- Nilsen EB, Gaillard JM, Andersen R, Odden J, Delorme D, van Laere G, Linnell JD. 2009 A slow life in hell or a fast life in heaven: demographic analyses of contrasting populations. *Journal of Animal Ecology* **78**, 585-594.
- Nilsson JA. 2002 Metabolic consequences of hard work. *Proceedings of the Royal Society London B* **269**, 1735-1739.
- Nilsson-Ehle H, Jagenburg R, Landahl S, Svanborg A. 2000. Blood haemoglobin declines in the elderly: implications for reference intervals from age 70 to 88. *European Journal of Haematology* **65**, 297-305.
- Nordling D, Andersson M, Zohari S, Lars G. 1998 Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society London B* **265**, 1291-1298.
- Norris K, Anwar M, Read AF. 1994 Reproductive Effort Influences the Prevalence of Haematozoan Parasites in Great Tits. *The Journal of Animal Ecology* **63**, 601-610.
- Norris K, Evans MR. 2000 Ecological immunology Life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* **11**, 19-26.
- Nussey DH, Coulson T, Delorme D, Clutton-Brock TH, Pemberton JM, Festa-Bianchet M, Gaillard JM. 2011 Patterns of body mass senescence and selective disappearance differ among three species of free-living ungulates. *Ecology* **92**, 1936-1947.

- Nussey DH, Froy H, Lemaître JF, Gaillard JM, Austad SN. 2013 Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for bio-gerontology. *Ageing Research Reviews* **12**, 214-225.
- Nussey DH, Kruuk LEB, Morris A, Clutton-Brock TH. 2007 Environmental conditions in early life influence ageing rates in a wild population of red deer. *Current Ecology* **17**, R1000-R1001.
- Nussey DH, Watt K, Pilkington JG, Zamoyska R, McNeilly TN. 2012 Age-related variation in immunity in a wild mammal population. *Ageing Cell* **11**, 178-180.
- Ochsenbein AF, Zinkernagel RM. 2000 Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunological Today* **21**, 624-630.
- Olden JD, Jackson DA. 2000 Torturing data for the sake of generality: how valid are our regression models? *Ecoscience* **7**, 501-510.
- Oleg E, Herb S. 2011 Essential immunology for Surgeons. Oxford University Press.
- Ots I, Murumagi A, Horak P. 1998 Haematological health state indices of reproducing great tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* **12**, 700-707.
- Owen JP, Nelson AC, Clayton DH. 2010 Ecological immunology of bird-ectoparasite systems. *Trends in Parasitology* **26**, 530-539.
- Owen-Ashley NT, Hasselquist D, Wingfield JC. 2004 Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: unravelling direct and indirect pathways of song sparrows. *The American Naturalist* **164**, 490-505.
- Parkins JJ, Holmes PH. 1989 Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition. *Nutrition Research Reviews* **2**, 227-246.
- Pawelec G, Effros RB, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R. 1999 T cells and aging. *Frontiers in Bioscience* **4**, 216-269.
- Paz Nava M, Veiga JP, Puerta M. 2001 White blood cell counts in house sparrows (*Passer domesticus*) before and after moult and after testosterone treatment. *Canadian Journal of Zoology* **79**, 145-148.
- Peters A. 2000 Testosterone treatment is immunosuppressive in superb fairy-wrens, yet free-living males with high testosterone are more immunocompetence. *Proceedings of the Royal Society London B* **267**, 883-889.
- Pettorelli N, Gaillard JM, Mysterud A, Duncan P, Stenseth NC, Delorme D, Van Laere G, Toïgo C, Klein F. 2006 Using a proxy of plant productivity (NDVI) to find key periods for animal performance: the case of roe deer. *Oikos* **112**, 565-572.

- Plard F, Gaillard JM, Coulson T, Hewison AJM, Delorme D, Warnant C, Bonenfant C. 2014 Mismatch between birth date and vegetation phenology slows the demography of roe deer. *PLoS Biology* **12**, e1001828.
- Prasad AS. 2000 Effects of Zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *The Journal of Infectious Diseases* **182**, S62-S68.
- Price J, Allen S. 2004 Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* **359**, 809-822.
- R Core Team. 2009 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- R Core Team. 2013 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Råberg L, Nilsson JA, Ilmonen P, Stjernman M, Hasselquist D. 2000 The cost of an immune response : vaccination reduces parental effort. *Ecology Letters* **3**, 382-386.
- Rafaj RB, Tončić J, Vicković I, Šoštarić B. 2011 Haematological and biochemical values of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Veterinarski Arhiv* **81**, 513-523.
- Rahman M, Lecchi C, Fraquell C, Sartorelli P, Ceciliani F. 2010 Acute phase protein response in Alpine ibex with sarcoptic mange. *Veterinary Parasitology* **168**, 293-298.
- Raynaud JP. 1970 Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, caprins, équins et porcins. *Annals of Parasitology* **45**, 321-342.
- Roberts ML, Buchanan KL, Evans MR. 2004 Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal Behaviour* **68**, 227-239.
- Robinson M, O'Brien R, Mackintosh C, Griffin F, 2008 Differential immune responses of red Deer (*Cervus elaphus*) following experimental challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology* **15**, 963-969.
- Robinson MW, O'Brien R, Mackintosh CG, Griffin JFT. 2010 Peripheral blood mononuclear cell population changes associated with age and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **136**, 211-218.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 2001 Immunology. London: Mosby-Harcourt Publishers.
- Rolff J. 2002 Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society London B* **269**, 867-872.
- Rolff J, Siva-Jothy MT. 2004 Invertebrate ecological immunology. *Science* **301**, 472-475.

