



HAL
open science

Stratégies de thermorégulation liées aux contraintes physiologiques et environnementales chez le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*)

Agnès Lewden

► **To cite this version:**

Agnès Lewden. Stratégies de thermorégulation liées aux contraintes physiologiques et environnementales chez le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*). Bioclimatologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ125 . tel-01770157

HAL Id: tel-01770157

<https://theses.hal.science/tel-01770157>

Submitted on 18 Apr 2018

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.

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

IPHC, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie (UMR 7178)

THÈSE présentée par :

Agnès Lewden

soutenue le : **20 octobre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Écophysiologie Animale**

**Stratégies de thermorégulation liées aux
contraintes physiologiques et
environnementales chez le manchot royal
(*Aptenodytes patagonicus*)**

THÈSE dirigée par :

Dr. HANDRICH Yves

Chargé de Recherche, CNRS UMR 7178, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr GILBERT Caroline

Maître de conférences, CNRS UMR 7179

Dr ROUSSEL Damien

Maître de conférences, Université de Lyon, CNRS UMR 5023

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. VOITURON Yann Civilité

Professeur, Université de Lyon, CNRS UMR 5023

Dr. PERRET Martine

Professeur émérite, CNRS UMR 7179

Dr. LE MAHO Yvon Civilité

Professeur émérite, CNRS UMR 7178

Stratégies de thermorégulation liées aux contraintes
physiologiques et environnementales chez le manchot royal
(*Aptenodytes patagonicus*)

Thèse présentée par
Agnès LEWDEN



Soutenue le 20 Octobre 2017 pour obtenir le
grade de Docteur de l'université de Strasbourg
Discipline : Éco-physiologie

Thèse dirigée par : Dr. Yves HANDRICH Chargé de Recherche, CNRS UMR 7178
Rapporteurs : Dr. Caroline GILBERT Maître de conférences, CNRS UMR 7179
Dr. Damien ROUSSEL Maître de conférences, Université de Lyon, CNRS UMR 5023
Autres membres : Pr. Yann VOITURON Enseignant chercheur, Université de Lyon, CNRS UMR 5023
Pr. Martine PERRET Professeur émérite, CNRS UMR 7179
Pr. Yvon LE MAHO Professeur émérite, CNRS UMR 7178

"Success is the ability to go from one failure
to another without loss your enthusiasm"

W. Churchill

Avant-propos



Avant-propos

Sommaire	i
Sommaire des 'Box'	ii
Liste des abréviations	iii
Liste des publications	iv
Remerciements	v

Introduction

Préface	1
A. Qu'est-ce que la thermorégulation	2
1. Définition	2
2. Influence de l'environnement	4
2.1 Le gradient de température	4
2.2 Les échanges thermiques	6
B. Comment réduire les pertes de chaleur dans un environnement froid ?	8
1. L'évitement	8
1.1 La migration	8
1.2 La torpeur et l'hibernation	8
1.3 Le regroupement	10
2. Le ratio surface/volume	10
3. L'isolation	11
3.1 Les phanères	11
3.2 Le tissu adipeux sous-cutané	13
3.3 Vasomotricité sanguine des tissus périphériques	14
C. Environnement froid : Augmenter la production de chaleur	15
1. Activité métabolique	16
1.1 Thermogénèse de frisson	18
1.2 Thermogénèse sans frisson	19
2. Autres activités productrices de chaleur	19
2.1 La locomotion	21
2.2 La digestion	22
D. Thermorégulation et activité en milieu aquatique	25
1. La nage	25
1.1 Nage sous l'eau	25
1.2 Entrée et sortie de l'eau des espèces plongeuses	27
2. La plongée	28
2.1 Définition et contraintes de la plongée	28
2.2 Délimitation du cycle de plongée	29
2.3 Les échanges gazeux au cours du cycle de plongée	30
2.4 La plongée chez les manchots	31
2.5 Métabolisme durant la plongée	33

Sommaire

E. Objectif de cette thèse	34
1. Energétique du manchot royal en mer	35
2. Le paradoxe du manchot royal	37
3. Définition des objectifs de ma thèse	38
3.1 Partie 1 : Mesure des individus en piscine	38
<i>Chapitre 1</i>	
<i>Chapitre 2</i>	
<i>Etude complémentaire</i>	
3.1 Partie 2 : Mesure des individus à terre	39
<i>Chapitre 3</i>	
<i>Chapitre 4</i>	

Matériel & Méthodes

A. Site d'étude	42
B. Présentation du modèle d'étude	43
1. Biologie de l'espèce	44
2. Energétique du manchot royal	46
2.1 Réduction des pertes de chaleur	46
2.2 Métabolisme de la thermogénèse	49
2.3 Métabolisme du jeûne	49
<i>A- Au stade poussin</i>	50
<i>B- Au stade adulte</i>	50
2.4 Métabolisme de la plongée	51
3. Activité de digestion	52
3.1 En mer	52
3.1 A terre	52
C. Matériel & Méthodes	52
1. La piscine	53
2. La chirurgie	54
2.1 Pré-anesthésie et induction	55
2.2 Chirurgie	55
2.3 Réveil et soin post-opératoire	56
3. La surveillance vidéo	56
4. Mesure des températures corporelles	57
4.1 Températures internes	57
4.2 Températures superficielles par thermographie	58
5. Mesure de l'activité métabolique	59
5.1 La respirométrie	59
5.2 Mesure de la fréquence cardiaque	61
5.3 Mesure de l'accélération	62

Partie 1 :

Chapitre 1 – High peripheral temperature in king penguin while resting at sea: Thermoregulation versus fat deposition	63
--	----

Chapitre 2 – Thermal strategies of king penguin during prolonged fasting in water	74
--	----

Etude complémentaire – Impact des conditions expérimentales sur les individus de manchots royaux maintenus en piscine	101
--	-----

Partie 2 :

Chapitre 3 – Récupération des températures du manchot royal après une longue immersion dans l'eau froide : Une stratégie inattendue	119
--	-----

Chapitre 4 – Dynamique de la réaugmentation des températures corporelles chez le manchot royal ..	135
--	-----

Discussion

A. Synthèse des résultats obtenus	156
--	-----

B. Limites des perspectives	157
--	-----

1. Récupération et acclimatation des oiseaux	157
---	-----

2. Conditions naturelles <i>versus</i> expérimentales	158
--	-----

2.1 En mer <i>versus</i> en piscine	158
---	-----

2.2 En colonie <i>versus</i> en studio photographique	159
---	-----

3. Variation de la masse	159
---------------------------------------	-----

4. Variation des températures	161
--	-----

4.1 Un proxy de la perfusion sanguine	162
---	-----

4.2 Collecte de données en temps réel	162
---	-----

4.3 Approche comportementale grâce à l'accélérométrie	163
---	-----

5. Activité de digestion et dépôt lipidique	164
--	-----

5.1 Mesure directe de l'activité de digestion	164
---	-----

5.2 Mesure directe du stockage des FFA dans le TASC	164
---	-----

A- Identification du stockage	165
-------------------------------------	-----

B- Activité de stockage en lien avec les températures périphériques	165
---	-----

Conclusion	167
-------------------------	-----

Bibliographie	170
----------------------------	-----

Sommaire des 'Box'

Introduction

Box 1 : Régulation neuronale simplifiée de la thermorégulation.....	2
Box 2 : Structure isolante d'un mammifère aquatique et d'un oiseau antarctique	13
Box 3 : Le bec, une surface d'échange efficace chez les oiseaux	15
Box 4 : Principe de substitution par activité.....	21
Box 5 : Substitution des coûts de thermorégulation pendant la digestion.....	23
Box 6 : Impact à grande vitesse en toute sécurité.....	27
Box 7 : Disparité dans l'estimation de l'ADLc	33

Matériel & Méthodes

Box 8 : Cycle biologique du manchot royal.....	45
Box 9 : Différentes phase du jeûne chez le manchot royal	51

Liste des abréviations

- ADL : *Aerobic Diving Limite* pour limite de la plongée aérobie
- ADLc : *Aerobic Diving Limite calculated* pour limite calculée de la plongée aérobie
- ATP : Adénosine tri-phosphate
- av-UCP : *Avian UnCoupling Proteine* pour protéine découplante aviaire
- BMR : *Basal Metabolic Rate* pour taux métabolique de base
- C : Conductance thermique
- DTabd : Augmentation de la température abdominale
- FFA : *Free Fatty Acids* pour les acides gras libres
- FMR : *Field Metabolic Rate* pour taux métabolique de terrain
- HIF : *Heat Incresement Feeding* pour production de chaleur par digestion
- M_b : *Body Mass* pour masse corporelle
- MR : *Metabolic Rate* pour taux métabolique
- SDA : *Specific Dynamic Action*
- Ta : Température ambiante
- Tabd : Température abdominale
- TASC : Tissu adipeux sous-cutané
- Tb : *Body Temperature* pour température corporelle
- Tci : Température critique inférieure
- Tcs : Température critique supérieure
- Tdos : Température du dos
- Tflc : Température du flanc
- TNZ : *ThermoNeutral Zone* pour la zone de thermoneutralité
- T_w : *water temperature* pour température de l'eau
- Msum : *Summit metabolic rate* pour Sommet métabolique
- UCP : *UnCoupling proteine* pour protéine de découplage
- RMR : *Resting Metabolic Rate* pour taux métabolique de repos
- \dot{V}_{CO_2} : *CO₂ production rate*
- \dot{V}_{O_2} : *oxygen consumption rate*
- $s\dot{V}_{O_2}$: *mass-specific oxygen consumption rate*

Travaux présentés dans le cadre de la thèse

Publications scientifiques

Lewden A., Enstipp M.R., Bonnet B., Bost C., Bost C.-A., Handrich Y. (2017) - Thermoregulation strategy in fasting king penguin maintained in sea water tank. *J. Exp. Biol.* doi: 10.1242/jeb.168807.

Lewden A., Enstipp M.R., Picard B. and Handrich Y. (2017) - High peripheral temperatures in king penguins during inactivity at sea: thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Biol.* **220**, 3084-3094.

Lewden A., Bonnet B., Chauvet F., McCafferty D. and Handrich Y.- Body temperature dynamics in rewarming king penguins. *In prep.*

Lewden A., Andreas Nord, Bonnet B. and Handrich Y. - Recovery temperatures after long-term immersion in cold water: An unexpected strategy using by King Penguins. *In prep.*

Communications scientifiques

Communications orales

Ecology & behaviour 13^{ième} (**EB2017**) (Chizé, France)

Why it's good to be hot – body temperature dynamics in king penguins (Lewden, Bonnet, Handrich and McCafferty **2017**)

International penguin congress 9th (**IPC9**) (Le Cap, Afrique du Sud)

On being a pelagic bird: Conflicting demands of thermoregulation and digestive processes at sea (Lewden, Enstipp, van Walsum, Bonnet, Picard and Handrich **2016**)

Society of experimental biology (**SEB**) (Brighton, Angleterre)

On being a pelagic bird: Conflicting demands of thermoregulation and digestive processes at sea (Lewden, Enstipp, van Walsum, Bonnet, Picard and Handrich **2016**)

Colloque d'Ecophysiologie Animale – (**CEPA**) (La Rochelle, France)

King penguins rewarm their skin temperature to normothermia during night at sea: a descriptive study in condition of captivity. (Lewden and Handrich **2015**)

Communications affichées

International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (**ICCPB**) (Cracovie, Pologne)

King penguins rewarm their skin temperature to normothermia during the night at sea: a descriptive study in condition of captivity (Lewden, Picard, van Walsum, Bost, Hestin and Handrich **2015**)

Publications

Bio-logging 5 (**BLS5**) (Strasbourg, France)

An over-cost of being a pelagic bird: A possible energetic conflict between thermoregulation and digestive processes (Lewden, Bost and Handrich **2014**)

Invitation à présenter

Mars **2017** - Institut de biodiversité, Santé animale et médecine comparative – Université de Glasgow – Invitée par Dr. Dominic McCafferty (Angleterre)

Septembre **2016** –Département de Zoologie et Entomologie - Université de Prétoria – Invitée par Prof. Andrew McKechnie (Afrique du Sud)

Autres travaux de recherche

Publications scientifiques

Lewden A., Nord A., Petit M. and Vézina F. (2017) Body temperature responses to handling stress in wintering Black-capped Chickadees (*Poecile atricapillus* L.). *Physiology & Behavior* 179: 49-54

Delord K., Pinet P., Pinaud P., De Grissac S., **Lewden A.**, Cherel Y., Weimerskirch H. (2016). Contrasted foraging strategies of Antarctic fulmarine petrels during the breeding and interbreeding periods. *Ibis* 158: 569-586

Cortés PA., Petit M., **Lewden A.**, Milbergue M., Vézina F. (2015). Individual inconsistencies in basal and summit metabolic rate highlight flexibility of metabolic performance in a wintering passerine. *Journal of Experimental Zoology* 9999: 1-12

Lewden A., Petit M., Milbergue M., Orio S., Vézina F. (2014) Evidences for use of facultative hypothermia during the day as a mean of energy saving in a small passerine wintering at northern latitudes. *Ibis* 156: 321-329

Petit M., **Lewden A.**, Vézina F. (2014) How does flexibility in body composition relate to seasonal changes in metabolic performance in a small passerine wintering at northern latitude ? *Physiology Biochemical Zoology* 87(4): 539-49

Lacoste-Garanger N., Lanshere J., **Lewden A.** (2013) Assembling of an Emperor Penguin (*Aptenodytes forsteri*) skeleton in Adelie Land (Antarctica): interest of Amphipods in the bones cleaning. *Cahier d'Anatomie Comparée* 5: 1-17

Petit M., **Lewden A.**, Vézina F. (2013) Intra-Seasonal Flexibility in Avian Metabolic Performance Highlights the Uncoupling of Basal Metabolic Rate and Thermogenic Capacity. *PLoS ONE* 8(6): e68292

Lewden A., Petit M., Vézina F. (2012) Dominant Black-Capped Chickadees pay no maintenance energy costs for their wintering status and are not better at enduring cold than subordinate individuals. *Journal of Comparative Physiology B.* 182: 381-392

Communications scientifiques

Communications orales

Society for Integrative and Comparative Biology (**SICB**) (Salt lake city, Etats-Unis)

How does social dominance influence seasonal acclimatization and winter metabolic performance in Black-Capped Chickadees? (Lewden and Vézina **2011**)

Société canadienne ornithologique/ Ornithologist Society canadien (**SCO/OSC**) (Moncton, Canada)

Socially dominant Black-Capped Chickadees are larger and fatter than subordinates but do not show better metabolic performance in winter? (Lewden and Vézina **2011**)

Société Québécoise pour l'Etude Biologique du Comportement (**SQEBC**) (Montréal et Trois-rivières, Canada)

L'acclimatation au froid est-elle influencée par le rang de dominance chez la mésange à tête noire (*Poecile atricapillus*)? (Lewden et Vézina **2010**)

Le rang de dominance a-t-il un impact sur l'acclimatation au froid de la mésange à tête noire (*Poecile atricapillus*)? (Lewden et Vézina **2009**)

Communications affichées

Society for Integrative and Comparative Biology (**SICB**) (Charleston, Etats-Unis)

Daytime use of hypothermia is not related to metabolic performance in wintering Black-Capped Chickadees (Lewden, Petit and Vézina **2012**)

Colloque de vulgarisation scientifique “la biologie dans tous ses états”

Le rang de dominance a-t-il un impact sur l'acclimatation au froid de la mésange à tête noire (*Poecile atricapillus*)? (Lewden et Vézina **2010**)

Travaux de vulgarisation

« Agnès a hiverné avec les espèces de l'Antarctique » - Ouest France – 04 Septembre 2016

<http://jactiv.ouest-france.fr/ils-sactivent/initiatives/agnes-hiverne-avec-especes-lantarctique-67365>

Emission « Rencontre avec... » – RCF radio – 18 Avril 2016 – 30 minutes

<https://rcf.fr/culture/portraits/agnes-lewden>

« En direction de Sud » - Présentation devant 5 classes de Seconde au sein du Collège/Lycée Saint-Charles – Saint-Brieuc (22) – Avril 2016.

Article ‘ACAP breeding site No. 47: Pointe Géologie, Terre Adélie, western Antarctica’ pour le site web « Agreement on the Conservation of Albatrosses and Petrels (ACAP) – 21 Septembre 2013

<http://www.acap.aq/fr/actualites/nouvelles-archivées/60-2013-news-archive/1505-acap-breeding-site-no-47-pointe-geologie-terre-adelie-western-antarctica>

Remerciements



AL

I

Introduction



- Préface -

L'étude des "Stratégies de thermorégulation liées aux contraintes physiologiques et environnementales chez le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*)" aborde la **thermorégulation** chez des individus nourris et à jeun étudiés dans l'eau et à terre. Ainsi, le fil conducteur de cette introduction sera focalisé sur les espèces endothermes amphibiennes marines en réduisant à chaque partie le nombre d'espèces considérées afin de partir des concepts généraux pour en arriver aux spécificités de mon modèle d'étude, le manchot royal. Cependant, le cas échéant, des exemples pertinents illustrant des contraintes ou des concepts similaires pourront être utilisés en dehors du groupe principalement considéré.

Ce sujet d'écophysiologie sera introduit par une vision d'ensemble de la thermorégulation. Pour commencer, les principes majeurs et les définitions seront donnés pour les ectothermes et les endothermes, afin de mettre en avant les différences entre ces deux groupes. Ensuite, nous nous intéresserons aux adaptations caractéristiques des espèces vivant dans des milieux froids induisant des pertes de chaleur conséquentes dans l'air mais également dans l'eau.

La surface de la terre est recouverte à 71% par les mers et les océans. Cet environnement aquatique présente des caractéristiques différentes du milieu terrestre et offre un habitat disponible pour les espèces qui y sont **adaptées**. La disponibilité de ces habitats est d'ailleurs très probablement le moteur évolutif de la colonisation de ces niches trophiques marines il y a environ 60 millions d'années (Benton 2004). Le nombre d'espèces de mammifères et d'oiseaux marins varie en fonction du sens strict ou élargi que l'on attribue à ce terme. Dans cette introduction, les espèces marines considérées seront uniquement les espèces amphibiennes (exclusion des cétacés et des siréniens). En effet, de par leurs capacités à effectuer des activités terrestres et aquatiques, ces espèces présentent des adaptations morphologiques et physiologiques aux deux milieux sans être intégralement spécialisées à l'un d'entre eux. Cette capacité amphibie nécessite également la mise en place de différentes stratégies de thermorégulation en fonction du milieu ambiant. Ainsi, les adaptations **morphologiques** et **métaboliques** en lien avec la thermorégulation seront traitées dans les deux milieux.