- Ros AF, Grootuis TGG, Apanius V. 1997 The relation among gonadal steroids, immunocompetence, body mass, and behavior in young black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *The American Naturalist* **150**, 201-219.
- Rosef O, Nystøyl HL, Solenes T, Arnemo JM. 2004 Haematological and serum biochemical reference values in free-ranging red deer (*Cervus elaphus atlanticus*). *Rangifer* **24**, 79-85.
- Rossi S, Doucelin A, Le Potier MF, Eraud C, Gilot-Fromont E. 2013 Innate immunity correlates with host fitness in wild boar (*Sus scrofa*) exposed to classical swine fever. *PLoS ONE* **8**, e79706.
- Rothenberg MV, Hogan SP. 2006 The Eosinophil. *Annuals Reviews of immunology* **24**, 147-174.
- Ruiz M, French SS, Demas GE, Martins EP. 2010 Food supplementation and testosterone interact to influence reproductive behavior and immune function in *Sceloporus graciosus*. *Hormones and Behavior* **57**, 134-139.
- Saddiqi HA, Sarwar M, Iqbal Z, Nisa M, Shahzad MA. 2012 Markers/parameters for the evaluation of natural resistance status of small ruminants against gastrointestinal nematodes. *Animal* **6**, 994-1004.
- Saino N, Calza S, Møller AP. 1998 Effects of a dipteran ectoparasite on immune response and growth trade-offs in barn swallow, *Hirundo rustica*, nestlings. *Oikos* **81**, 217-228.
- Sams MG, Lochmiller RL, Qualls CW, Leslie DM. 1998 Sensitivity of condition indices to changing density in a white-tailed deer population. *Journal of Wildlife Diseases* **34**, 110-125.
- Sanchez O, Arnau A, Pareja M, Poch E, Ramírez I, Soley M. 2002 Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress. *Cell Stress Chaperones* **7**, 36-46.
- Sapolsky RM. 1992 Neuroendocrinology of the stress response. *Behavioural endocrinology* (ed. JB Becker). pp 287-324
- Schmid-Hempel P. 2003 Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society London B* **270**, 357-366.
- Schmid-Hempel P, Ebert D. 2003 On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 27-32.
- Schneeberger K, Courtiol A, Czirják GA, Voigt CC. 2014 Immune profile predicts survival and reflects senescence in a small, long-lived mammal, the greater sac-winged bat (*Saccopteryx bilineata*). *PLoS ONE* **9**, e108268.

- Schuler B, Arras M, Keller S, Rettich A, Lundby C, Vogel J, Gassman M. 2010 Optimal hematocrit for maximal exercise performance in acute and chronic erythropoietin-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 419-423.
- Segonds-Pichon A. 2001 L'interaction hôte-parasite chez le chevreuil (*Capreolus capreolus*). Etude éco-épidémiologique entre les nématodes gastrointestinaux et pulmonaires et la condition corporelle de l'hôte dans des populations contrastées. Unpublished PhD thesis, University Lyon 1.
- Shannon CE. 1948 A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* **27**, 379-423, 623-656.
- Sheldon BC, Verhulst S. 1996 Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 317-321.
- Sibilia J. 2007 How to define and to classify inflammatory systematic diseases? *Revue du Rhumatisme* **74**, 714-725.
- Sinclair JA, Lochmiller RL. 2000. The winter immunoenhancement hypothesis: associations among immunity, density, and survival in prairie vole (*Microtus ochrogaster*) populations. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 254-264.
- Slater CH, Schreck CB. 1997 Testosterone alters the immune response of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and Comparative Endocrinology* **89**, 113-119.
- Smith BP. 2008. Large animal internal medicine, fourth edition. (ed. Mosby). pp. 2112.
- Soler JJ, de Neve L, Pérez-Contreras T, Soler M, Sorci G. 2003 Trade-off between immunocompetence and growth in magpies : an experimental study. *Proceedings of the Royal Society London B* **270**, 241-248.
- Star L, Frankena K, Kemp B, Nieuwland MGB, Parmentier HK. 2007 Natural humoral immune competence and survival in layers. *Poultry Science* **86**, 1090-1099.
- Stearns SC. 1992 The evolution of life histories. Oxford University Press.
- Stien A, Irvine RJ, Ropstad E, Halvorsen O, Langvatn R, Albon SD. 2002 The impact of gastrointestinal nematodes on wild reindeer: Experimental and cross-sectional studies. *Journal of Animal Ecology* **71**, 937-945.
- Stjernman M, Råberg L, Nilsson J. 2004 Survival costs of reproduction in the blue tit (*Parus caeruleus*): a role for blood parasites? *Proceedings of the Royal Society London B* **271**, 2387-2394.
- Stockham SL, Scott MA. 2008 Fundamentals of veterinary Clinical Pathology, second edition. (eds. Blackwell Publishing). Ames. IA.