Par la suite, les activités en lien avec le milieu aquatique, telles que la nage, l'entrée et la sortie de l'eau mais encore la plongée, seront détaillées uniquement chez les espèces d'oiseaux. Pour finir, nous nous focaliserons sur la plongée des manchots qui présentent des capacités d'apnées impressionnantes. De plus, de par leur incapacité à voler, ces espèces passent plusieurs jours immergés dans l'eau impliquant différentes **stratégies de thermorégulation**.

A. Qu'est-ce que la thermorégulation ?

1. Définitions

La thermorégulation regroupe les processus qui permettent de **réguler la température** corporelle d'un individu. La thermorégulation peut être passive comme lorsqu'un individu se réchauffe aux rayons du soleil ou active, signifiant que l'individu produit sa propre chaleur corporelle. Dans tous les cas, les échanges de calories entre l'organisme et son environnement sont permanents, quelques soient les conditions, et vont influencer l'activité de thermorégulation. La **thermogénèse** et la **thermolyse** sont les deux principaux mécanismes qui vont permettre d'augmenter la température corporelle par **gain** de chaleur ou de diminuer cette dernière par **dissipation** de chaleur. La thermorégulation est un processus physiologique dont la régulation peut se faire par voie neuronale (Seebacher 2009) permettant d'ajuster les réponses de l'organisme selon les contraintes environnementales (*e.g.* variation de température) afin de maintenir une température interne plus ou moins stable (*i.e.* température de consigne ; Nakamura et Morrisson 2008) (Box 1).

Box 1 : Régulation neuronale simplifiée de la thermorégulation

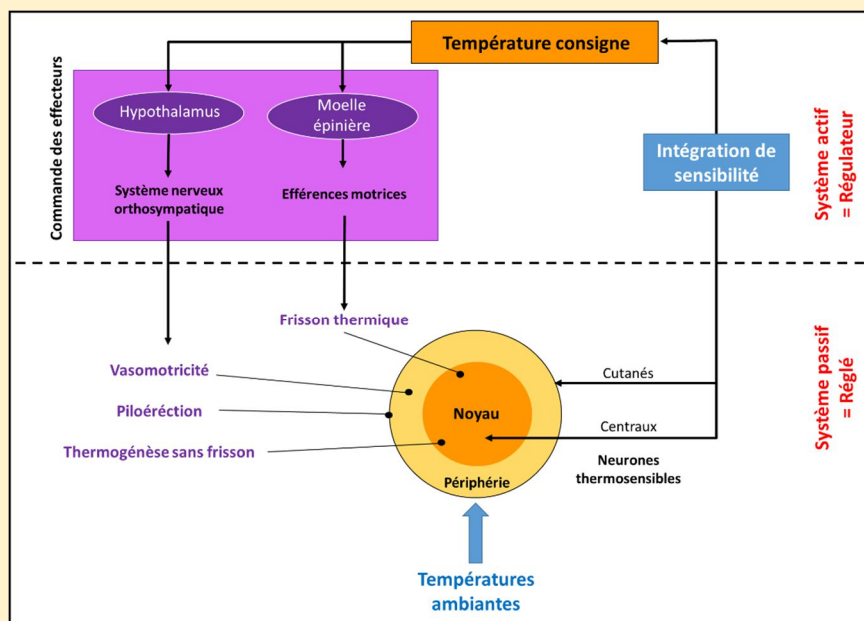


Figure A : Schématisation de la boucle de régulation de la température corporelle à partir de la sensibilité interne (centraux) et périphérique (cutanés).

Le contrôle de la thermorégulation par le système nerveux s'effectue par une **boucle régulatrice**. Cette dernière permet de maintenir les températures internes stables malgré les variations de températures ambiantes. Le retentissement de la sensibilité des neurones thermosensibles est intégré et comparé à la température de consigne. En fonction de la différence entre les températures corporelles (internes et cutanées) et la température de consigne, une série de réponses thermorégulatrices est mise en place. Ainsi le message nerveux va contrôler différents effecteurs. L'hypothalamus agira sur le système nerveux orthosympatique induisant les réponses thermo-compensatrices comme la vasomotricité, la piloérection ou encore l'activation du tissu adipeux brun. En parallèle, la moelle épinière pourra agir sur le tonus et le frisson musculaire par le biais des motoneurons somatiques.

Les organismes **endothermes** sont caractérisés par une capacité de thermogénèse suffisante au maintien d'une température corporelle stable ($>35^{\circ}\text{C}$), créant une différence de température importante entre l'organisme et le milieu ambiant. Ainsi, cette température corporelle est indépendante de la température ambiante (McNab 2002); on dit alors que ces organismes sont "homéothermes". En revanche, les organismes **ectothermes** présentent une production de chaleur insuffisante pour permettre la mise en place d'un gradient de température significatif entre la surface corporelle et l'environnement. Par conséquent, leur température corporelle varie en fonction des températures extérieures et on les appelle aussi des "poïkilothermes" (Figure 1). Cette différence schématique entre ces deux types d'organismes est la conséquence, entre autres, de leur métabolisme. En effet, les individus endothermes ont un métabolisme de repos 5 à 7 fois supérieur aux ectothermes de même taille et à la même température corporelle (Schmidt-Nielsen 1979).

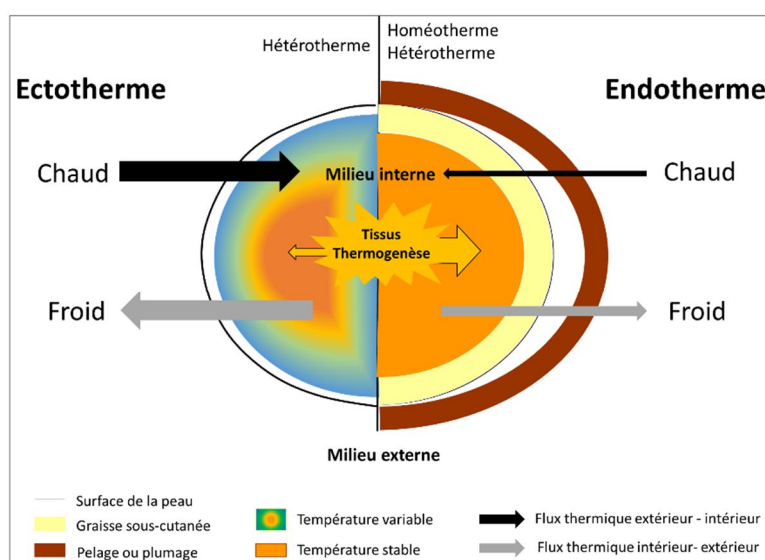


Figure 1 : Ectothermie et endothermie chez les animaux. Adapté de Gilles et al. 2012

Bien qu'insuffisante à l'indépendance des températures corporelles face aux conditions ambiantes, la thermogénèse chez les espèces ectothermes peut permettre de maintenir certaines régions du corps à des températures supérieures à la température ambiante. Ces espèces sont alors qualifiées d'"ectothermes hétérothermes" (Figure 1). Parmi ces organismes figurent notamment plusieurs espèces de thons et de requins. Réciproquement, les endothermes peuvent également être **hétérothermes**. Cette hétérothermie, chez les espèces endothermes, se définit **au sens stricte** par l'abaissement significatif ($> 2^{\circ}\text{C}$) des températures corporelles pendant plusieurs heures à plusieurs mois (Phillips et al. 1985; Schmidt-Nielsen 1979). Cependant, la réduction des températures peut toutefois se restreindre à certaines régions du corps et l'on parlera alors d'"**hétérothermie régionale**".

La thermorégulation est nécessaire en raison de l'influence de la température corporelle sur la vitesse de fonctionnement de l'organisme. En effet, les réactions chimiques et enzymatiques qui conditionnent le métabolisme, et toutes activités de l'organisme, sont liées à la température du milieu interne. Cette

relation est communément décrite par le **coefficient thermique**, Q_{10} , qui est le rapport des vitesses lorsque la température augmente de 10°C. Chez les endothermes, le métabolisme cellulaire est capable de générer suffisamment de chaleur pour maintenir la température corporelle optimale dans un large panel de conditions ambiantes (thermogenèse adaptative ; Morrisson et al. 2008) tandis que chez les ectothermes, la relation est inverse, ce sont les variations thermiques de l'environnement qui vont partiellement influencer l'activité métabolique.

2. Influence de l'environnement

Les échanges thermiques entre le milieu interne (organisme) et le milieu externe (environnement) sont permanents et vont varier en fonction des conditions environnementales influençant les réponses de l'organisme.

2.1. Le gradient de température

La différence de température entre la température corporelle (T_b) et la température ambiante (T_a) s'exprime par un gradient de température, soit une **différence de température** par unité de distance. Ainsi, on parlera d'un fort gradient de température lorsque la différence entre la T_b et T_a sera élevée sur une faible distance (*e.g.* la surface de la peau et le milieu ambiant). La différence entre la T_b et la T_a influence l'intensité des flux thermiques allant systématiquement du milieu plus chaud vers le milieu plus froid (*i.e.* pertes ou gains de chaleur). Plus la différence de température sera importante, plus les échanges thermiques seront également importants pour tendre vers l'**équilibre**, c'est-à-dire un gradient de température nul. Chez les endothermes, l'activité de thermogénèse est principalement soutenue par la production métabolique de chaleur suivant le modèle de Scholander (Scholander et al. 1950) :

$$MR = C \times (T_b - T_a)$$

où le taux métabolique (MR) est l'équivalent du produit de la conductance thermique (C) par la différence entre la T_b et la T_a . Ainsi, les organismes endothermes sont capables de soutenir des variations importantes du gradient de température (*i.e.* plus important quand la température ambiante diminue) par thermogénèse, permettant le maintien d'une T_b stable.

Il existe une **zone de thermoneutralité**, au sein de laquelle les organismes endothermes sont soumis à des pertes de chaleur négligeables (*i.e.* gradient de température faible) ne nécessitant pas de travail métabolique supplémentaire pour maintenir leurs températures corporelles constantes (Hill et al. 2004) (Figure 2).

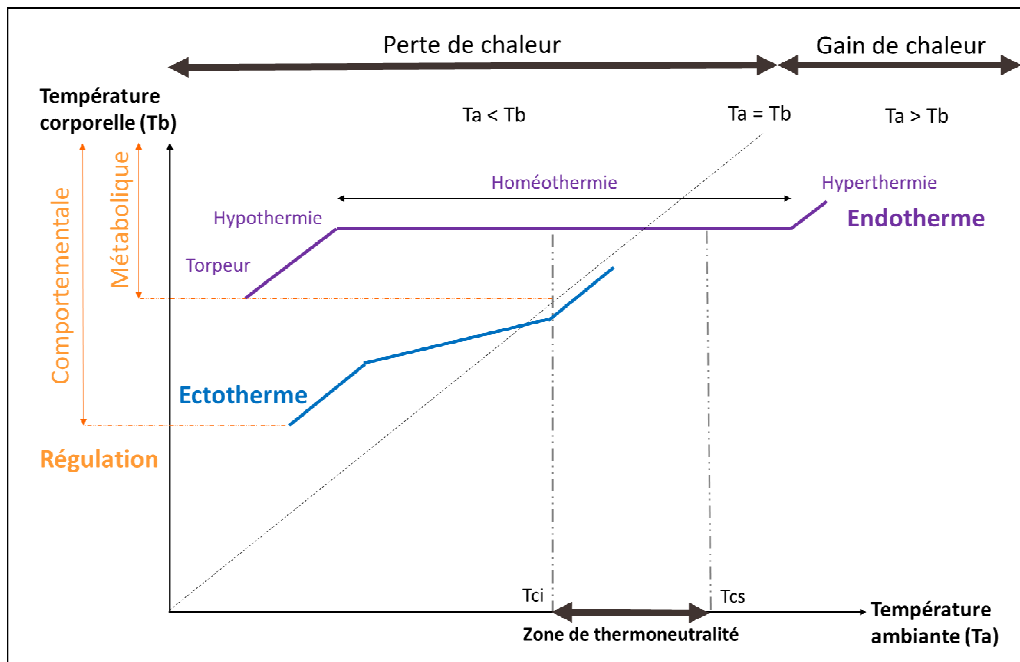


Figure 2 : Relation entre la température ambiante et la température corporelle chez les ectothermes et les endothermes

Au contraire, en dehors de cette zone, les mécanismes de production ou de dissipation de chaleur devront être mis en place afin de maintenir l'homéothermie (Seebacher 2009). Ainsi, la zone de thermoneutralité est limitée par une température critique **inférieure** (T_{ci}) correspondant à la température ambiante basse à partir de laquelle l'animal devra contrebalancer les pertes de chaleur. A l'inverse, la température critique **supérieure** (T_{cs}) définit la limite élevée de cette zone à partir de laquelle une dissipation de chaleur sera mise en place afin que la température corporelle n'augmente pas. Il est à noter que cette zone de thermoneutralité, ainsi que ses limites, varie en fonction des espèces et que la majorité des endothermes ont une $T_{ci} > 20^{\circ}\text{C}$ dans l'air. Ainsi, la plupart des endothermes rencontrent fréquemment des T_a inférieures à leur T_{ci} au cours de l'année, nécessitant l'activation de la thermogénèse (Figure 3). Il est aussi intéressant de noter que la gamme de variation des températures ambiantes est plus restreinte dans l'eau (de -2°C à $+35^{\circ}\text{C}$) que dans l'air (-60°C à $+80^{\circ}\text{C}$) (Gilles 2012).

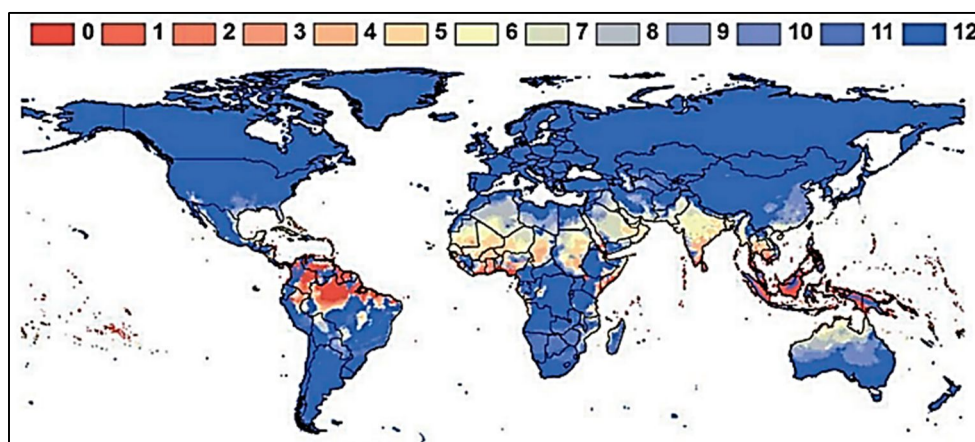


Figure 3 : Nombre de mois dans l'année où la moyenne minimale du mois est inférieure à la T_{ci} de 21°C (Canterbury 2002) pour une taille moyenne d'oiseau de 13g (Blackburn et Gaston 1994). La carte se base sur les données WorldClim (Hijmans et al. 2005) basées sur la moyenne minimum de température entre 1950-2000. Adapté de Humphries et Careau 2011

Bien que l'activité métabolique permette d'augmenter la production de chaleur, cette dernière ne peut cependant pas compenser les pertes de chaleur indéfiniment. Si la diminution de la température ambiante se poursuit en deçà d'un certain seuil, la production de chaleur ne sera alors plus suffisante pour maintenir la T_b et cette dernière diminuera, entraînant rapidement une hypothermie. L'**hypothermie** définit toute situation de diminution de la température corporelle de 2°C en dessous de la température de normothermie (Prinzinger et al. 1991; Reinertsen 1996). Le terme de **torpeur** est, quant à lui, employé dans le cas d'une diminution plus importante de la température corporelle qui conduit à un état d'inactivité et à une réduction du niveau de réaction face à un stimulus extérieur (Bligh et Johnson 1973). A l'inverse, si la température ambiante augmente au-delà d'un certain seuil, les organismes ne pourront plus dissiper suffisamment de chaleur, pour maintenir l'homéothermie, et leur T_b augmentera en conséquence. Si la température corporelle dépasse le seuil de normothermie, on parlera alors d'**hyperthermie**.

2.2 Les échanges thermiques

Des mécanismes physiques vont venir influencer les transferts thermiques, à savoir l'échange d'énergie thermique ou chaleur (calorie) entre deux corps à températures différentes. En milieu aérien, ces échanges de chaleur se feront par radiation, convection, conduction et évaporation (McNab 1974) toujours de la zone la plus chaude vers la zone la plus froide. En milieu aquatique, les transferts s'effectueront uniquement par conduction et convection (Figure 4).

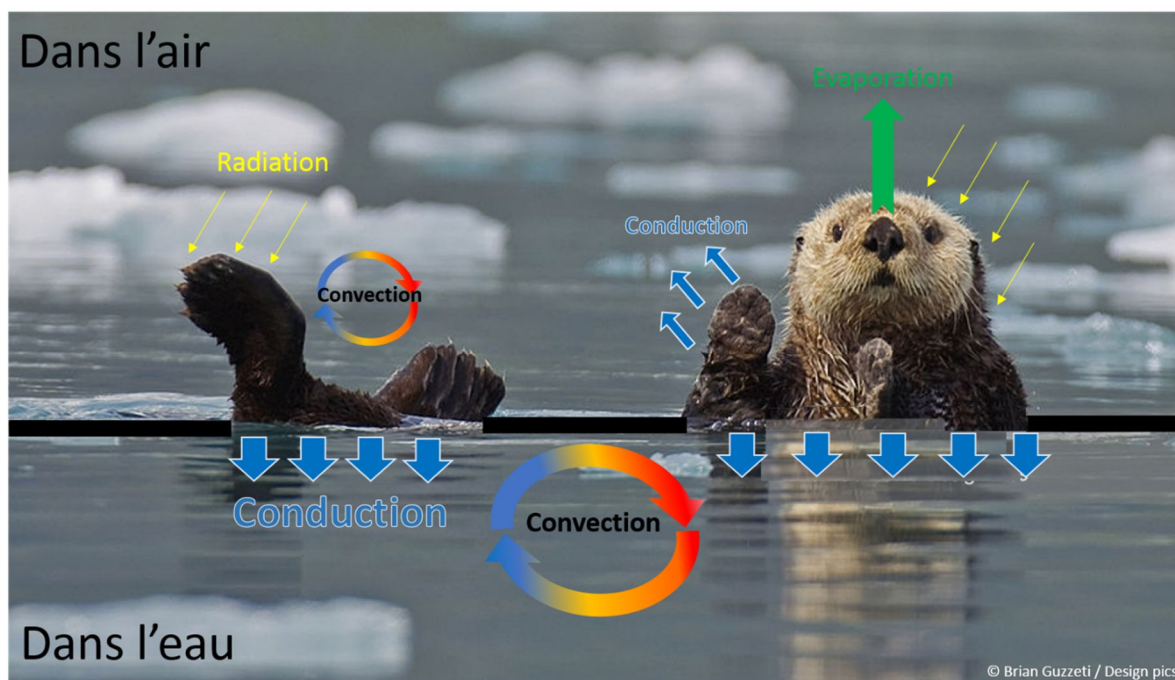


Figure 4 : Différence de type et d'intensité des transferts thermiques dans l'air et dans l'eau s'appliquant à la surface d'un organisme endotherme.

La **conduction** est un mécanisme de transfert thermique agissant sans déplacement de matière par opposition à la **convection** qui s'effectue entre deux milieux se déplaçant l'un par rapport à l'autre (Pérez et al. 1993). Par exemple, l'effet de refroidissement du vent est induit par la convection. L'eau présente une conductivité 24 fois supérieure à celle de l'air ($0.550 \text{ W.m.C}^\circ$ à 0°C) induisant une vitesse de transfert de chaleur bien plus importante (Figure 5). De même, le coefficient de transfert de chaleur convective est 20 à 80 fois plus élevé dans l'eau calme que dans l'air (Nadel et al. 1984). De façon générale, il a été mesuré que sur 14 espèces d'oiseaux marins, la conductance double au contact de l'eau et augmente de 4.8 fois lors de l'immersion complète des individus (de Vries et van Eerden 1995).

5/9 4/% Quelques chiffres

La conductance totale d'un cormoran huppé (*Phalacrocorax aristotelis*) est 3 fois plus élevée (de 2.05 à $6.64 \text{ W/m}^2.\text{C}^\circ$) dans une eau à 9°C que dans l'air à 14°C (Enstipp et al. 2007). Quant à la conductance des guillemots de Brünnich (*Uria lomvia*), elle augmente de 214% lors de l'immersion dans l'eau (Croll et McLaren 1993).

Considérant un animal dans son ensemble, la surface de la peau est la plus appropriée pour approfondir les échanges de chaleur avec le milieu ambiant. Ainsi, la **conductance thermique** est le produit de la surface totale de la peau (en m^2) et du coefficient de transfert thermique (en $\text{W.m}^2.\text{kg}$). D'une façon très générale, les ectothermes ont une peau pas ou peu isolée, ce qui leur permet un gain de chaleur rapide sous l'influence d'une source exogène. En revanche, les endothermes peuvent limiter les déperditions de chaleur périphérique grâce à une meilleure isolation thermique cutanée (Figure 1 et voir partie B2). Par la suite, seuls les mécanismes liés à la thermorégulation chez les espèces endothermes en environnement froid (*i.e.* soumis à des pertes de chaleur) seront abordés.

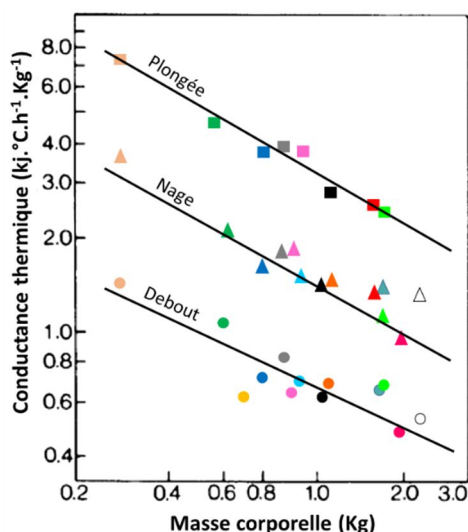


Figure 5 : Relation entre la masse corporelle (kg) et la conductance thermique en posture debout dans l'air (cercle), en posture de nage (triangle) et de plongée dans l'eau (carré) chez plusieurs oiseaux marins : *Anas crecca*, orange clair; *Mergus albellus*, vert; *Fulica atra*, jaune; *Bucelphala clangula*, bleu; *Aythya fuligula*, gris; *Anas platyrhynchos*, rose; *Podiceps cristatus*, cyan; *Aythya marila*, noir; *Mergus serrator*, orange; *Gavia stellata*, rouge; *Mergus merganser*, bleu clair; *Somateria mollissima*, vert clair; *Anser anser*, magenta; *Phalacrocorax carbo*, blanc. Adapté de de Vries et van Eerden 1995

B. Comment réduire les pertes de chaleur dans un environnement froid ?

La première étape pour lutter contre le froid chez les endothermes est d'en limiter les effets sur l'organisme en réduisant les pertes de chaleur. Les périodes d'expositions à des températures froides peuvent être considérées à plusieurs échelles de temps. Les espèces résidentes à des hautes latitudes et altitudes rencontrent fréquemment des périodes de basses températures (Figure 3). En revanche, les espèces des climats plus tempérés ne rencontrent ces périodes froides que lors de la "mauvaise saison", en hiver. Enfin, il arrive que les basses températures ne soient rencontrées que durant la nuit et/ou durant des périodes d'immersion dans l'eau (*e.g.* recherche alimentaire). En effet, ce dernier phénomène est lié à une augmentation de la conductivité et/ou à un décalage de la zone de thermoneutralité. Ainsi, les ajustements pour lutter contre le froid sont mis en place à plus ou moins long terme selon les espèces, en fonction de la durée d'exposition à ces conditions thermiques défavorables. Ces ajustements peuvent correspondre à de la régulation, de l'acclimatation, de l'habitation, de l'évitement, ou à plus long terme de l'adaptation.

1. L'évitement

Une façon de réduire les pertes de chaleur est de s'extraire physiquement d'un environnement froid, ou de s'éloigner de l'homéothermie durant les périodes thermiquement contraignantes. Ces phénomènes seront abordés sous un aspect comportemental bien qu'une régulation hormonale intervienne également.

1.1 La migration

La saison hivernale se caractérise par une détérioration des conditions climatiques, baisse des températures, ainsi qu'une diminution de la productivité des habitats. Cette saison représente alors un challenge pour les espèces endothermes avec une augmentation des coûts de thermorégulation (Dawson et O' Connor 1996; Broggi et al. 2004) face à une diminution de la disponibilité alimentaire et donc des ressources énergétiques (Weathers et al. 1999). Ainsi l'hiver représente une longue période de températures défavorables que de nombreuses espèces **évitent** par une migration automnale vers des zones plus chaudes (au sud pour les espèces de l'hémisphère Nord). Bien que cette migration puisse représenter un coût énergétique important, elle conduit les individus vers des régions aux conditions environnementales (*i.e.* climat/ressource) plus favorables à leur survie.

1.2 La torpeur et l'hibernation

Une deuxième 'solution logique' (Shmidt-Nielsen 1979) pour "éviter" les conditions hivernales sans migrer est de **suspendre** le maintien des températures élevées des homéothermes et d'économiser l'énergie en arrêtant toutes activités. Se faisant, les individus diminuent leur température corporelle de 4°C à 40°C (voir Ruf et Geiser 2015 pour revue) et entrent en **torpeur**. Ce mécanisme d'évitement est

connu pour être utilisé par sept ordres de mammifères (Geiser 2014) et quatre ordres d'oiseaux (Brigham 1992; Geiser et Ruf 1995), mais des études récentes révèlent son utilisation (jusqu'alors méconnue) par d'autres espèces (Ruf et al. 2015; Streicher et al. 2017). La durée des épisodes de torpeur peut aller de quelques heures à plusieurs semaines (Wang et Lee 2011). Une succession de ces épisodes, entrecoupés de période de réveil, peut représenter une phase du cycle annuel défini comme l'hibernation. Ainsi, l'économie d'énergie réalisée au cours de l'hibernation représente 80 à 90% de la dépense énergétique d'un individu qui serait resté à normothermie (Armitage et Woods 2003; Armitage et al. 2003; Geiser 2004). La torpeur journalière est un épisode ponctuel qui ne dure que quelques heures et dont la baisse de T_b est souvent moins importante (Figure 6A) que celle observée lors de l'hibernation (Ruf et Geiser 2014; Figure 6B). De plus, l'évitement est double car bien que la température corporelle et la durée des torpeurs soient affectées par les températures ambiantes (Bierber et Ruf 2009; Stawski et Geiser 2010), la température à l'intérieur des hibernaculums demeure généralement supérieure aux températures extérieures (Watts et Jonkel 1998). De plus, il est à noter que la torpeur ainsi que l'hibernation sont des réponses comportementales d'évitement des conditions défavorables, régulées par des **mécanismes physiologiques** tels que les processus hormonaux et la réduction de l'activité métabolique.

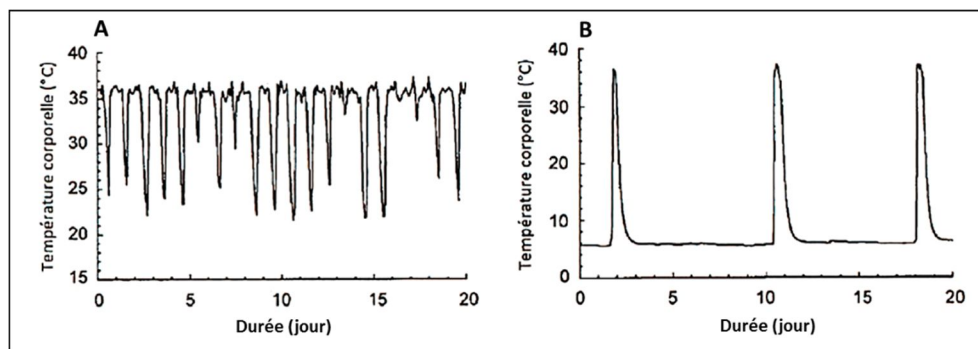


Figure 6 : Torpeurs journalières d'un hamster Sibérien (*Phodopus sungorus*) (A) et succession de torpeurs au cours de l'hibernation d'un spermophile à manteau doré (*Spermophilus lateralis*) (B) au milieu de l'hiver. Adapté de Ruby 2003

De façon similaire, certaines espèces utilisent des cavités faites par excavation dans des troncs d'arbres ou dans la neige (Hogstad 1989; Cooper 1999) pour limiter les coûts associés à des températures extérieures froides. En effet, ces petits espaces réduisent la perte de chaleur convective et radiative et permettent à l'individu d'élever la température ambiante de la cavité (Andreev 1980; Walsberg 1986). Ces espaces à demi-fermés protègent aussi l'individu contre les précipitations et leurs utilisations permettent de réduire les dépenses énergétiques liées à la thermorégulation en période froide.

A plus courte échelle de temps, l'évitement peut également s'observer au sein d'une journée. Ainsi certaines espèces résidentes sélectionnent, durant les journées hivernales froides, des micro-habitats à l'abri du vent permettant de **réduire** les pertes de chaleur par convection (Marsh et Dawson 1989, Scholander et al. 1950; Wolf et al. 1996), et/ou exposés au soleil **augmentant** le gain de chaleur par radiation (Doucette et Geiser 2008; Geiser et Drury 2003).

Quelques chiffres

La mésange boréale (*Poecile montanus*) peut économiser jusqu'à 38% des coûts de thermorégulation nocturne en se réfugiant dans une cavité (Cooper 1999).

1. 3 Le regroupement

La réduction des pertes de chaleur face aux températures froides peut également passer par un regroupement des individus que l'on appelle **thermorégulation sociale**. La thermorégulation sociale est définie par "le comportement qui conduit à la formation et au maintien d'un groupe d'animaux" (Alberts 1978) et plus récemment par "un regroupement d'individus les uns contre les autres afin de se réchauffer" (Canals et al. 1998). La thermorégulation comportementale a été observée chez de nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères (voir Gilbert 2006 pour revue) aussi bien chez des nouveau-nés, des jeunes que chez des adultes. Ce comportement peut notamment réduire les coûts de thermorégulation (Gilbert et al. 2010) et améliorer la survie des individus (Hart 1971). Cette économie d'énergie est principalement liée à la constitution d'un regroupement d'individus serrés formant un plus grand volume compact, venant diminuer efficacement le ratio surface/volume et réduire la surface corporelle d'exposition au froid (Arnold 1990; Canals et al. 1997; Boyles et al. 2008).

Quelques chiffres

Durant l'hiver austral, les manchots empereurs mâles se regroupent en « tortue » (Cendrions 1952) au sein de laquelle la température ambiante peut augmenter jusqu'à 37.5°C alors que les températures environnantes sont de -20°C (Gilbert et al. 2006).

Ces regroupements peuvent s'étendre sur des périodes plus ou moins longues selon les espèces et les conditions environnementales. Ainsi, les perdrix grises (*Perdrix perdrix*) se regroupent uniquement durant les nuits hivernales dans des terriers de neige (Putala et al. 1995). Chez les espèces marines, ce comportement a pu être observé à terre notamment chez l'otarie de Californie (*Zalophus californianus*) et fournit les mêmes avantages que pour les espèces terrestres (Liwanag et al. 2014). Il est également possible de voir un cumul des stratégies avec des espèces évitant la saison hivernal en hibernant à plusieurs dans des terriers (*i.e.* thermorégulation sociale) afin de **diminuer** les dépenses énergétiques et d'**augmenter** la survie de chacun (Boyles et al. 2008; Arnold et al. 1991; Armitage 1999; Arnold 1990).

2. Le ratio surface/volume

De nombreuses études ont montré l'importance du ratio surface/volume dans la thermorégulation. En effet, lorsqu'il augmente en taille, un corps va moins rapidement augmenter en surface (au carré) qu'en volume (au cube). Ainsi, les déperditions de chaleur périphériques sont proportionnelles à la surface corporelle tandis que la production de chaleur est, quant à elle, proportionnelle au volume corporel (*i.e.* masse des organes métaboliquement actifs). Ainsi le rapport surface/volume élevé des petites espèces favorisera les pertes de chaleur comparativement à des espèces plus grandes (Aschoff 1981).

Deux règles découlent des contraintes induites par ce ratio :

-La première règle, la règle de **Bergmann**, stipule que la taille des espèces de vertébrés endothermes sera plus grande dans les régions froides (Bergmann 1847). Cette règle se base sur l'avantage sélectif procuré par le faible ratio surface/volume des grandes espèces, limitant les pertes de chaleur comparativement aux petites espèces (Blackburn et al. 1999). Elle a pu être vérifiée dans des études interspécifiques chez des espèces de mammifères et d'oiseaux terrestres (Meiri et Dayan 2003; Ashton 2002). Une étude plus récente a revisité cette règle de façon détaillée et a confirmé la même relation chez les espèces de mammifères marins (cétacés et pinnipèdes) (Torres-Romero et al. 2016).

-La seconde règle, la règle d'**Allen**, stipule que chez les endothermes, la taille relative des extrémités (*i.e.* membres, oreilles, bec) sera plus faible dans les environnements froids afin de réduire les coûts de thermorégulation (Allen 1877). En effet, la plupart des endothermes possède des zones corporelles moins bien isolées jouant le rôle de « fenêtres thermiques » (voir Figure 8) et favorisant les échanges de chaleur avec l'environnement (Speakman et Ward 1998). Or, la surface de ces organes périphériques pourrait être soumise à une pression de sélection plus ou moins importante en fonction des conditions environnementales.

3. L'isolation

Plus la peau sera épaisse et de bonne qualité isolante (conductibilité thermique), plus sa conductance thermique sera faible, diminuant les risques de pertes de chaleur corporelle. Ainsi, deux catégories d'isolants sont présentes chez les endothermes : les phanères (*i.e.* poils et plumes) et la graisse sous-cutanée.

3.1 Les phanères

Comme déjà dit plus haut, l'air est l'un des composants le plus isolant et facilement disponible (conductance thermique = 0.025 W.m.K^{-1} , contre 0.550 pour l'eau). Les propriétés isolantes des phanères, poils chez les mammifères et plumes chez les oiseaux, dépendent principalement de leur **densité**, c'est à dire de leur capacité à emprisonner un grand volume d'air et à repousser l'eau. Afin de garantir une meilleure efficacité de l'isolation, les phanères doivent être adaptés à l'environnement rencontré par les individus. Ainsi, une récente étude démontre que la structure des plumes dépend de l'habitat dans lequel évoluent les oiseaux (Pap et al. 2017). Des ajustements peuvent également se mettre en place, à plus court terme, sur quelques mois. Par exemple, la **mue** automnale permet de mettre en place une isolation mieux adaptée aux conditions hivernales.

Quelques chiffres

La mue automnale augmente de 104% la masse du plumage hivernale comparativement au plumage estival de la mésange de Gambel (*Poecile gambeli*) (Cooper 2002).

D'autres ajustements aux conditions climatiques peuvent se faire de façon temporaire, telle que la **piloérection** (Figure 7). En effet, sous l'impulsion des muscles arrecteurs, les phanères se redressent et peuvent emprisonner un plus grand volume d'air, diminuant ainsi immédiatement la conductance thermique périphérique.

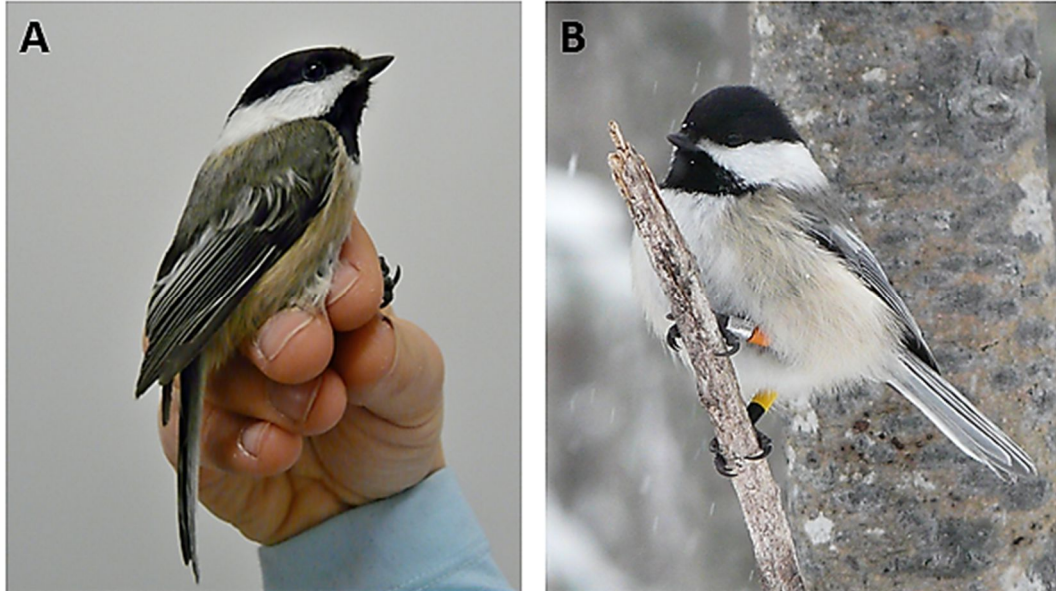


Figure 7 : Comparaison de la piloérection de la mésange à tête noire en fonction de la température ambiante, en l'absence de piloérection à une Ta de 20°C (A) et en présence de piloérection à une Ta de -6.6°C (B). Adapté de Lewden et al. 2017

Les phanères des espèces marines, qui sont fréquemment immergées dans l'eau, doivent être d'autant plus adaptés à limiter les pertes caloriques. Ainsi, les espèces aquatiques présentent généralement un pelage/plumage plus isolant (Box 2) et surtout plus **imperméable**, que les espèces terrestres. Le pouvoir hydrophobe des phanères est lié principalement à leur densité et à la façon dont ils se superposent étroitement les uns sur les autres pour contrebalancer la pression hydrostatique et limiter les risques d'infiltration de l'eau, à la manière des tuiles d'un toit.