- Svensson E, Råberg, L, Koch C, Hasselquist D. 1998 Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology* **12**, 912-919.
- Tanriverdi F, Silveria FG, MacColl GS, Bouloux PM. 2003 The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *Journal of Endocrinology* **176**, 293-304.
- Tella J, Scheuerlein A, Ricklefs RE. 2002 Is cell-mediated immunity related to the evolution of life history strategies of birds? *Proceedings of the Royal Society London B* **269**, 1059-1066.
- Thai HT, Mentré F, Holford NHG, Veyrat-Follet C, Comets E. 2013 A comparison of bootstrap approaches for estimating uncertainty of parameters in linear mixed-effects models. *Pharmaceutical Statistics* **12**, 129-140.
- Thomas F, Lefèvre T, Raymond M. 2010 Biologie évolutive. De Boeck Université. pp 387-422.
- Thornill R, Gangestad SW. 2006 Facial sexual dimorphism, developmental stability, and susceptibility to disease in men and women. *Evolution and Human Behavior* **27**, 131-144.
- Tielemann BI, Williams JB, Ricklefs RE, Klasing KC. 2005 Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proceedings of the Royal Society London B* **272**, 1715-1720.
- Tizard IR. 2004 Veterinary Immunology. An Introduction, W.B. Saunders.
- Toïgo C, Gaillard JM. 2003 Causes of sex-biased adult survival in ungulates: sexual size dimorphism, mating tactic or environment harshness? *Oikos* **2**, 376-384.
- Toïgo C, Gaillard JM, Van Laere G, Hewison AJM, Morellet N. 2006 How does environmental variation influence body mass, body size, and body condition? Roe deer as a case study. *Ecography* **29**, 301-308.
- Turner WC, Getz WM. 2010 Seasonal and demographic factors influencing gastrointestinal parasitism in ungulates of Etosha National Park. *Journal of Wildlife Diseases* **46**, 1108-1111.
- Turner WC, Versfeld WD, Kilian JW, Getz WM. 2012 Synergistic effects of seasonal rainfall, parasites and demography on fluctuations in springbok body condition. *Journal of Animal Ecology* **81**, 58-69.
- Ursache O, Chevrier L, Blancou JM, Jaouen M. 1980 Valeur des paramètres biochimiques et hématologiques chez le chevreuil (*Capreolus capreolus*). *Revue de Médecine Vétérinaire* **131**, 547-552.

- Valderrábano J, Gomez-Rincón C, Uriarte J. 2006 Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Veterinary Parasitology* **141**, 122-131.
- 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**, 766-773.
- Van der Most PJ, De Jong B, Parmentier HK, Verhulst, S. 2011 Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. *Functional Ecology* **25**, 74-80.
- Vanpé C, Gaillard JM, Kjellander P, Mysterud A, Magnien P, Delorme D, Van Laere G, Klein F, Liberg O, Hewison AJM. 2007 Antler size provides an honest signal of male phenotypic quality in roe deer. *The American Naturalist* **169**, 481-493.
- Vanpé C, Gaillard JM, Morellet N, Kjellander P, Liberg O, Delorme D, Hewison AJM. 2009 Age-specific variation in male breeding success of a territorial ungulate species, the European roe deer. *Journal of Mammalogy* **90**, 661-665.
- Verhulst S, Dieleman SJ, Parmentier HK. 1999 A tradeoff between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **96**, 4478-4481.
- Verhulst S, Riedstra B, Wiersma P. 2004 Brood size and immunity costs in Zebra Finches *Taeniopygia guttata*. *Journal of Avian Biology* **36**, 22-30.
- Viney ME, Riley EM, Buchanan KL. 2005 Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 665-669.
- Vinkler M, Albrecht T. 2011 Handling “immunocompetence” in ecological studies: do we operate with confused terms? *Journal of Avian Biology* **42**, 490-493.
- Waterer G, Wunderink R. Science review: genetic variability in the systemic inflammatory response. *Critical Care* **7**, 308-314.
- Waters WR, Palmer MV, Pesch BA, Olsen SC, Wannemuehler MJ, Whipple DL. 2000 MHC class II-restricted, CD4(+) T-cell proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected white-tailed deer. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **76**, 215-229.
- Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Minio FC, Davis WC. 2006 Antigen-specific proliferation and activation of peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected reindeer. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **111**, 263-277.

- Waters WR, Palmer MV, Whipple DL, Slaughter RE, Jones SL. 2004 Immune responses of White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Journal of Wildlife Diseases* **40**, 66-78.
- Widmer O, Saïd S, Miroir J, Duncan P, Gaillard JM, Klein F. 2004 The effects of hurricane Lothar on habitat use of roe deer. *Forest Ecology and Management* **195**, 237-242.
- Williams GC. 1966 Natural selection, the costs of reproduction and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist* **916**, 687-690.
- Wilson K, Cotter SC. 2013 Host Parasite Interactions and the Evolution of Immune Defense. *Advances in the Study of Behavior*. (eds H. Jane Brockmann, T. J. Roper, M. Naguib & L. Barrett). pp 81-174.
- Wilson S, McCay J, Butterworth L, Munson A, White K. 2001 Correlation of suppressed natural killer cell activity with altered host resistance models in B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **177**, 208-218.
- Woodward B. 1998 Protein, calories, and immune defenses. *Nutrition Reviews* **56**, S84-S92.
- Wu B, Yan SK, Lin ZY, Wang Q, Yang Y, Yang GJ, Shen Z, Zhang W. 2008 Metabonomic study on ageing: NMR-based investigation into rat urinary metabolites and the effect of the total flavone of Epimedium. *Molecular Biosystems* **4**, 855-861.
- Yochem PK, Stewart BS, Mazet JAK, Boyce WM. 2008 Hematologic and serum biochemical profile of the Northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*): variation with age, sex, and season. *Journal of Wildlife Diseases* **44**, 911-921.
- Zahavi A. 1975 Mate selection-a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53**, 205-214.
- Zajitschek F, Brassil CE, Bonduriansky R, Brooks RC. 2009 Sex effects on life span and senescence in the wild when dates of birth and death are unknown. *Ecology* **90**, 1698-1707.
- Zuk M, Stoehr AM. 2002 Immune defense and host life history. *The American Naturalist* **160**, S9-S22.

ANNEXES

Fiche de renseignement capture chevreuil
OFFICE NATIONAL DE LA CHASSE ET DE LA FAUNE SAUVAGE
VETAGRO SUP – UMR LBBE 5558

Mesures du stress:

Dans le sabot:

N° sabot:

Couché: oui non

Agitation (coup de sabot): oui non

Retournement: oui non

Sur la table:

T°:

(en celsius)

rythme cardiaque:

(en battements/min)

Lutte: oui non

Halètement: oui non

Cri: oui non

Lâché:

Titube: oui non

Gratte collier: oui non

Couché: oui non

Cabriole: oui non

Course : oui non

type « bolide »

réfléchie

Tombe: oui non

Aboiement/cri: oui non

Remarques:

.....

.....

*Merci de rayer toutes les
mentions inutiles et d'entourer
la bonne catégorie*

2. Annexe 2. Protocole purification PBMC du sang de chevreuil

Matériel utilisé

Tube falcon 15 ml

Cryotubes

Pipettes Pasteur

Tubes facs

Pipettes 5 ml

Tips 20 µl / 200 µl

DPBS (1X) – EDTA (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – Ethylene Diamine Tetraacetic acid)

RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX (+ 30 ml FBS + 5 ml HEPES (1M) + 0,5 ml

Gentamicine + 5 ml Pen-Strep)

Ficoll (milieu de séparation des lymphocytes ; densité: 1,077 ± 0,001)

FBS (Fetal Bovine Serum) + DMSO (Dimethyl Sulfoxide)

Protocole

Diluer le sang au ½ dans du PBS – EDTA à l'aide d'une pipette de 5 ml dans un tube de 15 ml

Ajouter 1/3 de ficoll du volume total à l'aide d'une pipette Pasteur

Centrifuger 20 min à 2000 rpm sans frein et pente douce (2 – 2)

Récupérer l'anneau de PBMC dans un tube de 15 ml à l'aide d'une pipette de 5 ml

Compléter avec du milieu RPMI jusqu'à 13 ml à l'aide d'une pipette de 5 ml

Centrifuger 5 min à 1200 rpm avec frein et forte pente (9 – 9)

Récupérer le sérum dans un cryotube à l'aide d'une pipette de 5 ml

Reprendre le culot dans 5 ml de RPMI à l'aide d'une pipette de 5 ml

Diluer au 1/10 dans du RPMI dans un tube facs à l'aide de tips de 20 µl et 200 µl

Numération à l'Accuri

Centrifuger 5 min à 1200 rpm avec frein et forte pente (9 – 9)

Reprendre dans du milieu FBS – DMSO (10% DMSO – 90% FBS) en fonction de la numération dans un cryotube à l'aide d'une pipette de 5 ml

Congeler à -80°C dans une boîte prévue à cet effet

3. Annexe 3. Protocole du test hémolyse-hémagglutination

E. Gilot

Avril 2011

Matériel

- centrifugeuse à microhématocrite
- centrifugeuse à microtubes
- bain-marie ou étuve
- sang : suspension de sang total de poule avec EDTA
- témoin positif : serum de lapin immunisé contre les hématies de poules, mars 2008 ; dilution 1/10.
- tubes microcapillaires
- pate à sceller
- microplaques 96 puits à fond en U
- parafilmM
- PBS Dulbecco 0,01M
- Micropipette (0,25 ml et 1ml + pipette pour 25 ml)
- Micropipette multicanaux (0,25 ml)
- Bac pour la micropipette multicanaux
- Cones bleus et jaunes
- Scanner Epson 4990
- Gants

Protocole

1) Préparation de la suspension de cellules

- le matin : préparer un aliquot de 50 ml de PBS Dulbecco.

Chaque matin : pour 1 plaque de test il faut 2,4 ml de solution à 1% de cellules rouges donc 0,1 ml de solution à 50%.

- Renverser le tube de suspension cellulaire plusieurs fois et aliquoter environ 1,5 ml de suspension dans un ependorf. Fermer et retourner plusieurs fois.