Cependant, il est surprenant de noter que toutes les espèces marines n'ont pas systématiquement une couverture imperméable. Ainsi, le grand cormoran (*Phalacrocorax carbo*), qui est une espèce plongeuse, ne présente un plumage que partiellement imperméable (Grémillet et al. 2005). Ce plumage nécessite alors un temps de séchage entre chaque plongée afin de restaurer sa capacité isolante. En revanche, cette semi-perméabilité réduit la flottabilité des individus et permet à ces derniers d'effectuer des descentes plus rapides et donc d'accroître le temps passé en profondeur à s'alimenter (Quintana et al. 2007). De façon encore plus paradoxale, certaines espèces d'oiseaux marins, telle la frégate (*Fregata magnificiens*), ne possèdent pas de plumage imperméable ni même semi-imperméable. En fait, le corps des frégates ne touche que rarement la surface de l'eau, ces dernières possédant un bec adapté à la capture des proies en vol.

BOX 2 : Structure isolante d'un mammifère aquatique et d'un oiseau antarctique

La loutre de mer (*Enhydra lutris*) est l'une des plus petites espèces de mammifères marins, répartie le long des côtes de l'Alaska jusqu'en Californie. Cette large aire de distribution conduit l'espèce à rencontrer des températures bien en deçà de sa zone de thermoneutralité. Elle possède le pelage le plus dense de la classe des mammifères (Tarasoff 1973) avec entre 26 000 à 165 000 poils/cm² selon les régions du corps (Williams et al. 1992). La densité du pelage mais également l'orientation des poils fournissent aux individus une isolation de qualité indispensable à leur survie en mer (Williams et al. 1992). Ainsi de nombreuses études comparatives sur la morphologie du pelage de la loutre de mer (Liwanag 2008; Kuhn 2009; Figure B) s'accordent sur la capacité optimale d'isolation périphérique de cette espèce. En revanche, l'entretien de ce pelage à un coût important : il représente 12 à 40% de l'activité journalière, ce qui augmente le métabolisme de repos de 64% (Yeates et al. 2007).

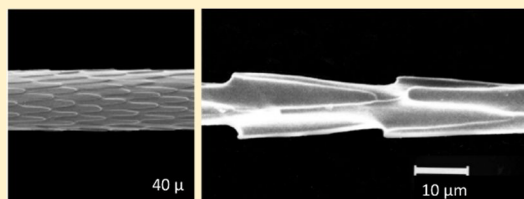


Figure B: Microstructure de la cuticule des poils de la loutre de mer observée par micrographie électronique. Adapté de Liwanag 2008 et Kuhn 2009

Avec une répartition circumpolaire antarctique, le manchot empereur (*Aptenodytes forsteri*) affronte quant à lui des températures ambiantes allant jusqu'à -40°C dans l'air et jusqu'à -1.8°C dans l'eau (point de congélation de l'eau de mer). La survie des individus est alors assurée en grande partie par l'épaisseur et la morphologie du plumage (Rutschke 1965) qui assure entre 80 et 90% de l'isolation (Jarman 1973; Le Maho et al. 1976). Ce plumage est composé de plumes courtes et raides permettant un bon recouvrement et le rendant entièrement imperméable (Dawson et al. 1999). De plus, le nombre de plumes peut aller jusqu'à 46/cm² (Lowe 1933; Stonehouse 1970; Dawson et al. 1999) assurant une isolation de qualité. En effet, le manchot empereur présente un plumage complexe composé de 12 types de plumes (Williams et al. 2015). En position ventrale et dorsale, chaque plume est entourée de 9 plumules (Figure C1). Ce sont ces plumules qui sont la principale source d'isolation avec une densité 4 fois supérieure aux autres plumes (Williams et al. 2015). De plus, chaque plume est surmontée d'une filoplume à sa base, d'aspect duveteux (Figure C2, Tollu 1988), venant encore améliorer la capacité d'isolation.

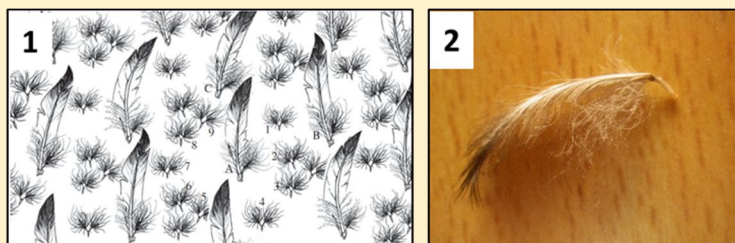


Figure C : Organisation des plumes entourées par des plumules à la surface de la peau ventrale d'un manchot empereur (1). Chaque plume est également surmontée d'une filoplume, d'aspect duveteux, accroché par un court rachis (2). Adapté de Williams et al. 2015

3.2 Le tissu adipeux sous-cutané

La graisse sous-cutanée est un isolant thermique dont l'épaisseur varie en fonction de la condition corporelle des individus. Elle peut être accumulée en grande quantité chez les espèces des régions polaires, comme c'est le cas chez les phoques où l'épaisseur relative de la couche de graisse sous-cutanée représente 58% de la surface en coupe transversale, contre 42% de la surface occupée par la masse viscérale. De plus, contrairement aux phanères, ce tissu adipeux est **vascularisé**, ce qui permet d'ajuster les transferts de chaleur convectifs avec l'environnement par des **ajustements physiologiques** du flux sanguin à travers ce tissu.

En l'absence de flux sanguin, *i.e.* **vasoconstriction**, le tissu adipeux va jouer, de façon mécanique, son rôle d'isolant thermique, limitant les pertes de chaleur entre l'organisme et son environnement. A l'inverse, la perfusion sanguine de ce tissu, *i.e.* **vasodilatation**, augmentera la température du tissu et donc les échanges de chaleur entre ce tissu et l'environnement. Notons que ces modulations peuvent ne concerner qu'une partie bien précise du corps, augmentant encore la finesse des ajustements. Ces zones sont, comme indiqué précédemment, qualifiées de "**fenêtres thermiques**". On les retrouve dans des conditions bien précises, comme chez le phoque du Groenland (*Pagophilus groenlandicus*) après une période de nage intense (Figure 8).

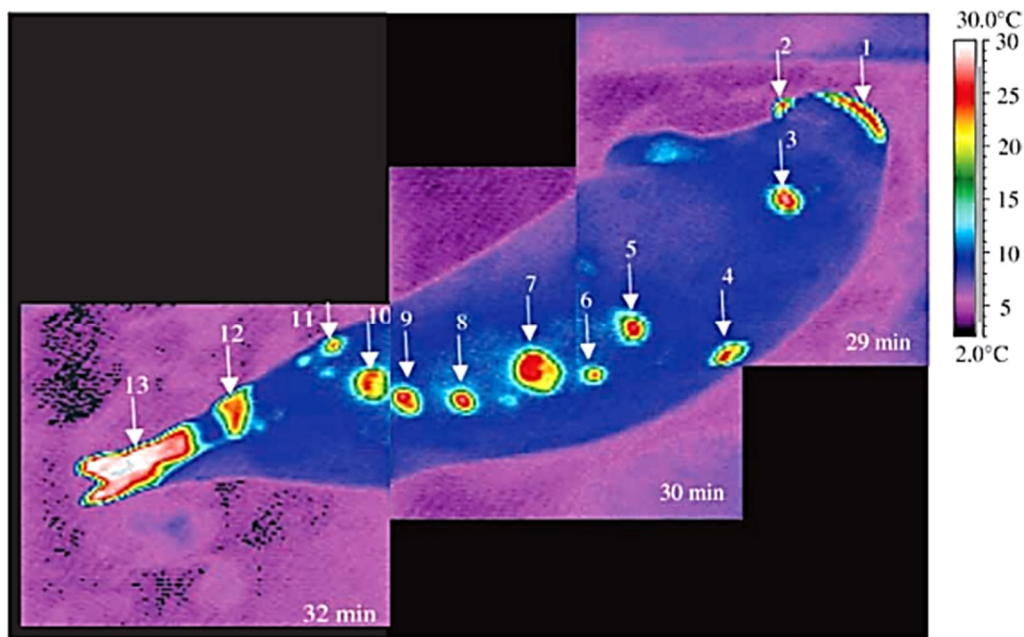


Figure 8 : Photos infra-rouge de « fenêtres thermiques » (n=13) permettant la dissipation de la chaleur d'un phoque du Groenland après 29, 30 et 32 minutes à terre succédant une période d'immersion dans l'eau. Adapté de Mauck et al. 2003

3.3 Vasomotricité sanguine des tissus périphériques

La vasomotricité sanguine permet un ajustement de la conductance thermique au niveau des tissus périphériques qui se trouvent directement sous la surface de la peau ; elle influence ainsi **la température de surface** des individus. En effet, le changement rapide de perfusion sanguine périphérique permet de modifier le gradient de température entre la peau et le milieu ambiant et donc d'influencer les pertes de chaleur par conduction et convection. Ainsi les extrémités, privilégiées en raison de leur ratio surface/volume élevé, présentent une **anatomie vasculaire** particulièrement complexe qui joue un rôle important dans la thermorégulation. Lorsque le flux sanguin est réduit en périphérie, *i.e.* vasoconstriction périphérique, la température cutanée diminue, réduisant le delta température peau-ambiance et donc les pertes de chaleur et réciproquement lors d'une vasodilatation de ces extrémités (Prévost et Sapin-Jaloustre 1964). Chez les oiseaux, le bec et sa vascularisation sous-cornée est un bon exemple de cette adaptation des extrémités à des fins de thermorégulation (Box 3).

Box 3 : Le bec, une surface d'échange efficace chez les oiseaux

La taille du bec a depuis longtemps été mise en relation avec la niche thermique des espèces d'oiseaux (Snow 1954; voir Tattersall et al. 2016 pour revue) et de façon plus complexe avec le mode d'utilisation de leur habitat (Greenberg et al. 2012; Luther et Greenberg 2013). De même, une étude récente suggère un possible effet d'une modification des conditions environnementales au cours des dernières décennies sur la taille du bec chez les juncos ardoisés (*Junco hyemalis*) (Labarbera et al. 2016), soulignant des effets possibles même à courte échelle spatio-temporelle (Danner et Greenberg 2015).

De façon simplifiée, et en accord avec la règle d'Allen, les espèces ayant un plus grand bec ont majoritairement une aire de répartition dans des climats plus chauds. Mais de façon plus caractéristique d'une adaptation thermique, la partie kératinisée externe du bec, la 'rhamphotèque', est particulièrement vascularisée (Lucas et Stettenheim 1972) et représente une zone privilégiée d'échange thermique chez ces espèces (Hagan et Heath 1980). Cela a été démontré récemment avec des images thermiques (Tattersall et al. 2009; Greenberg et al. 2012; Van de Ven et al. 2016; Figure D).

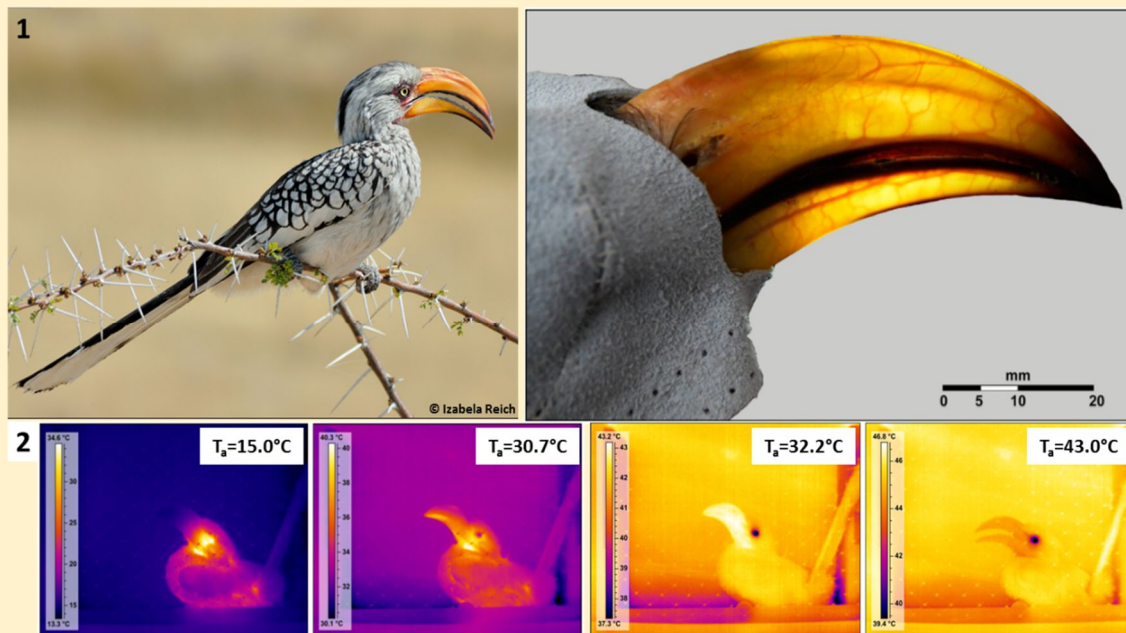


Figure D : Degré de vascularisation chez le calao leucomèle (*Tockus leucomelas*) (1) utilisé comme surface dissipation de chaleur en présence de températures ambiantes élevées (2). Adapté de Van de Ven et al. 2016

Une hypothèse alternative suggère plutôt que la pression de sélection exercée sur la taille du bec ferait intervenir la capacité de rétention de la chaleur pendant les périodes plus froides, en hiver (Luther et Greenberg 2014). Ainsi, faisant face à des températures inférieures à leur zone de thermoneutralité et en période de jeûne, des canetons de barbarie (*Cairina moschata*) expriment une vasoconstriction périphérique au niveau du bec (Tattersall et al. 2016 ; Figure E).

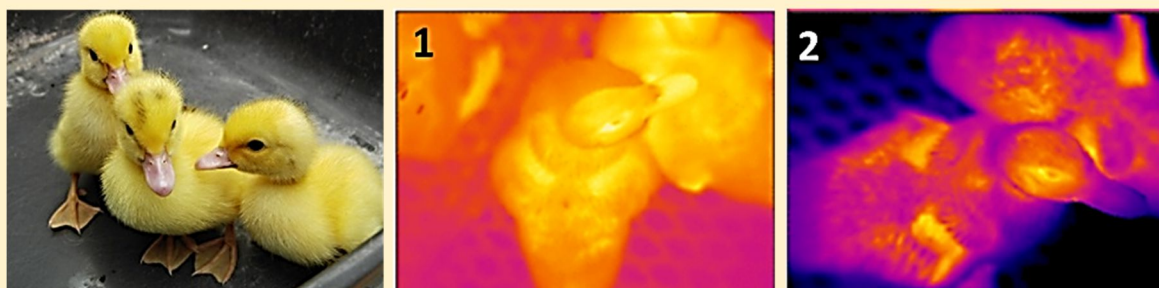


Figure E : Perfusion périphérique normale au niveau du bec à thermoneutralité (1) et réduite en conditions environnementales froides (2). Adapté de Tattersall et al. 2016

Dans le cas d'une exposition au froid, deux modalités permettent d'éviter le refroidissement du sang allant aux extrémités :

- La première, nous l'avons vu dans le cas de la peau, est de limiter la perfusion sanguine des extrémités par un mécanisme de vasoconstriction et/ou de shunt artério-veineux en région proximale de l'extrémité.

- La deuxième est de réduire la différence de température artério-veineuse, donc les pertes caloriques sans rendre les extrémités ischémiques, c'est à dire sans diminution drastique du débit sanguin périphérique, grâce à des échangeurs thermiques à **contre-courant** (Scholander et Schevill 1955). Ainsi au niveau des pattes des oiseaux marins, des nageoires des mammifères marins et des ailerons des manchots, de telles anastomoses artério-veineuses ont été mises en évidence. Ces structures permettent de transférer la chaleur du sang artériel directement au sang veineux avant que le sang artériel n'atteigne les extrémités pour distribuer oxygène et nutriments (Trawa 1970, Figure 9).

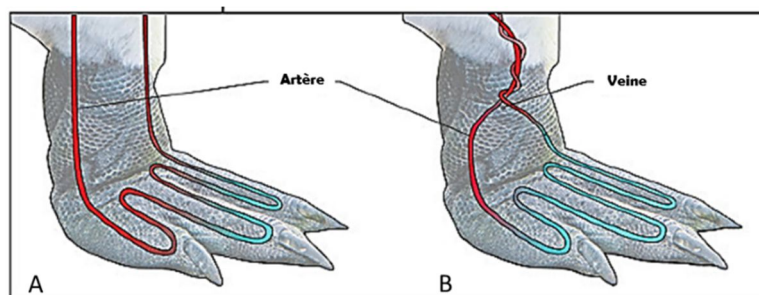


Figure 9: Flux sanguin sans (A) et avec (B) un système de contre-courant permettant de limiter les pertes de chaleur au niveau des extrémités. La couleur rouge indique des températures chaudes tandis que la couleur bleue correspond à des températures froides

C. Environnement froid : Augmenter la production de chaleur

En milieu froid et/ou thermo-conducteur, la principale activité de thermorégulation alternative (et complémentaire) à la lutte contre les pertes de chaleurs périphériques est la thermogénèse. Cette augmentation de la production de chaleur vise à compenser les pertes caloriques résiduelles. En effet, en dessous de leur zone de thermoneutralité, les espèces endothermes devront produire de la chaleur pour maintenir leur température corporelle stable (si telle est la stratégie adoptée). Cette production de chaleur supplémentaire implique une augmentation de l'activité métabolique, via différentes grandes fonctions (*e.g.* locomotion, digestion) qui ne relèvent pas forcément et directement d'un objectif de thermorégulation au sens strict.