- Centrifuger le microtube à 275g 5 minutes puis enlever la solution au-dessus des cellules et la couche supérieure de cellules (si hémolyse : diminuer la vitesse de centri ; si absence de séparation : augmenter).

- Compléter le microtube avec du PBS, remettre en suspension et centrifuger 5 minutes à 275g puis enlever l'excédent de PBS et la couche supérieure de cellules (centri2)

- Compléter le microtube avec du PBS, remettre en suspension et centrifuger 5 minutes à 275g puis enlever l'excédent de PBS et la couche supérieure de cellules (centri3)

- Compléter le microtube avec du PBS, remettre en suspension et centrifuger 5 minutes à 275g puis enlever l'excédent de PBS et la couche supérieure de cellules (centri4). Compléter le microtube avec du PBS et remettre en suspension.

- Mesurer l'hématocrite : après avoir agité le microtube, prélever un peu de solution dans 2 microcapillaires (agiter entre les 2, ne pas aller jusqu'au bout du tube), les fermer avec la pâte à sceller et les mettre dans la centrifugeuse, pâte contre le bord extérieur. Centrifuger 5 minutes à 12000g. (10-12 minutes à 13000 rpm). Lire l'hématocrite à l'aide de l'échelle ou de papier millimétré. Hématocrite = proportion de cellules par rapport au volume total.

- ajuster la concentration de cellules rouges à 1% dans du PBS : par exemple si l'hématocrite est de 23%, mettre 1 ml dans 22 ml de PBS. 1 ml = 6 plaques => faire 1,5 ml de solution de départ (par exemple ici + 33 ml de PBS) pour la journée, dans un tube de 50 ml.

- la suspension cellulaire doit être agitée immédiatement avant d'être utilisée pour traiter une plaque.

3) test

- préparer les échantillons : à partir de la liste des échantillons, générer aléatoirement la liste des échantillons à traiter pour chaque plaque (6 échantillons par plaque). Sortir les échantillons des 2 premières plaques dans un portoir, vérifier l'alignement.

- chaque ligne de la microplaque correspond à un test : 1 et 12= témoins positifs.

- placer 25 microlitres de plasma dans chacun des puits des colonnes A et B après mixage de l'échantillon de plasma.

- mettre 25 microlitres de PBS dans chacun des puits des colonnes B à H. Attention, ne pas commencer par le puits 1.

- Diluer le plasma en plaçant 25 microlitres du contenu du puits colonne B dans la colonne C (après avoir mélangé), et ainsi de suite jusqu'à la colonne G (pas dans la colonne H ; éventuellement obturer la colonne H avant ; on prélève 25 microlitres dans la colonne G qui seront jetés), on aboutit à des dilutions de 1 à 1/1024 du plasma + 1 témoin négatif :

(A) (B) (C) (D) (E) (F) (G) (H)

(1) (1/2) (1/4) (1/8) (1/16) (1/32) (1/64) TN

- mettre 25 microlitres de suspension de globules rouges de poule dans chaque puits (chaque dilution est divisée par deux). Compter le temps à partir de ce moment.

- sceller la plaque avec du parafilm et couvrir avec un couvercle de polystyrène.

- agiter doucement 10 secondes sur la paillasse.

- laisser incuber 90 minutes en mettant la plaque à flotter dans un bain d'eau à 37°C.

- à la fin de l'incubation, le grand côté de la plaque est placé à 45° pendant 20 minutes pour mieux visualiser l'agglutination.

- scanner la plaque (full size, 300 dpi) en fonction transparence du scanner, pour l'agglutination (mode professionnel, transparence, image positive).

- Laisser ensuite la plaque à plat. Après 90 minutes après la sortie du bain, faire un 2^{ème} scan pour la lyse.

- les résultats sont lus en lyse et agglutination pour chaque puits. Les scans sont repris DimageViewer et découpés en bandes, on attribue à chaque bande un numéro tiré au hasard.

- Pour chaque ligne on note le score de lyse = $-\log(\text{base}2)$ de la dernière dilution montrant le phénomène = numéro du puits qui montre la dernière réaction. Lorsque la fin de la lyse est intermédiaire ou ambiguë on note un score intermédiaire entre deux titres.

Déchets :

- microplaques, cones, etc : cartons jaunes

- restes de solution d'hématies : en fonction de la quantité restante, adsorber sur un papier et mettre en carton jaune ou incinérer dans conteneur pour liquide.

Date :

Numéro de lot d'hématies :

Date de prélèvement :

Centri 1 PBS centri 2 PBS centri 3 PBS centri 4 PBS

Hématocrite :

Plaque numéro : (AAAAMMJJ2chiffres) :

Heure de mise en bain :

Heure de sortie :

Heure du 1^{er} scan

Heure du 2^{ème} scan

Ech												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Plaque numéro : (AAAAMMJJ2chiffres) :

Heure de mise en bain :

Heure de sortie :

Heure du 1^{er} scan

Heure du 2^{ème} scan

Ech												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Plaque numéro : (AAAAMMJJ2chiffres) :

Heure de mise en bain :

Heure de sortie :

Heure du 1^{er} scan

Heure du 2^{ème} scan

Ech												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Plaque numéro : (AAAAMMJJ2chiffres) :

Heure de mise en bain :

Heure de sortie :

Heure du 1^{er} scan

Heure du 2^{ème} scan

Ech												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Plaque numéro : (AAAAMMJJ2chiffres) :

Heure de mise en bain :

Heure de sortie :

Heure du 1^{er} scan

Heure du 2^{ème} scan

Ech												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Plaque numéro : (AAAAMMJJ2chiffres) :

Heure de mise en bain :

Heure de sortie :

Heure du 1^{er} scan

Heure du 2^{ème} scan

Ech												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

4. Annexe 4. Protocole test de phagocytose

Un aliquot de Zymosan contient $4 \cdot 10^5$ Zymosan/ μl

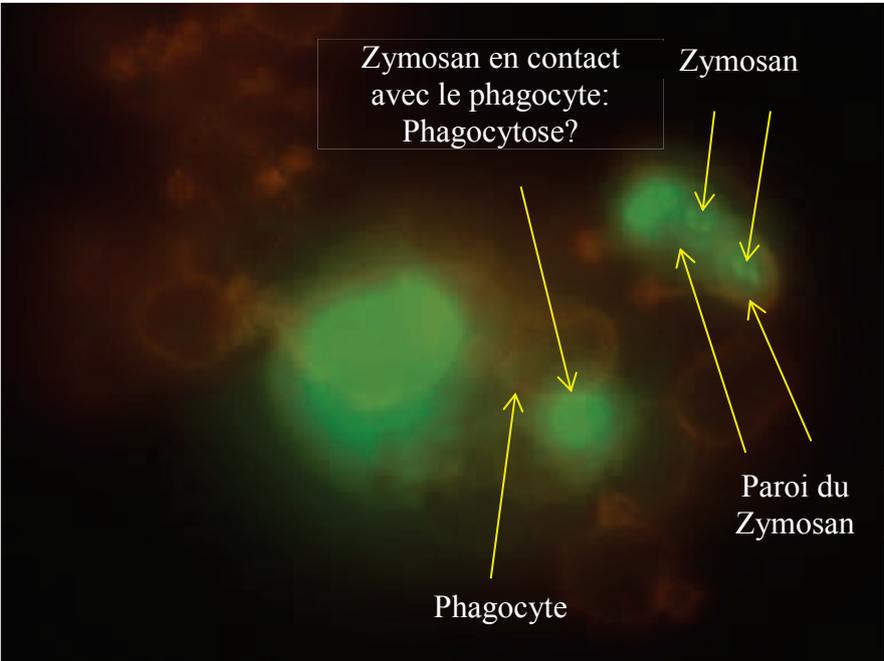
- Préparer $5 \cdot 10^5$ Zymosan par échantillons
- Mettre $5 \cdot 10^5$ PBMC par puits (dans une plaque à fond conique de 96 puits)

- Soniquer le Zymosan = bain à ultrason qui désagrège le Zymosan
- 1 tube = Zymosan seul = 15 μl
- 1 tube Zymosan opsonisation reagent = 15 μl + 15 μl
- vortexer
- Incuber 30 min à 37°C
- Reprendre dans 1 ml de PBS
- Centrifuger 5 min à 1200 rpm
- Resuspendre entre 2 et 10 particules/phagocytes

Si on considère qu'après ficoll, il y a environ 10% de phagocytes et que nous voulons 10 particules par phagocyte

- Alors pour $1 \cdot 10^6$ particules
- Déposer dans un tube facs 100 μl de suspension cellulaire
- Ajouter x μl de Zymosan
- Incuber 30 min à 37°C
- Faire un lavage
- Passer au Facs

5. Annexe 5. Particules de Zymosan en contact avec les phagocytes



6. Annexe 6. Protocole de phagocytose avec anticorps secondaire

Un aliquot de Zymosan contient 4.10^5 Zymosan/ μ l

- Préparer 5.10^5 Zymosan par échantillons
- Mettre 5.10^5 PBMC par puits (dans une plaque à fond conique de 96 puits)

La plaque est séparée en 4 sections :

-Zymosan seul

-Zymosan + anti rabbit

-Zymosan opsonisé seul

-Zymosan opsonisé + anti rabbit

- Soniquer le Zymosan = bain à ultrason qui désagrège le Zymosan
- 1 tube = Zymosan seul = 15 μ l
- 1 tube Zymosan opsonisation reagent = 15 μ l + 15 μ l
- vortexer
- Incuber 30 min à 37°C
- Reprendre dans 1 ml de PBS
- Centrifuger 5 min à 1200 rpm
- Resuspendre le culot dans 150 μ l de PBS
- Mettre 12,5 μ l / puits (= 5.10^5 particules/puits)
- Incuber 60 min à 37°C
- Ajouter 100 μ l de PBS
- Centrifuger 5 min à 1200 rpm
- Resuspendre dans 200 μ l de Facstain à 4°C
- Reprendre 100 μ l des 200 μ l et les déposer dans le puits du dessous
- Ajouter 25 μ l d'anti-rabbit (dilution au $\frac{1}{4}$)
- Incuber 20 min à 4°C
- Ajouter 100 μ l de Facstain à 4°C
- Centrifuger 5 min à 1200 rpm à 4°C
- Resuspendre dans 100 μ l de facstain à 4°C
- Passer aux facs

7. Annexe 7. Résultats préliminaires de la distribution leucocytaire et de l'activité phagocytaire (Université de Reims Champagne-Ardenne)

Les résultats présentés ont été obtenus à partir d'un unique prélèvement de sang hépariné (Volume : 4 mL).