1. Activité métabolique

Les réactions métaboliques, quelles qu'elles soient, ont un rendement énergétique de l'ordre de 25% : cela signifie que 75% de ces réactions est dissipé sous forme de chaleur (Richard et al.1998). Ainsi, l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) est la réaction biochimique majoritairement responsable

de la production de chaleur. L'ATP est principalement synthétisée par la mitochondrie, un organe cellulaire. Cette organe peut fonctionner de façon « couplée », c'est-à-dire produire une grande quantité d'ATP pour soutenir l'activité des cellules et donc des tissus (activité métabolique), ou de façon « découplée » via l'activation de protéines découplantes, afin de favoriser la production de chaleur (au détriment de l'ATP). Dans tous les cas, la mitochondrie est une source de production de chaleur. Ainsi, cette chaleur constitue un "déchet" métabolique d'autant plus important que les cellules ont une activité importante, par simple effet Q_{10} . Le fonctionnement minimal d'un organisme adulte au repos et à jeun s'exprime dans la zone de thermoneutralité et correspond au **métabolisme de base** (BMR pour "*basal metabolic rate*") (Daan et al. 1990; McKechnie 2008; Figure 10). En effet, cette production de chaleur est incompressible et représente l'activité minimale du métabolisme pour l'entretien des fonctions de base de l'organisme. Globalement cette chaleur est produite par les organes en fonction de leur niveau d'activité. Le foie et le système digestif contribuent à 40% du BMR et les muscles squelettiques à 20% (dont 10% pour les muscles respiratoires) du BMR (Richard et al. 1998). Cependant ces chiffres peuvent varier de façon très importante selon les espèces et en fonction de la saison considérée. Lorsqu'un animal est exposé à des températures ambiantes inférieures à la zone de thermoneutralité thermique, les mécanismes de réduction des pertes de chaleur sont alors insuffisants pour maintenir la température corporelle stable. Ainsi, on observe une augmentation de la thermogénèse pour compenser les pertes thermiques. Il en résulte une augmentation compensatoire de la production de chaleur, le métabolisme dépassant alors le BMR (Cooper et Swanson 1994; Piersma et al. 1995; Bush et al. 2008) (Figure 10).

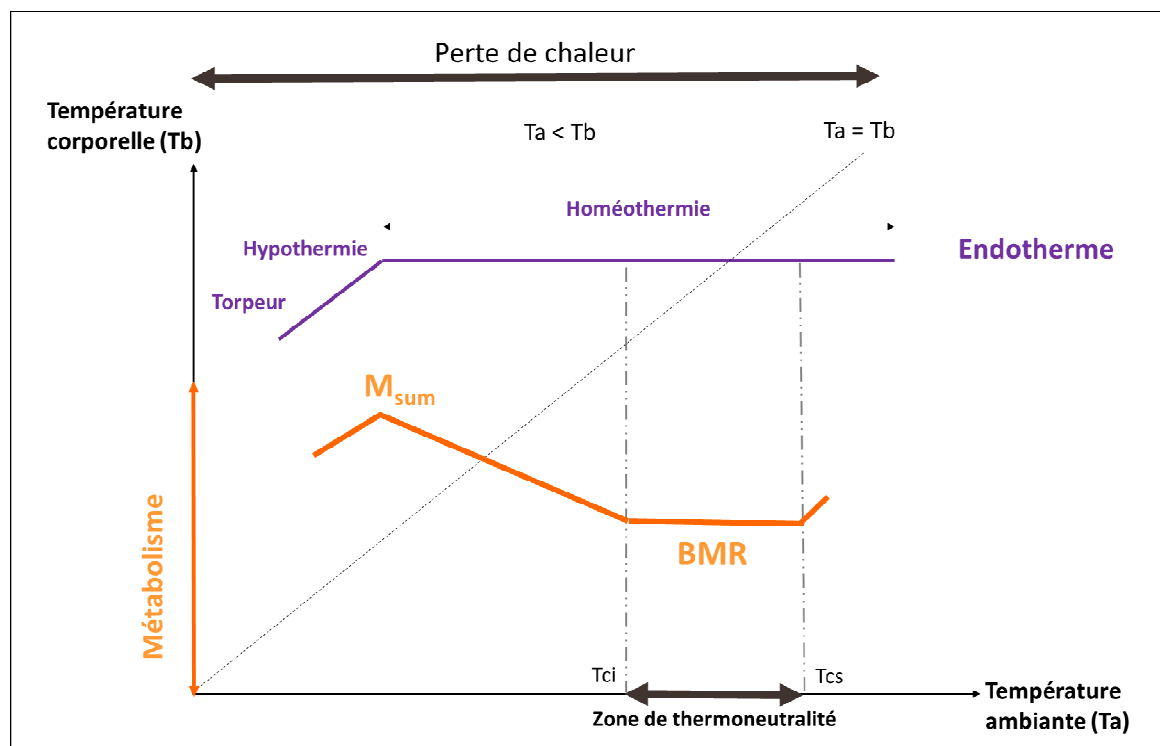


Figure 10 : Relation entre la température corporelle et le métabolisme chez les endothermes. En dessous de la T_{ci} l'activité augmente avec la production de chaleur atteignant la capacité thermogénique maximale (M_{sum}) au-delà de laquelle la température corporelle diminuera.

Rappelons que, de par ses propriétés physiques, l'eau représente un élément qui engendre des pertes de chaleur plus importantes que l'air, induisant une augmentation de la thermogénèse. Ainsi, cette nécessité de production de chaleur s'exprime à travers un métabolisme en moyenne 2 fois supérieur lorsque les oiseaux sont dans l'eau comparativement à lorsqu'ils sont dans l'air (Table 1). En revanche, l'augmentation de la production de chaleur d'un organisme ne peut pas se faire à l'infini. Ainsi, la production de chaleur peut augmenter jusqu'au seuil défini comme la "**capacité thermogénique maximale**" (M_{sum} , pour le métabolisme de sommet ou "*summit metabolic rate*") (Figure 10). Au-delà de ce seuil, la production de chaleur ne sera plus suffisante au maintien de la température corporelle qui diminuera, menant rapidement vers une hypothermie et la mort.

Table 1 : Comparaison du métabolisme de base dans l'air et l'eau chez plusieurs espèces d'oiseaux marins. Adapté de Ponganis 2015

Nom d'espèce		Masse (kg)	RMR air	RMR eau	Air/eau	Auteurs
Guillemot de Troïl	<i>Uria aalge</i>	800	6.52	7.3	1.12	Bryan et Furness 1995; Croll et McLaren 1993
Guillemot de Brünnich	<i>Uria lomvia</i>	81	16.14	8.84	0.55	Gabrielsen et al. 1988; Hawkins et al. 1997. Croll and McLaren 1993
Starique de Cassin	<i>Ptychoramphus aleuticus</i>	160	10.22	12.14	1.19	Richman et Lovvorn 2011
Harelde boréale	<i>Clangula hyemalis</i>	490	5.6	5.59	1.00	Jenssen et Ekker 1989
Cormoran impérial	<i>Phalacrocorax atriceps</i>	2 390	5.81	9.02	1.55	Bevan et al.1989
Grand cormoran	<i>Phalacrocorax carbo</i>	2 560	3.1	14.1	4.55	Schmid et al. 1995
Cormoran à aigrettes	<i>Phalacrocorax auritus</i>	2 090	4.79	12.75	2.66	Enstipp et al. 2006; Enstipp et al. 2008
Cormoran huppé	<i>Phalacrocorax aristotelis</i>	1 650	5.02	19.37	3.86	Enstipp et al. 2005; Bryant and Furness 1995
Manchot royal	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	10 810	2.57	4.53	1.76	Culik et al. 1996; Fahlman et al. 2005; Halsey et al. 2007
Manchot Adélie	<i>Pygoscelis adeliae</i>	4 000	3.7	8.36	2.26	Chappel et Souza 1988; Culik et Wilson 1991
Manchot de Humbolt	<i>Spheniscus humboldti</i>	3 600	3.77	3.99	1.06	Butler et Woakes 1984; Luna-Jorquera et Culik 2000; Hui 1988
Manchot Pygmée	<i>Eudyptula minor</i>	1 000	4.72	8.05	1.71	Baudinette et Gill 1985; Green et al. 2006; Stahel et Nicol 1982; 1988
Moyenne		2470	5.99	9.5	1.94	

1.1 Thermogénèse de frisson

La thermogénèse de frisson correspond à une augmentation du tonus musculaire qui constitue une **réponse spécifique** à un stress thermique froid. Cette thermogénèse représente la première source de chaleur endogène chez tous les vertébrés endothermes (Hohtola 2002). Il s'agit de contractions continues des muscles squelettiques antagonistes qui, étant asynchrones, n'induisent pas de mouvement de déplacement squelettique (Hohtola 2004). L'activité musculaire de frissonnement est principalement assurée chez les oiseaux par les muscles pectoraux fortement développés chez ces organismes (Calder et King 1974). Le frisson thermique est 'La' réponse au froid commune chez les mammifères et les oiseaux (Jansky 1998; Bicudo et al. 2002; voir Bicego et al. 2007 pour revue). Ces contractions restent relativement modérées et sont compatibles avec le maintien du frisson thermique dans le temps (4 fois le BMR au plus, Block 1994; Marjoniemi 2001).

1.2 Thermogénèse sans frisson

La thermogénèse sans frisson est une régulation chimique sans activité électromyographique qui a été démontrée pour la première fois chez le rat acclimaté au froid, pour lequel il était observé une augmentation du métabolisme au froid sans réaction motrice de la musculature (Cottle et Carlson 1954).

Chez les **mammifères**, le site préférentiel de la thermogénèse sans frisson (NST pour "*non-shivering thermogenesis*") est le tissu adipeux brun (BAT pour "*brown adipose tissue*"), mais elle peut également se mettre en place au niveau des muscles (Jansky et Hart 1963). Le BAT est notamment présent chez les petits mammifères (dont les hibernants) et les nouveau-nés. Comparativement au tissu adipeux blanc, ce dernier possède un grand nombre de mitochondries lui conférant son pouvoir thermogène. En effet, les membranes mitochondriales du BAT contiennent une protéine découplante, l'UCP-1 (pour *Uncoupling Protein 1*). En découplant la chaîne respiratoire mitochondriale, elle permet de détourner une partie de la force proton-motrice de la production d'ATP (Nicholls et Rial 1999 ; voir Cannon et Nerdergaard 2004 pour revue). Ce tissu est donc particulièrement efficace en termes de production de chaleur et participe à hauteur de 60% à l'augmentation du métabolisme pendant la sortie des phases de torpeur chez les mammifères hibernants (voir Jansky 1973 pour revue). En revanche, le BAT n'est pas présent chez les oiseaux (Barré et al. 1986).

Sans BAT, la thermogénèse sans frisson s'effectue de façon prépondérante au niveau des muscles squelettiques chez les **oiseaux** (Hohtola 2004) mais également au niveau du foie (Bedu et al. 2001). Cette production de chaleur sans frisson a été observée chez plusieurs espèces d'oiseaux (Barré et al. 1985; Duchamp et al. 1991; voir Duchamp et al. 1999 pour revue), dont les manchots (voir Matériel et Méthodes ; Duchamp et al. 1989; Skora 1994). Deux mécanismes principaux ont été mis en évidence lors de la NST même si les processus impliqués sont toujours sujet à controverse. Un premier mécanisme implique, sous l'effet de la protéine av-UCP (pour « *avian-UCP* ») (Raimbault et al. 2001) similaire à celle des mammifères, un découplage des oxydations phosphorylantes mitochondriales (Skulachev et Maslov 1960), tandis qu'un deuxième mécanisme implique un cycle futile de calcium (Dumonteil et al. 1993; 1995). De plus, une étude suggère que la coexistence de ces mécanismes pourrait être possible (Roussel et al. 1998).

2. Autres activités productrices de chaleur

L'activité physique n'échappe pas à la règle de la perte de rendement de toute activité métabolique. Ainsi l'activité physique est coûteuse en énergie (*i.e.* augmentation du métabolisme ; Figure 11) et produit de la chaleur.

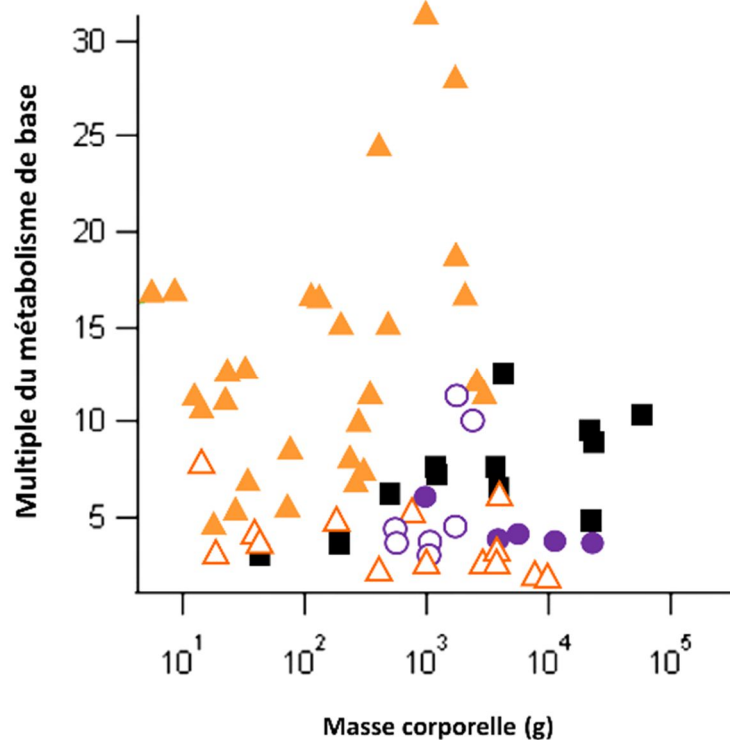


Figure 11 : Coût de l'activité représenté en multiple du métabolisme de base pour soutenir l'activité des oiseaux en fonction de la masse corporelle. Le vol battu (triangle orange) et le vol plané (triangle blanc), la course (carré noir) et la plongée chez les espèces à propulsion par les ailes (rond violet) et propulsion par les pieds (rond blanc). Adapté de Elliot et al. 2013

La perte de rendement énergétique de l'exercice musculaire peut être utilisée comme un avantage pour diminuer le coût métabolique de la thermorégulation, le premier se substituant partiellement ou entièrement au second : cela s'appelle le phénomène de "**substitution des coûts**" (Paladino et King 1984; Webster et Weathers 1990; Zerba et Walsberg 1992). Ainsi, si la production de chaleur dissipée lors de l'activité est égale ou supérieure au coût énergétique de thermogénèse de régulation et que cette chaleur peut se substituer pleinement à la thermorégulation, l'activité dans le froid sera en quelque sorte 'gratuite'. Bien que cette substitution des coûts de thermorégulation par le biais d'autres grandes fonctions (*e.g.* locomotion, digestion) ait été identifiée depuis longtemps (Lefèvre 1911), les études restent parcimonieuses et sous-estiment l'importance de l'influence qu'elle pourrait avoir sur la physiologie, les stratégies comportementales et les réponses des endothermes face aux variations de températures (voir Humphries et Careau 2011 pour revue). En effet, la substitution des coûts de thermorégulation dépend de plusieurs facteurs, telles que les pertes de chaleur, suffisamment élevées pour créer une possibilité de substitution complète (voir Lovvorn 2007 pour revue) (Box 4). Ainsi, le niveau de substitution dépend de la température ambiante mais également de l'intensité de l'activité.

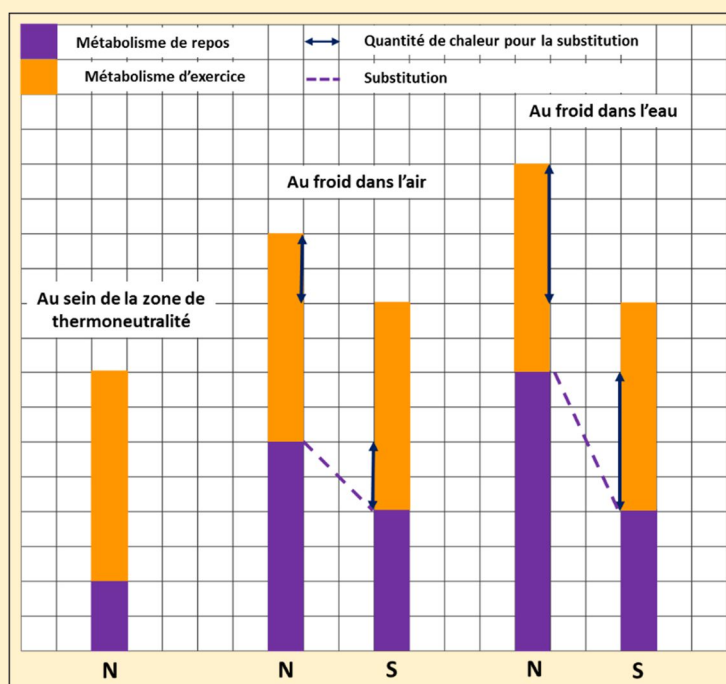
Box 4 : Principe de substitution par activité

Figure F : Principe de substitution énergétique dans différentes conditions environnementales sans l'intervention de la substitution (N) ou avec l'intervention de la substitution (S). Adapté de Lovvorn 2007

La production de chaleur pour une activité donnée (locomotrice, digestive et autre en dehors du BMR) est considérée ici identique (par souci de simplification) quel que soient les conditions environnementales (6 unités 'carreaux' ; Figure F), tandis que le coût métabolique de thermogénèse varie selon les conditions environnementales en fonction de l'importance des pertes thermiques. La figure montre clairement qu'en fonction du contexte, la production de chaleur locomotrice vient compenser en proportions variables le coût de thermorégulation (violet). Ainsi, plus les pertes de chaleur sont importantes (ici au froid dans l'eau), plus la substitution sera efficace (*i.e.* le double, comparée au cas 'Au froid dans l'air').

2.1 La locomotion

Un bon exemple de substitution par l'activité physique mise en évidence, est la réallocation complète de la chaleur produite par le déplacement lors de l'activité de **recherche alimentaire en hiver** chez deux espèces de passereaux nord-américains (*Junco phaeonotus* et *Junco hyemalis* ; Weathers et Sullivan 1993). Mais une substitution même partielle peut être un avantage décisif en conditions climatiques difficiles, comme par exemple lors du **déplacement terrestre** du bécasseau maubèche (*Calidris canutus*) ; la réduction des coûts de thermorégulation est de 35% par rapport aux individus inactifs chez cette espèce (Bruinzeel et Piersma 1998).