Les leucocytes sont isolés à partir du sang total sur un gradient de Ficoll (densité 1.077) par centrifugation (350 g, 20 min, +4°C). L'anneau de leucocytes est récupéré et repris dans du milieu de culture Leibovitz L15 (Pénicilline/ Streptomycine).

La suspension cellulaire est numéree à l'aide d'un hématimètre de Mallassez. La concentration en cellules obtenue est de $1,66 \times 10^6$ cellules /mL.

1) Distribution leucocytaire (Figure 1) :

Les cellules (1×10^5 cellules/mL) sont analysées par cytométrie en flux suite au protocole d'isolement. L'incubation des leucocytes avec du DIOC_6 (marqueur du potentiel transmembranaire mitochondrial) permet d'améliorer la discrimination des différents types leucocytaires en séparant visiblement les monocytes et les granulocytes. Les proportions des trois principales sous-populations leucocytaires peuvent ainsi être quantifiées. Ce premier type de paramètres obtenus est d'importance compte tenu du fait que la normalité de la distribution leucocytaire sanguine est connue chez les vertébrés et correspond à un rapport lymphocytes/granulocytes de l'ordre de 90/10.

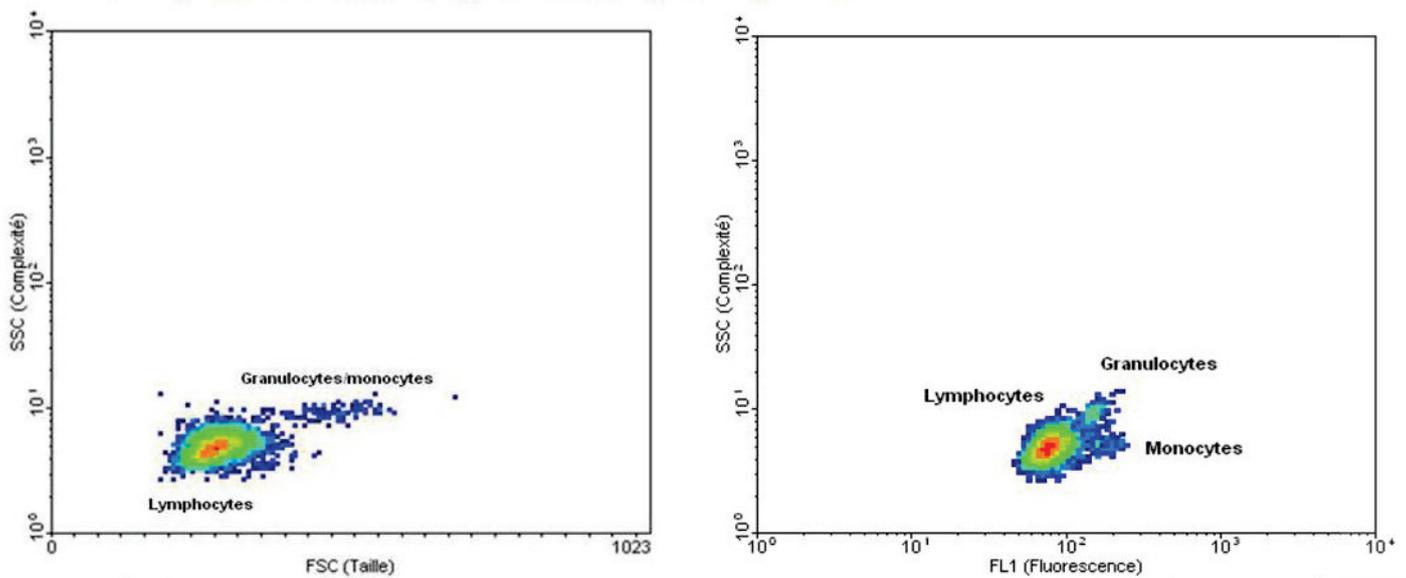


Figure 1 : Cytogrammes d'une suspension de leucocytes de sang de chevreuil

Le cytogramme de gauche montre les trois sous-catégories leucocytaires sans permettre une discrimination visible entre monocytes et granulocytes. L'incubation des leucocytes avec du DIOC_6 permet de séparer visuellement les monocytes des granulocytes en fonction de leurs niveaux de complexité et de fluorescence (cytogramme de droite).

2) Activité de phagocytose :

Les leucocytes isolés sont mis en présence de billes de latex fluorescentes (Diamètre : 2,157 μm) durant 18 heures avec un ratio de 1 cellule pour 100 billes. L'incubation a été menée à +20°C.