La substitution de l'activité physique aux coûts de thermorégulation a également été démontré dans l'eau. Ainsi, l'activité de **nage** permet de compenser les coûts de thermorégulation plus élevés lors d'une diminution de la température de l'eau chez les juvéniles d'Otarie de Californie (*Zalophus californianus*) (Liwanag et al. 2009). Chez les oiseaux plongeurs de nombreuses études ont montré le même phénomène lors de l'activité de **plongée** (Bevan et Butler 1992; Richman et Lovvorn 2008).

5/9 4/% Quelques chiffres

Les fuligules à tête noire nageant dans une eau à 18°C montrent une diminution de 5% du métabolisme et de 40% du métabolisme dans une eau à 8°C comparativement au métabolisme mesuré sans activité de nage (Kaseloo et Lovvorn 2005).

2.2 La digestion

Les processus de digestion et d'assimilation de la nourriture produisent de la chaleur également susceptible de venir se substituer aux coûts de thermorégulation. La production de chaleur associée (HIF pour "*heat incresement of feeding*" ou encore SDA pour "*specific dynamic action*" selon les études) est représentée sur la Figure 12 par l'augmentation du BMR après l'ingestion d'un repas et durant les processus de digestion, d'assimilation de conversion des nutriments et finalement leur incorporation dans les tissus de réserves (Brody 1945).

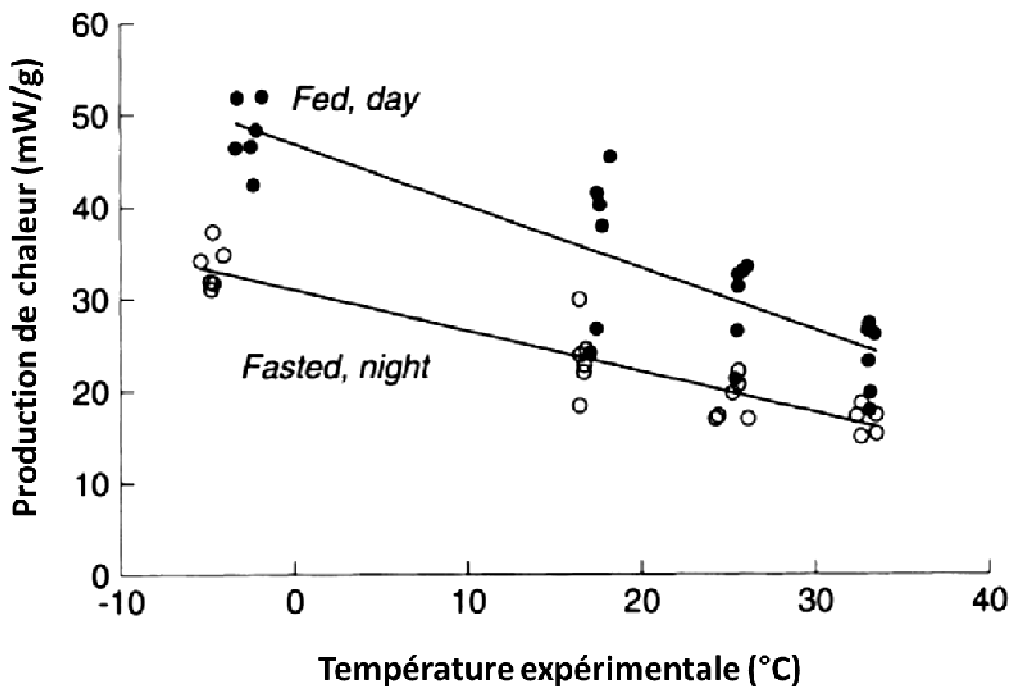


Figure 12 : Production de chaleur métabolique en condition nourris (noir) et à jeun (blanc) chez le junco aux yeux jaunes (*Junco phaeonotus*) à différentes températures ambiantes. Adapté de Weathers et Sullivan 1993

La magnitude de l'HIF dépend de la composition du repas (Blaxter 1989), de sa masse (Janes et Chappell 1995; Kaseloo et Lovvorn 2003; Green et al. 2006) et de sa température à l'ingestion (Battam et al. 2008). En effet, le réchauffement des proies peut compter pour 30% de l'HIF chez le guillemot de Brünnich (Hawkins et al. 1997), de 17% de l'HIF pour le manchot pygmée (*Eudyptula minor*), de 35% de l'HIF chez le rat musqué (*Ondatra zibethicus*; MacArthur et Campbell 1994) et de 23.7% chez le cormoran à aigrette (*Phalacrocorax auritus*; Enstipp et al. 2008) (Box 5).

Box 5 : Substitution des coûts de thermorégulation pendant la digestion

Groupe	Espèces	Masse (g)	HIF Substitution	HIF	Unité de mesure	Air/Eau	Ta (°C)	Substitution - Economie d'énergie	Auteurs
Mammifères	Phoque commun	37 600 à 59 400	NI	46%	RMR	Eau	3.6 à 4.4°C	Non	Markussen et al. 1994
Mammifères	Otarie à fourrure australe	13 200	NI	+61%	RMR	Air	De 14-20	NI	Dassis et al. 2014
Oiseaux	Sterne arctique	100	Non	NI	NI	Air	De 0 à 37	Non	Klaassen et al. 1989
Mammifères	Lion de mer	75 000 à 15 9000	Non	NI	NI	Eau	De 2 à 8°C	Non	Rosen et Trites 2003
Oiseaux	Fuligule à tête noire	580	NS	NI	NI	NI	NI	Non	Kaseloo et Loworn 2005
Mammifères	Loutre de mer	17 400 à 19 200	S	+ 54%	RMR	Eau	De 16 à 20	NI	Costa et Kooyman 1984
Oiseaux	Manchot pygmée	1 055	S	+ 87%	RMR	Eau	-	NI	Baudinette 1986
Oiseaux	Guillemot de Troil	836	S	51%	RMR	Air	20	NI	Croll et McLaren 1993
Oiseaux	Guillemot de Brünnick	803	S	45%	RMR	RMR	NI	NI	NI
Oiseaux	Manchot Adélie	1 030	S	10	GE	Air	NI	NI	Jones et Chappel 1995
Oiseaux	Cormoran huppé	1 670	S	+13 et +15%	RMR	Eau	De 4.9 à 12.6	NI	Enstipp et al. 2005
Oiseaux	Manchot pygmée	1 055	S	39%	VO2	Air	22.6°C	NI	Green et al 2006
Oiseaux	Albatross	6 288	S	5.1%	GE	Air	De 1 à 18	Une substitution 2 fois plus élevée quand la nourriture est à 0°C que quand elle est à 20°C	Battam et al. 2008
Mammifères	Rat musqué	757 à 11 107	oui	40% x 1.42	RMR	Air	15	35% du coût de réchauffement de la nourriture	MacArthur et Campbell 1994
Oiseaux	Faucon crecerelle	200	oui	16.60%	GE	Air	Jusqu'à -12	50% de la thermorégulation total et 7 à 15% du DEE	Masman et al. 1989
Oiseaux	Guillemot de Brünnick	820	oui	x1.4	RMR	Air	7	6% du DEE	Hawkins et al 1997
Oiseaux	Troglodytes familialier	8	oui	6.3%	GE	Air	De 20 à 22	100%	Chappel et al. 1997
Oiseaux	Capucin nonnette	10	oui	+26.42	RMR	Air	33.7	100%	Seagram et al. 2001
Oiseaux	Chouette hulotte	419	oui	8%	GE	Air	5	60% de la thermorégulation total et 10% du DEE	Bech et Praesteng 2004
Oiseaux	Fuligule à tête noire	580	oui	20.9% 3.9% 4.7%	GE	Eau	23 18 8	78% à 81%	Kaseloo et Loworn 2006
Oiseaux	Cormoran à aigrettes	2 008	oui	+70% +39.8	RMR RMR	Air	21.1 5.5	38% de la thermorégulation journalière	Enstipp et al. 2008

Table A : Substitution ou non du coût thermorégulation par la chaleur produite par l'activité de digestion de différentes espèces d'oiseaux et de mammifères marins. NI pour non-indiquée; NS pour non-significatif; S pour suggérée; GE pour l'apport énergétique net ingéré ou "gross energy intake"; DEE pour les dépenses énergétiques journalière ou "daily energetic expenditure"; RMR pour le taux métabolique au repos ou "resting metabolic rate".

En résumé de ce qui a déjà été dit plus haut, la thermorégulation en milieu froid pourrait se limiter à la production de chaleur afin de contrebalancer les pertes caloriques induites par un gradient de température défavorable au maintien d'une température corporelle stable chez les endothermes. Et pourtant, de nombreux **ajustements** et **mécanismes** sont mis en œuvre afin de réduire la production de chaleur brute coûteuse en énergie (Figure 13). Ainsi de nombreux paramètres vont venir influencer l'intensité, mais également le coût de la thermorégulation.

Tout d'abord des paramètres environnementaux tels que la température, l'exposition aux radiations solaires, l'abritement du vent, des précipitations mais aussi l'ouverture du milieu pourront venir modifier les effets du milieu ambiant sur l'organisme.

Les réponses comportementales de sélection de micro-habitats, d'évitement des conditions défavorables ou encore de thermorégulation sociale pourront à leur tour venir jouer un rôle dans une stratégie d'économie d'énergie face à des coûts de thermorégulation élevés.

De surcroît, les paramètres anatomiques et morphologiques tels que l'isolation des individus sont essentiels pour limiter les pertes de chaleur et faire face à un gradient de température élevée.

Enfin les paramètres physiologiques avec notamment la vasomotricité et le recyclage de toute forme de production de chaleur au profit de la thermorégulation jouent également un rôle primordial dans la régulation de la température corporelle en conditions défavorables froides.

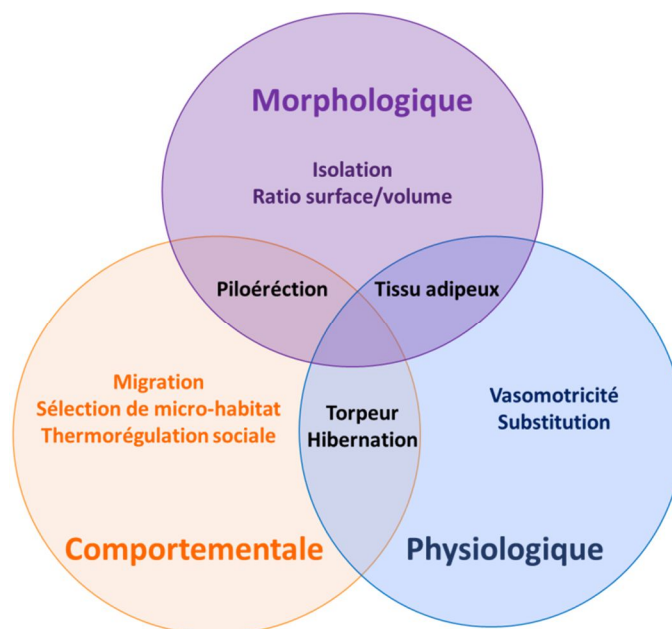


Figure 13 : Mise en place des ajustements morphologiques, physiologiques et comportementaux en réponse à des températures ambiantes défavorables.

En raison des différences dans les mécanismes de production de chaleur entre les mammifères et les oiseaux (*e.g.* thermogénèse sans frisson), la suite du manuscrit traitera uniquement des espèces d'oiseaux marins.

D. Thermorégulation et activités en milieu aquatique

Les espèces marines passent une partie importante de leur vie dans l'eau et doivent faire face à des contraintes physiques exacerbées ou différentes de celles s'exerçant à terre.

Tout d'abord, la **viscosité** du milieu aquatique, 60 fois supérieures à celle de l'air (Dejours 1987), modifie les forces de traînée et les profils idéaux de pénétrabilité du milieu (hydrodynamisme versus aérodynamisme). Ceci a conduit, au cours de l'évolution, au développement d'adaptations spécifiques chez les espèces terrestres ayant recolonisé le milieu aquatique (voir Fish 2016 pour revue). Ainsi, les individus dans l'eau doivent faire face à des forces de **frottement** qui les ralentissent et qui augmentent avec la vitesse de nage (Lovvorn 2001). Alors, de nombreuses études s'accordent à dire que la vitesse de nage est souvent maintenue dans une gamme visant à minimiser ces forces de frottement (Watanuki et al. 2003; Lovvorn et al. 2004).

De plus, la **densité** plus importante du milieu aquatique comparativement au milieu aérien (800 fois supérieur ; Dejours 1987) est également une contrainte pour les espèces marines en période de plongée. Ainsi, la **flottabilité** qui tend à les faire remonter à la surface diminue avec l'augmentation de la profondeur (Lovvorn 2001; Lovvorn et al. 2004).

Les espèces aviaires aquatiques présentent de nombreuses caractéristiques morphologiques, physiologiques et comportementales leur concédant des avantages au déplacement dans l'eau. Ainsi, par exemple, le manchot Adélie présente un faible coefficient de traînée de 0.0368 (Culik et al. 1994), soit dix fois moins qu'un homme en position de nage (Marinho et al. 2009). De plus, la forme de la tête et les plumes des manchots jouent un rôle important dans la transition du régime de flux laminaire au flux turbulent présent tout le long du corps de l'animal (Bannasch 1993; Lovvorn et al. 2001). Ces flux, impactant la **couche limite**, ont un effet à la fois sur les forces de frottements mais également sur les pertes de chaleur par convection. Ainsi, l'hydrodynamisme de ces espèces est actuellement pris pour exemple dans différents projets de robotiques, en lien avec la position du corps lors de l'impact avec l'eau (Siddall et al. 2017) et avec la forme corporelle des manchots (AquaPenguin© Festo).

1. La nage

Avec une conductivité supérieure à l'air, le contact de l'eau augmente la conductance thermique de 2.2 durant l'activité nage (de Vries et van Eerden 1995).

1.1 Nager dans l'eau

De part une viscosité de l'eau de mer bien supérieure à celle de l'air (Casler et al. 1973; Stephenson et al. 1989), l'activité de nage est plus coûteuse que le vol (Costa et al. 1991) et nager sous l'eau est plus coûteux que de nager à la surface de l'eau (Woakes et Butler 1983), avec une différence de 18% du coût

énergétique de nage mesurée chez le cormoran de Brandt (*Phalarocorax penicillatus*) (Figure 14 , Schmid et al. 1995).

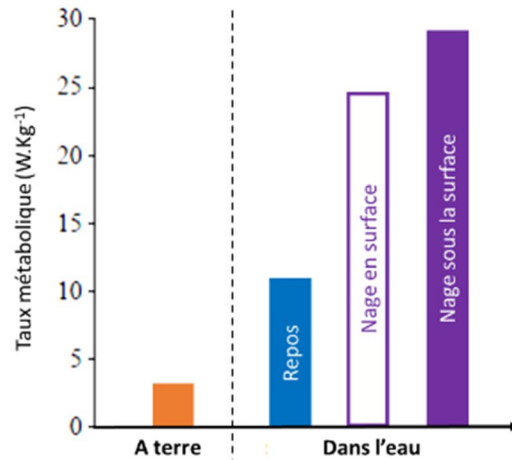


Figure 14 : Taux métabolique d'un cormoran de Brandt dans différentes conditions environnementales. Le coût du transport des oiseaux en surface a été mesuré expérimentalement tandis que le coût de l'activité de nage sous l'eau a été estimé par une équation (Schmid et al. 1995). Adapté de Ancel et al. 2000

La plupart des espèces d'oiseaux marins en activité de **recherche alimentaire** (*i.e.* poursuite des proies) utilisent dans l'eau un type de nage caractérisée de "*burst and glide*" (décrit pour la première fois par Weihs 1974). Ce type de nage peut se comparer aux modes "battu et plané" des oiseaux dans l'air, qui sont associés par phases successives alternées : (1) des périodes d'accélération de la fréquence de battement des propulseurs (vol battu et nage propulsive), intercalées de (2) périodes de diminution de vitesse de déplacement, propulseurs immobiles (vol plané et nage glissée, ou glisse). Ces deux phases répétitives pourraient se traduire par un type de nage "par à-coups" utilisée chez les oiseaux marins et les manchots (Figure 15; Videler et Weihs 1982; Sato et al. 2005).

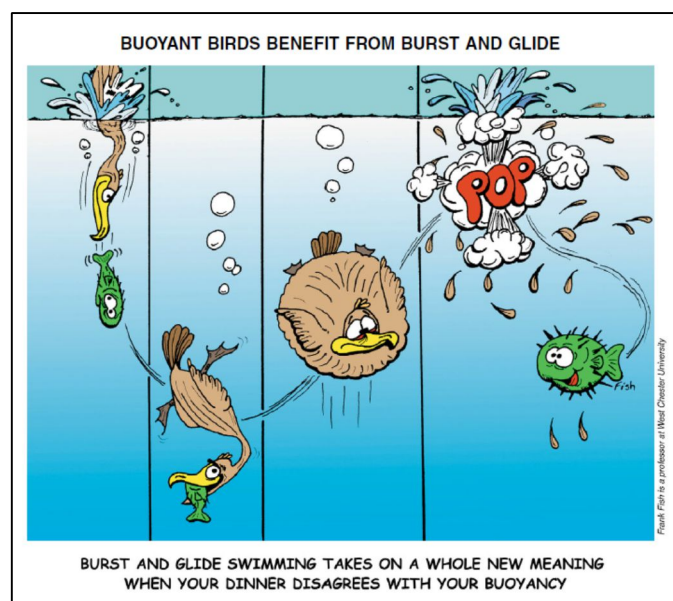


Figure 15 : Illustration du type de nage "*burst and glide*" basé sur le jeu de mot anglais où "*burst*" signifie éclater © F. Fish

Les oiseaux marins se propulsent dans l'eau soit à l'aide des ailes "*Wing propelled*" soit à l'aide des pattes "*Foot propelled*". Dans certains cas, comme chez l'eider à duvet (*Somateria mollissima*) en phase de descente, les individus peuvent utiliser les deux types de propulsion simultanément (Heath et al. 2006). La locomotion par propulsion des ailes nécessite un compromis entre des ailes adaptées au déplacement aérien et sous-marin (Thaxter et al. 2010). Ainsi, l'adaptation des ailes pour une activité de nage efficace chez le guillemot de Brünnich augmente en parallèle les coûts énergétiques du vol (Elliot et al. 2013). De même, les espèces marines non-volantes, telles que le manchot Adélie, ont une meilleure stabilité sous l'eau comparativement au macareux rhinocéros (*Cerorhinca monocerata*) et au guillemot de Brünnich, qui ont conservé leur capacité de vol (Noda et al. 2016).

1.2 Entrée et sortie de l'eau des espèces plongeuses

Certaines espèces d'oiseaux marins sont qualifiées d'oiseaux plongeurs en raison de leur activité de plongée en vol vers la surface de l'eau afin de chasser (e.g. martin pêcheurs, sternes). Ainsi dans la famille des Sulidae, les vitesses d'impact peuvent excéder les 20 m/s (Wodzicki et al. 1955, Garthe et al. 2000, Garthe et al. 2014) sans pour autant induire de blessures (Box 6).

BOX 6 : Impact à grande vitesse en toute sécurité

La famille des Sulidae est composée de 10 espèces de fous ayant des vitesses de plongée élevées sans induire de dommage aux individus à l'exception de dommages causés par des collisions interindividuelles (Machovsky et al. 2011b). Ainsi, le fou de bassan (*Morus bassanus*) peut atteindre des vitesses verticales de 54.0 m/s correspondant à 194 km/h durant de courtes périodes de temps (6.3 s) précédant les périodes de plongées (Figure G1, Garthe et al. 2013). A cette vitesse d'impact, l'absence de blessures est rendue possible grâce tout d'abord à la posture du corps et du cou (Figure G2, Ropert-coudert et al. 2004, Machovsky et al. 2013) mais également à la musculature du cou ainsi qu'à la vitesse soutenue avant l'impact (Figure G3, Chang et al. 2016).

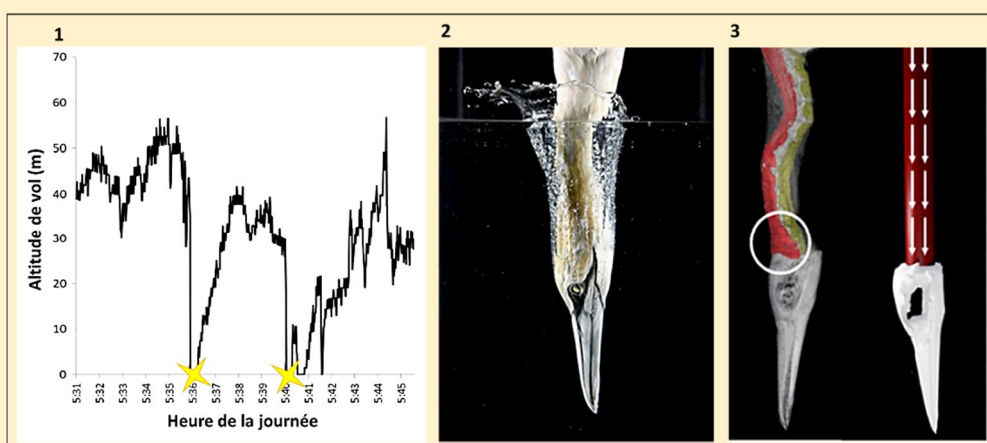


Figure G : Le fou de bassan plonge d'une hauteur supérieure à 30 mètres jusqu'à la surface de l'eau (croix jaune) (1) pouvant atteindre une vitesse de 54 m/s (Garthe et al. 2013). Pour éviter les blessures les individus adoptent un angle et une vitesse d'impact précis (2) et les muscles du cou permettent de maintenir le cou droit et de stabiliser la structure (3). Adapté de Garthe et al. 2013 et Chang et al. 2016

Cette technique de plongée permet aux oiseaux de repérer leurs proies dans les airs (Nelson 1978; Haney et Stone 1988) et de fondre sur elles grâce à l'élan de la chute (Nelson 1978). A l'inverse, certaines espèces d'oiseaux marins deviennent des proies lorsqu'elles sont sous l'eau et doivent alors être capable de s'extraire rapidement de ce milieu. C'est les cas des différentes espèces de manchots qui n'ont pas de prédateur terrestre au stade adulte mais sont vulnérables à certains prédateurs marins tels que les orques (*Orcinus orca*) et les léopards de mer (*Hydrurga leptonyx*). Ainsi, pour s'extraire de l'eau et atterrir sur la glace, le manchot Adélie est capable d'ajuster son angle de sortie en fonction de l'image réfléchiée donnant des indications sur l'épaisseur de la glace (Yoda et Ropert-Coudert 2004). De même, le manchot empereur, lui, ajuste sa vitesse de nage de sortie en fonction de l'épaisseur de la glace (Sato et al. 2005).

2. La plongée

2.1 Définition et contraintes de la plongée

La plongée est généralement décrite par un déplacement vertical en apnée, de la surface de l'eau vers des profondeurs fluctuantes, et de durée variable. Au sens strict, l'**apnée** se définit comme l'association de trois contraintes exercées sur un animal ayant un comportement spontané : (1) l'immersion complète du corps dans l'eau, (2) l'apnée volontaire prolongée, (3) un déplacement en profondeur.

La conductivité dans l'eau augmente de 4.8 durant la plongée (de Vries et van Eerden 1995) comparativement à l'air. En emprisonnant de l'air sous les plumes (voir la section B2.1), les oiseaux vont améliorer leur isolation thermique mais vont également accroître leur flottabilité. Un compromis doit alors se faire entre l'isolation et la flottabilité avec, dans le cas du grand cormoran (*Phalacrocorax carbo*), un compromis en faveur d'une réduction de la flottabilité. De même, une réduction de 41% de la flottabilité conduit à une diminution de 61% de l'effort de nage chez le fuligule (*Aythya affinis*) (McPhail et Jones 1999). En effet, chez cette espèce, au moins 95% du travail fourni lors d'une plongée est nécessaire pour contrer la flottabilité, contre 3 à 5 % du travail fourni pour contrer les forces de frottement (Stephenson et al. 1989).

La couche d'air emprisonnée dans le plumage et l'air contenu dans les poumons vont à l'encontre de cette activité de plongée, induisant une plus forte **poussée d'Archimède** contraire à l'enfoncement dans l'eau. En effet la flottabilité est une force égale à la différence entre deux forces verticales : la poussée d'Archimède et le poids de l'animal. La poussée d'Archimède, s'exerçant sur un animal immergé, dépend de la masse corporelle et du volume de l'animal, donc de sa densité corporelle (en kg.m^3) et de la densité du milieu dans lequel est plongé l'animal. Cette force augmente, par exemple, lorsque l'individu a les poumons pleins. Si la densité de l'animal est plus faible que le milieu, son poids est alors plus faible que le même volume d'eau et donc la flottabilité est positive. Ainsi, afin de contourner cette flottabilité, et donc de réduire les coûts énergétiques de la plongée, plusieurs espèces d'oiseaux marins

sont capables de manipuler le volume d'air contenu dans leurs poumons avant la plongée (Hustler 1992; Minamikawa et al. 2000; Sato et al. 2002; Hays et al. 2004). C'est le cas notamment des guillemots de Brünnich, qui contrôlent par anticipation l'inhalation précédant la plongée en fonction de la profondeur et de la durée prédite de cette dernière (Elliot et al. 2007).

2.2 Délimitations du cycle de plongée

Par rapport à la physiologie de la plongée, la phase d'apnée caractérisant la plongée doit être associée à deux périodes de surface qui précèdent et succèdent la plongée. Il y a ainsi la **pré-plongée** (Phase 1), durant laquelle une partie des échanges sont anticipés pendant une courte phase préparatoire à la plongée. Puis, la **plongée *per se*** (Phase 2), durant laquelle l'animal évolue en profondeur en apnée. Puis enfin la **post-plongée** (Phase 3), correspondant à une phase de récupération de l'apnée. Réunies entres elles, ces trois phases constituent le **cycle de plongée**, période sur laquelle on considère que les échanges respiratoires (O_2 et CO_2) effectués en post-plongée permettent une restitution intégrale de la 'dette respiratoire' payée pendant la phase d'apnée. Sur le plan vertical, une plongée typique peut se subdiviser en 3 parties successives : (1) la descente en profondeur, (2) la partie au fond et (3) la remontée vers la surface (Schmidt et al. 2006, voir figure 16).

Enfin, pour des raisons qui restent débattues, la majorité des oiseaux marins qui effectuent une succession de plongées profondes (séquence de plongées ou "bouts"), l'interrompent par une période de temps beaucoup plus longue en surface (les "inter-bout", Boyd 1997). L'une des interprétations serait l'obligation d'établir une pause afin de diminuer les risques d'accidents de décompressions (liés à une sursaturation sanguine en azote).

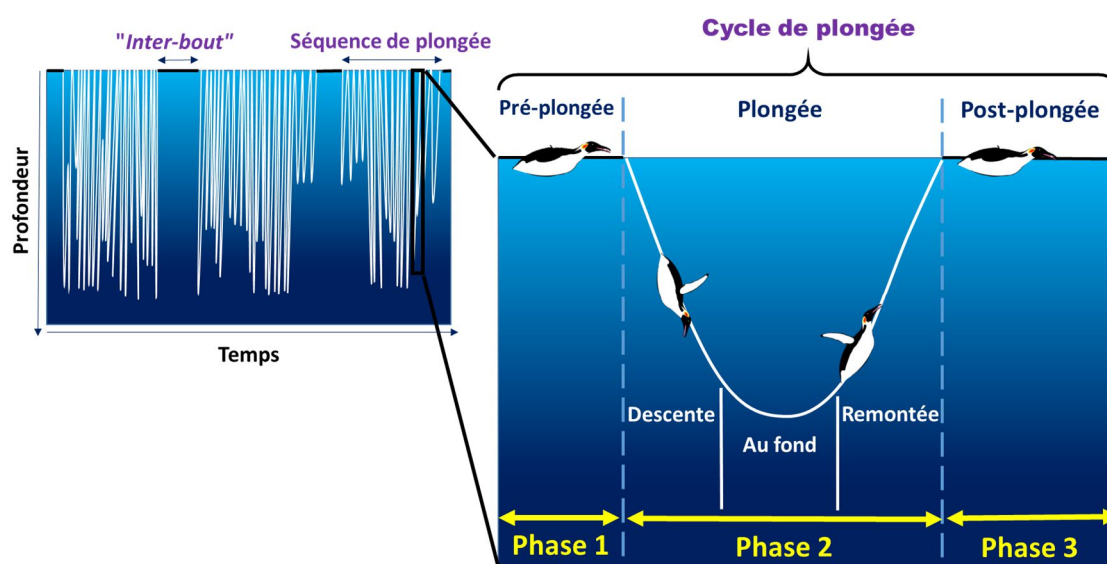


Figure 16 : Découpage des trois phases définissant une plongée au sein d'une séquence de plongée

D'un point de vue écologie alimentaire, on considère que pour les espèces plongeuses qui accèdent à leurs proies en profondeur (Houston et Carbone 1992), seule la partie passée au fond de la phase de plongée correspond à la **période d'alimentation**, que ces espèces soient benthique ou pélagique. Ainsi,

le théorème de la valeur marginale (Charnov 1976) appliquée à la plongée ("*optimal breathing theory*" Kramer 1988) considère que pour optimiser au maximum une plongée, les individus doivent augmenter la durée du temps utile (donc du temps passé à s'alimenter) par rapport au temps du cycle de plongée. Cela revient à minimiser les temps de transit (*i.e.* descente et remontée) et le temps de surface au profit du temps passé au fond.

2.3 Les échanges gazeux au cours du cycle de plongée

Comme nous l'avons dit plus haut, les temps de surface (inter-plongée, pré- et post-plongée ou "*inter-bout*") chez les prédateurs marins qui pratiquent l'apnée sont les moments indispensables à la reconstitution des stocks d'oxygène et à l'élimination du CO₂, de l'acide lactique et éventuellement d'un surplus d'azote dissous (après un "*bout*" de plongées profondes). Un premier facteur permettant de retarder l'interruption de l'apnée en plongées est donc la capacité de **stockage de l'oxygène**. La **limite de plongée aérobie** (ADL pour "*aerobic dive limit*") se définit comme la durée de plongée durant laquelle le métabolisme fonctionne uniquement de façon aérobie et donc n'accumule pas d'acide lactique (lactate) dans le sang (Kooyman et al. 1980; 1983). En effet, au-delà de cette durée théorique, le métabolisme devient entièrement anaérobie, avec donc une production très rapide d'acide lactique. L'acide lactique étant toxique (modification du PH sanguin), il devra par la suite être éliminé, ce qui n'est possible qu'après un temps passé à la surface en respiration aérienne (Kooman 1989). Il est important de noter qu'il faut environ deux fois plus de temps pour récupérer d'une **dette lactique** que le temps de sa mise en place pendant l'apnée (Kooyman 1989). De ce fait, le prolongement de l'apnée au-delà de l'ADL pour la capture d'une proie impliquera l'impossibilité de pêcher durant un temps beaucoup plus long.

La mesure du métabolisme aérobie en plongée reste encore un challenge technologique en conditions naturelles, c'est pourquoi les études se basent sur une estimation théorique de l'ADL (cADL pour "*calculated aerobic dive limit*" ; Kooyman et al. 1989). Cette estimation représente le ratio entre deux variables que l'on peut mesurer plus facilement : le volume total d'**oxygène stockée** de l'organisme en ml.O₂, mesuré par des prélèvements sur des carcasses d'animaux, et la **consommation d'oxygène** moyenne pendant un cycle de plongée (en ml.O₂/min⁻¹, mesuré en canal de nage). Ce ratio donne une durée **théorique** (en minutes) de l'utilisation complète de l'oxygène pendant l'activité de nage en apnée. En revanche, son calcul se base sur l'hypothèse que le métabolisme de repos ne varie pas entre la plongée et la post-plongée, et que la dette en apnée est entièrement compensée durant la période de post-plongée en surface (or nous verrons plus loin que ce n'est pas le cas pour toutes les espèces, y compris pour mon modèle d'étude).

Il est depuis longtemps établi que le métabolisme masse-spécifique est corrélé négativement à la masse corporelle (rapport volume/surface, voir partie B1) et qu'ainsi les grandes espèces consomment moins d'énergie par unité de masse que les petites espèces. Logiquement, la durée maximale de plongée, qui

dépend directement du métabolisme, suit la même relation allométrique positive (Halsey et al. 2006). De façon explicite, les espèces de plus grande taille ont donc une durée maximale de plongée plus longue que les plus petites espèces (Schree et Kovacs 1997; Figure 17). La suite de cette introduction abordera uniquement l'activité de plongée chez toutes les espèces manchots. En effet, les espèces de manchots expriment des durées de plongée supérieures aux autres espèces d'oiseaux marins, suggérant l'existence d'autres mécanismes leur permettant d'allonger la période d'apnée. La relation est également tirée vers le haut par deux espèces de manchot appartenant au genre *Aptenodytes*, dont mon modèle d'étude (Figure 17 ; Table 1).

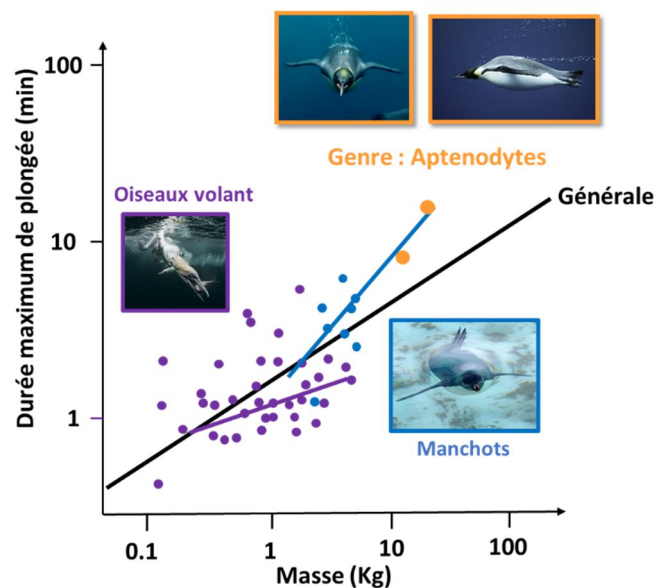


Figure 17 : Relation allométrique en fonction de la durée maximum de plongée chez les oiseaux marins. Adapté de Schree et Kovacs 1997

2.4 La plongée chez les manchots

Comme évoqué précédemment, les espèces de manchots présentent une large gamme de durée de plongée plus ou moins en accord avec leurs masses respectives (Table 2).

Table 2 : Durée et profondeur de plongée pour 15 espèces de manchots. Adapté de Ponganis 2015

Nom d'espèce	Body mass	Durée (min)		Profondeur (m)		Auteurs	
		Moyenne	Maximale	Moyenne	Maximale		
Manchot du Cap	<i>Spheniscus demersus</i>	3.7	1-2	2.3	20-80	130	Petersen et al. 2006; Wilson 1985; Wilson et Wilson 1990
M. des Galapagos	<i>S. mendiculus</i>	2.25	<1	3.2	<6	52	Boersma 1976; Mills 2000; Steinfurth et al. 2008
M. de Magellan	<i>S. magellanicus</i>	3.4	1-2	4.6	<60	97	Peters et al. 1998, Walker et Boersma 2003
M. de Humbolt	<i>S. humboldti</i>	3.2	<1	2.8	<20	54	Culik et al. 2000, Luna-Jorquera et Culik 1999
M. pygmée	<i>Eudyptula minor</i>	1	<1-1.5	1.5	<10	69	Bethge et al. 1997; Montague 1985; Roper-Coudert et al. 2003; 2006
M. antipode	<i>Megadyptes antipodes</i>	8.9	1-2	-	10-30	56	Seddon et Vanheezik 1990
Gorfou de Schlegel	<i>Eudyptes schlegeli</i>	8.1	1-3	7.5	<10-60	226	Hull 2000
G. de Moseley	<i>E. chrysocome moseleyi</i>	4.3	<1-1.5	3.2	<10-40	168	Cherel et al. 1999; Tremblay et Cherel 2003; Tremblay et al. 1997
G. sauteur	<i>E. chrysocome filholi</i>		1-2	11	<10-60	113	Hull 2000; Schiavani et Rey 2004; Tremblay et Cherel 2000
G. macaroni	<i>E. chrysolophus</i>	5	1-2	4	20-35	113	Boyd et Croxall 1996; Croxall et al., 1993, Green et al. 1998, 2003
M. Adélie	<i>Pygoscelis adeliae</i>	4.6	1-2	5.9	10-40	180	Chappell et al. 1993; Norman et Ward 1993; Watanuki et al. 1997
M. à jugulaire	<i>P. antarcticus</i>	4.8	1-2	3.6	10-40	179	Miller et Trivelpiece 2008, Takahashi et al. 2003, Wilson and Peters 1999
M. papou	<i>P. papua</i>	6.1	1-3	9.1	10-100	225	Lescroel et Bost 2005; Robinson et Hindell 1996
M. empereur	<i>Aptenodytes forsteri</i>	26.6	<5-10	27.6	<100-400	564	Ponganis et al. 1997d; Rodary et al. 2000, Sato et al. 2011; Wienecke et al.
M. royal	<i>A. patagonicus</i>	13	2-6	9.2	<100-250	343	Charrassin et Bost 2001; Pütz et Cherel 2005; Pütz et al. 1998

Ainsi, de nombreuses études ont reporté que certaines espèces de manchots montraient des durées moyennes en plongée supérieures à l'ADLc (Figure 18), même si les chiffres varient selon les études (Box 7). D'une part, l'augmentation de la durée du temps de plongée au-delà de l'ADLc pourrait être bénéfique, augmentant ainsi la durée d'approvisionnement en proie et réduisant le risque de perdre le contact avec les zones denses de poissons (Elliot et al. 2008). D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, le dépassement de la capacité aérobie de plongée induit une augmentation du temps de récupération post-plongée et donc réduit l'efficacité de l'activité alimentaire (Théorème de la valeur marginale ; Boyds et Croxall 1996).