L'analyse des résultats obtenus confirme que les cellules du groupe des granulocytes/monocytes sont celles qui présentent l'activité de phagocytose la plus visible sur le cytogramme (Figure 1). L'histogramme de fluorescence représenté par la figure 3, permet de calculer les données suivantes :

- Activité de phagocytose (%) = pourcentage de cellules ayant phagocyté trois billes et plus.
- Nombre moyen de billes ingérées = Rapport entre la fluorescence moyenne de cellules ayant ingéré trois billes et plus et la fluorescence moyenne des cellules ayant phagocyté une seule bille.

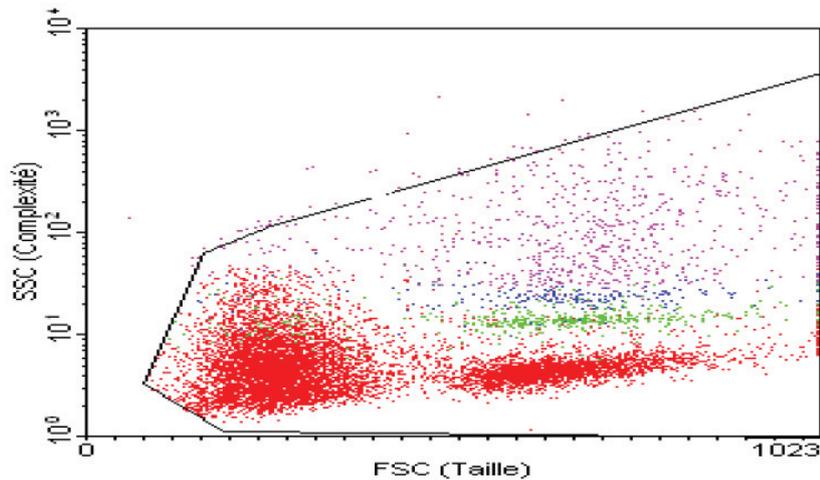


Figure 2 : Cytogramme révélant les événements cellulaires associés au processus de phagocytose.

En vert : cellules ayant phagocyté une bille

En bleu : cellules ayant phagocyté deux billes

En violet : cellules ayant phagocyté trois billes et plus de trois billes (médiane = 17,03)

Résumé

Condition physique, immunocompétence et parasitisme dans des populations naturelles de chevreuils (*Capreolus capreolus*)

L'émergence de l'éco-immunologie a permis une approche intégrative de l'étude des interactions hôtes-parasites allant des mécanismes moléculaires de la réponse immunitaire au rôle de l'immunocompétence dans l'évolution des traits d'histoire de vie. Dans ce contexte, cette thèse a pour but d'étudier les variations de l'immunocompétence dans deux populations naturelles de chevreuils vivant en milieux contrastés. Cependant, les méthodes disponibles pour caractériser le système immunitaire dans les populations naturelles sont peu nombreuses et peu adaptées. Aussi les objectifs de cette thèse étaient i) d'identifier et mettre au point des méthodes permettant de caractériser le système immunitaire du chevreuil, ii) d'étudier le lien entre les différents déterminants de l'immunocompétence, et iii) d'étudier les variations de l'immunocompétence en lien avec la condition physique d'une part, et avec un caractère sexuel secondaire d'autre part. Nous avons mesuré plusieurs composantes de l'immunité prenant en compte les aspects descriptifs, comme la numération des leucocytes, et fonctionnels, avec le test d'hémagglutination-hémolyse, la prolifération lymphocytaire ou la phagocytose. Nous avons mis en évidence une corrélation négative entre les deux déterminants de l'immunité, la condition physique et le parasitisme. Nous avons également montré un déclin des paramètres hématologiques et biochimiques avec l'âge (sénescence). Ensuite, nous avons montré des relations entre l'immunocompétence et la condition physique ou la taille des bois. Ces travaux corroborent différentes hypothèses de l'écologie évolutive.

Mots-clés : caractères sexuels secondaires, chevreuil, compromis, condition physique, éco-immunologie, immunocompétence, parasitisme.

Abstract

Body condition, immunocompetence and parasitism in natural populations of roe deer (*Capreolus capreolus*)

Ecoimmunology focuses on an integrative approach of host-pathogens interactions from the molecular mechanics of immune responses to the role of immunity in shaping the evolution of life history traits. Here, we proposed to study the variation of immunocompetence in two natural contrasted populations of roe deer. However, available methods to characterize immune system in wild populations are still limited. Consequently, in this context, the goals of this work were i) to identify methods to investigate the roe deer immune system and to adapt these methods developed for other species to roe deer, ii) to study the relationships between potential drivers of immunocompetence, including body condition and parasitism, and iii) to study variation of immunocompetence with body condition on one hand, and in the context of sexual selection, with secondary sexual characters on the other hand. We measured simultaneously several components of immunity including descriptive measures, as numeration of leucocytes subsets, and functional measures with hemagglutination-hemolysis, lymphocyte proliferation by mitogens stimulation or phagocytosis. We found a negative correlation between body condition and parasitism and senescence patterns in haematological and biochemical parameters. Moreover, we showed variations of immunocompetence with body condition and secondary sexual characters. This work corroborates some hypotheses of evolutionary biology.

Keywords: body condition, ecoimmunology, immunocompetence, parasitism, roe deer, secondary sexual character, trade-off.