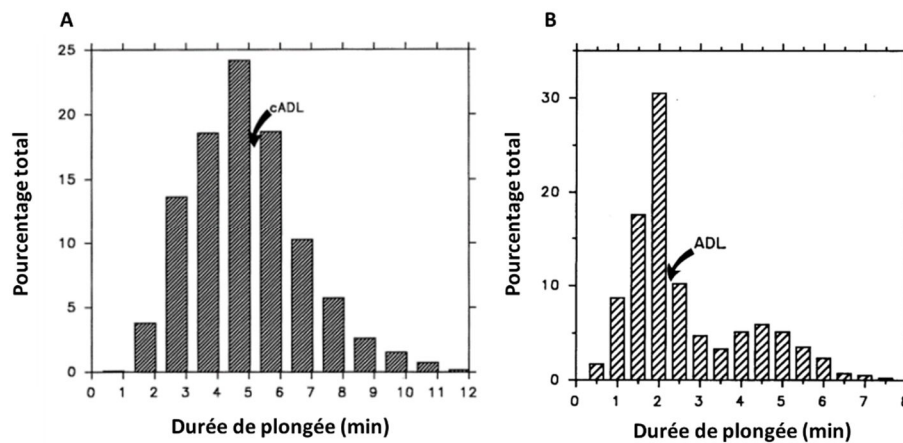


Figure 18 : Fréquence des durées de plongées de manchot empereur (N=7562 ; A) et de manchot royal (N=8924 ; B). La limite de durée de plongée aérobie est indiquée pour chaque espèce respectivement. Adapté de Kooyman et al. 1992 et de Ponganis et al. 1997b

Ainsi, l'augmentation de la période **post-plongée** a été observée chez le manchot empereur, en accord avec une période de plongée anaérobie (Figure 19A ; Kooyman et Kooyman 1995), mais elle est absente chez certaines espèces de manchots, dont le manchot royal (Figure 19B ; Boyds et Croxall 1996).

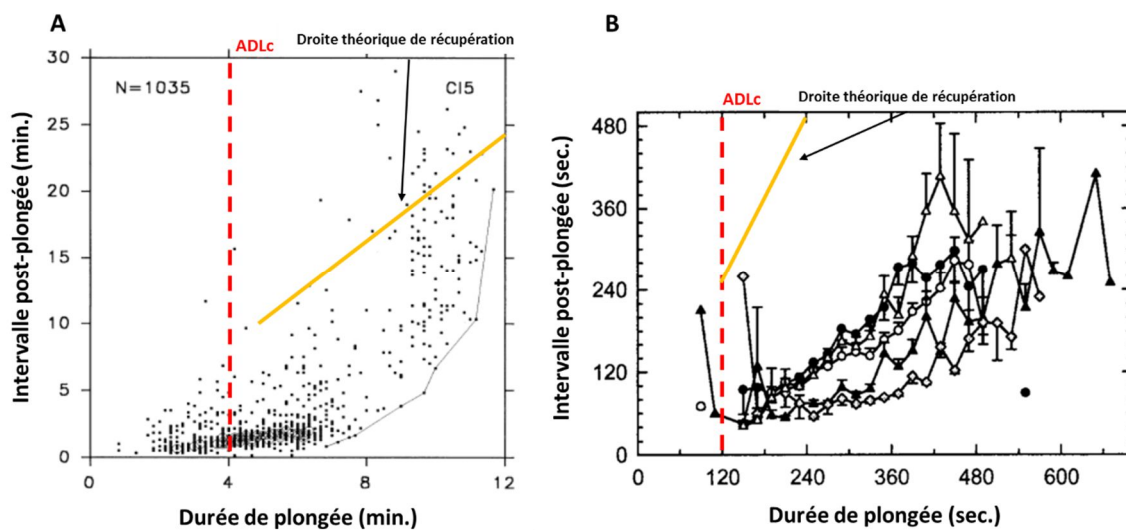


Figure 19 : Durée de l'intervalle post-plongée en fonction de la durée de plongée du manchot empereur (A) et du manchot royal (B). La ligne rouge pointillée indique la limite de l'ADLc respectivement pour chaque espèce. La droite orange correspond à la droite théorique de récupération de la dette lactique soit une durée de récupération deux fois plus longue que le temps de sa mise en place pendant l'apnée. Adapté et Charrassin et al. 2002

Ainsi, l'hypothèse a été faite d'une **surestimation du métabolisme de plongée**, pouvant être liée aux conditions expérimentales (Box 7). En effet, cette surestimation de la consommation d'oxygène durant la plongée induirait une sous-estimation de la durée de plongée aérobique (Butler 2004; voir Butler 2006 pour revue).

Box 7 : Disparité dans l'estimation de l'ADLc

Les particules d'oxygènes sont principalement liées à l'hémoglobine du sang et à la myoglobine des muscles ; toutefois, chez les oiseaux marins, le système respiratoire contribue pour 30 à 60% des réserves d'oxygène utilisables (Butler 2001).

Le **manchot royal** a une répartition du stock d'oxygène à 30% dans le système respiratoire et à 40% au niveau du système musculaire (Sato et al. 2002). Cette estimation reste difficile à mettre en œuvre et peut dépendre des conditions expérimentales. En effet, les mesures en captivité estiment une capacité de stockage d'oxygène de 48 ml.kg⁻¹ (Ponganis et al. 1999), une valeur inférieure à l'estimation réalisée en liberté (54 ml.kg⁻¹ ; Sato et al. 2002) et pouvant impacter significativement la durée de plongée en aérobique. Ainsi, la durée de plongée aérobique théorique varie entre 2 et 4.1 minutes selon la méthode d'estimation (Kooyman et al. 1992a ; Butler 2000) et entre 20 et 45% des plongées effectuées sont supérieures à cette durée (Figure 19; Kooyman et al. 1992a ; Froget et al. 2004).

Le **manchot papou** (*Pygoscelis papua*) dépasse fréquemment l'ADLc durant ses séquences de plongées, même si la proportion exacte de ces dépassements reste peu claire. En effet, ce dernier dépasse l'ADLc durant 20 à 69% des plongées selon les études, avec des variations importantes dues à la méthode d'étude. Ainsi, les valeurs reportées de dépassement de l'ADLc sont de (i) 62 à 69% des plongées selon une étude (Boyd et Croxall 1996), (ii) 40 à 50% des plongées si l'ADLc est évalué par la consommation d'oxygène en canal de nage (Williams et al. 1992), (iii) 30% des plongées si on se base sur la fréquence cardiaque (Bevan et al. 2002) ou encore (iv) 20% des plongés si l'on se base sur la consommation d'oxygène au repos dans l'eau (Bevan et al. 1995).

Il en est de même pour le **manchot empereur** dont l'évaluation de l'ADLc varie de 4.5 min à 6 min considérant l'accumulation d'acide lactique dans le sang (Ponganis et al. 1997b) et entre 7 et 8 minutes considérant la phase de post-plongée comme une période de récupération (Kooyman et Kooyman 1995). Ainsi au vue de ces différences, le pourcentage de plongée excédant l'ADLc varie de 3 à 40%.

2.5 Métabolisme durant la plongée

La réduction de la température de certains tissus (*i.e.* hétérothermie régionale) durant la plongée, de par l'effet Q₁₀ précédemment abordé, pourrait réduire l'activité métabolique et donc diminuer la consommation en oxygène de ces tissus. Le bilan de la consommation en oxygène de l'organisme total serait par conséquent diminué et aurait pour répercussion une durée de plongée aérobique plus longue. En effet, la diminution des températures de certaines régions du corps lors de la plongée a été mesurée chez plusieurs espèces.

Ainsi, le **manchot papou** et le **gorfou macaroni** (*Eudyptes chrysolophus*) expriment une diminution moyenne de 2.4°C de la température de l'abdomen durant les séquences de plongées (Bevan et al. 2002; Green et al. 2003). Cette réduction de température, si elle s'étendait à tout le corps, pourrait augmenter

la durée de plongée aérobie de 29% et toutes les plongées de ces deux espèces seraient alors effectuées au sein de l'ADLc (Butler 2004).

Pour les deux espèces du genre *Aptenodytes*, les schémas de plongée diffèrent.

Le **manchot empereur** montre l'utilisation d'hétérothermie régionale au cours de la plongée. En effet, la plaque incubatrice des individus (faiblement isolée) montre une diminution de 11°C en plongé (Ponganis et al. 2003b). En revanche, chez cette espèce, la diminution de certaines températures corporelles ne sont pas associées aux durées de plongée et l'on observe même l'augmentation de température de certains tissus durant les plongées (Ponganis et al. 2007; 2010a). Pour rappel, les individus font face à des périodes de récupérations plus longues lorsque les plongées sont supérieures à l'ADLc, suggérant une estimation cohérente de la durée de plongée aérobie (Figure 19A).

Le **manchot royal**, quant à lui, montre également une diminution de certaines températures corporelles durant l'activité de plongée accompagnée de périodes de récupération non-compatibles à la durée nécessaire pour la récupération de la dette lactique au-delà de l'ADLc (Figure 19B). Ainsi, la température de l'abdomen peut diminuer jusqu'à atteindre des températures inférieures à 20°C (Handrich et al. 1997). De même, la température des muscles pectoraux peut montrer une diminution de plus de 5.5°C tandis que la plaque incubatrice peut diminuer d'environ 13°C durant l'activité de plongée (Schmidt et al. 2006). Le maintien de ces températures **hypothermiques** se poursuit sur toute la durée de la séquence de plongée et l'absence de l'allongement des périodes de post-plongée suggère une réduction du métabolisme induite par ces températures non comprises dans les précédentes estimations de l'ADLc.

Les différentes stratégies observées pour ces deux espèces pourraient venir de protocoles expérimentaux variés pour évaluer le métabolisme de plongée. En effet, les études sur le manchot empereur ont été réalisées au niveau d'un trou de glace induisant le retour sur glace, soit hors de l'eau, après chaque plongée (*e.g.* Ponganis et al. 2007) tandis que les études sur le manchot royal ont été réalisées en condition naturelle sans retour à terre entre les séquences de plongé (Handrich et al. 1997). De plus, une autre différence engendrée par l'étude du manchot royal en condition naturelle est l'identification, chez cette espèce restant en mer 24h/24, d'un cycle journalier des températures corporelles. L'**hétérothermie diurne** exprimée durant les séquences de plongée précède un retour à la **normothermie durant la nuit** en absence de plongée (Figure 20 ; Handrich et al. 1997; Schmidt et al. 2006).

E. Objectif de cette thèse

Afin de mieux comprendre la proportion élevée de plongées supérieures à la limite de plongée aérobie, et grâce à la miniaturisation des appareils de mesures, de nombreuses études se sont intéressées à la mesure, et non plus à l'estimation, des dépenses énergétiques durant la plongée chez le manchot royal (Handrich et al. 1997; Butler 2004; Schmidt et al. 2006). En effet, l'observation de l'utilisation de l'hypothermie en plongée a conduit à l'hypothèse que la réduction de la température de certains tissus

pourrait être à l'origine d'une économie d'énergie augmentant la durée de plongée aérobique (Handrich et al. 1997).

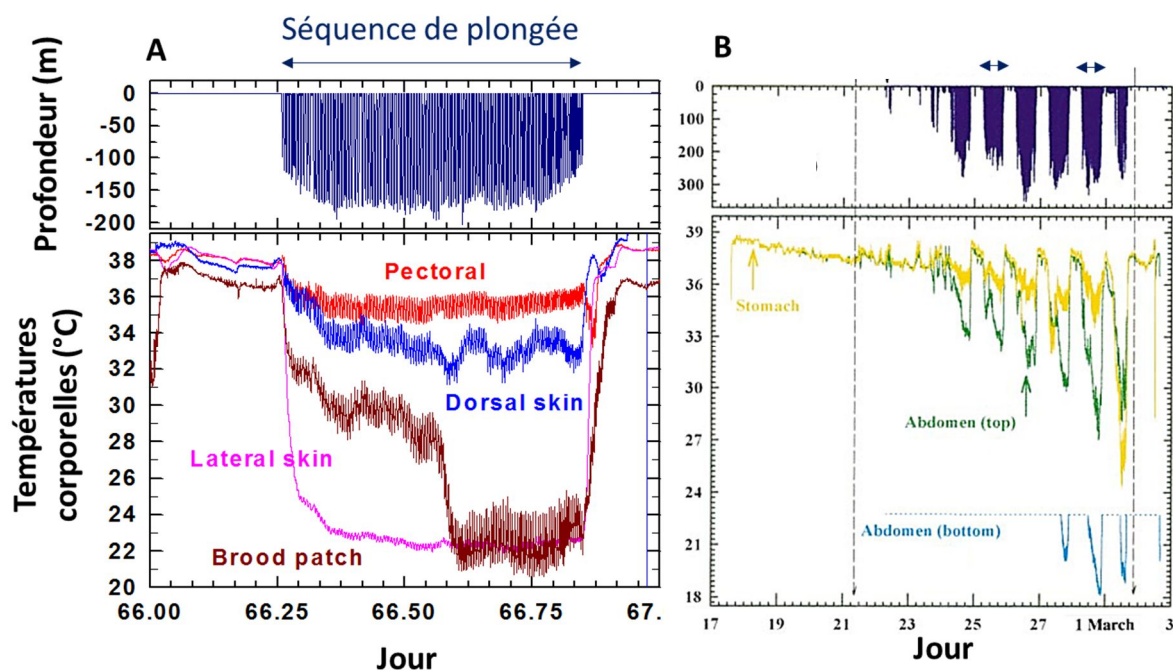


Figure 20: Evolution des différentes températures corporelles au cours d'une journée en mer (A) et d'un séjour en mer (B) chez un individu manchot royal

1. Énergétique du manchot royal en mer

La mesure de l'énergétique de la plongée reste un paramètre difficile à mesurer. En effet, le manchot royal allant s'alimenter à des centaines de kilomètres au large de sa colonie (Bost et al. 2015), l'utilisation de l'**eau doublement marquée** (nécessitant la capture et la recapture des individus à court terme) n'a, à ce jour, été réalisée que par une seule étude (Kooyman et al. 1992a). De plus, sans le budget-temps détaillé des individus en mer, il reste difficile de déterminer le coût énergétique d'une activité donnée (e.g. la plongée) (Butler et al. 2004). Enfin, avec des plongées supérieures à 300 mètres de profondeur, la création d'un bassin reconstituant les conditions naturelles d'une plongée en captivité reste pour le moment illusoire.

L'étude de la **fréquence cardiaque** est aujourd'hui l'une des méthodes mises en œuvre pour évaluer l'énergétique du manchot royal en condition naturelle, à terre dans colonie (Green 2011; Viblanç et al. 2014 ; 2015) et en mer (e.g Halsey et al. 2007; 2010). Ainsi, chez cette espèce, la fréquence cardiaque est significativement corrélée à la consommation d'oxygène en activité de marche (Froget et al. 2001) mais également au repos à terre, et ce, à différentes températures ambiantes (Froget et al. 2002). Il est à signaler que les études précédentes soulignent un effet de la condition corporelle des individus sur cette relation (Froget et al. 2002; Fahlman et al. 2004). L'établissement de la relation entre la fréquence cardiaque et la consommation d'oxygène a permis d'étudier le métabolisme du manchot royal pendant les différentes phases d'activité en mer : durant les séquences de plongée, durant la nuit de repos en mer,

et plus spécifiquement durant la réaugmentation des températures entre ces deux périodes (Froget et al. 2004).

Chez le manchot royal, la fréquence cardiaque moyenne durant la séquence de plongée est proche de la fréquence cardiaque à terre, et peut être **inférieure de 76%** à celle d'un individu au repos dans l'eau (Froget et al. 2004 ; Table 3). Ces résultats confirment une réduction du métabolisme en plongée qui, lui-même, découlent de l'hétérothermie régionale provoquant l'hypothermie de certains tissus (Handrich et al. 1997; Schmidt et al. 2006). En revanche, ils ne supportent pas le fort pourcentage de plongée effectuée au-delà de l'ADLc qui avait été surestimée (Kooyman et al. 1992a).

De plus, les mesures de fréquence cardiaque et l'estimation du métabolisme ont révélé une grande disparité entre les séquences de plongées durant le jour et la période en surface durant la nuit. En accord avec les précédentes études (voir Table 1) et avec les contraintes thermiques du milieu aquatique, le manchot royal exprime une élévation moyenne du taux métabolique de 83% en mer comparativement à celui à terre en condition naturelle (Froget et al. 2004 ; Table 3).

Table 3 : Fréquence cardiaque de manchot royaux à terre et en mer et estimé du taux métabolique corrigé par la masse des oiseaux. Adapté de Froget et al. 2004

Période	Fréquence cardiaque (battement.min ⁻¹)	Métabolisme estimé (W.Kg ⁻¹)	Multiple de métabolisme à terre
A terre	87.2	3.15	0
Pendant la plongée	123.5	5.44	1.73
1er heure post-plongée	168.7	8.29	2.63
Suite de la post-plongée	136.7	6.24	1.98
Total de la post-plongée	141.6	6.54	2.08
En mer	130.8	5.77	1.83

Cette hausse du métabolisme en mer ne s'explique pas uniquement par le coût énergétique des séquences de plongées. En effet, si tel était le cas, la hausse ne serait que de 73% par rapport au métabolisme à terre. Comment expliquer cette différence ? Après les séquences de plongée, nous savons que les oiseaux réaugmentent leurs températures corporelles (Figure 20). Cette réaugmentation est coûteuse et élève le métabolisme de 52% comparativement à celui de la plongée. Ainsi, elle majore de 34% la moyenne globale du métabolisme mesuré en mer, qui passe donc de 73 à 107 % (Froget et al. 2004 ; Figure 21).

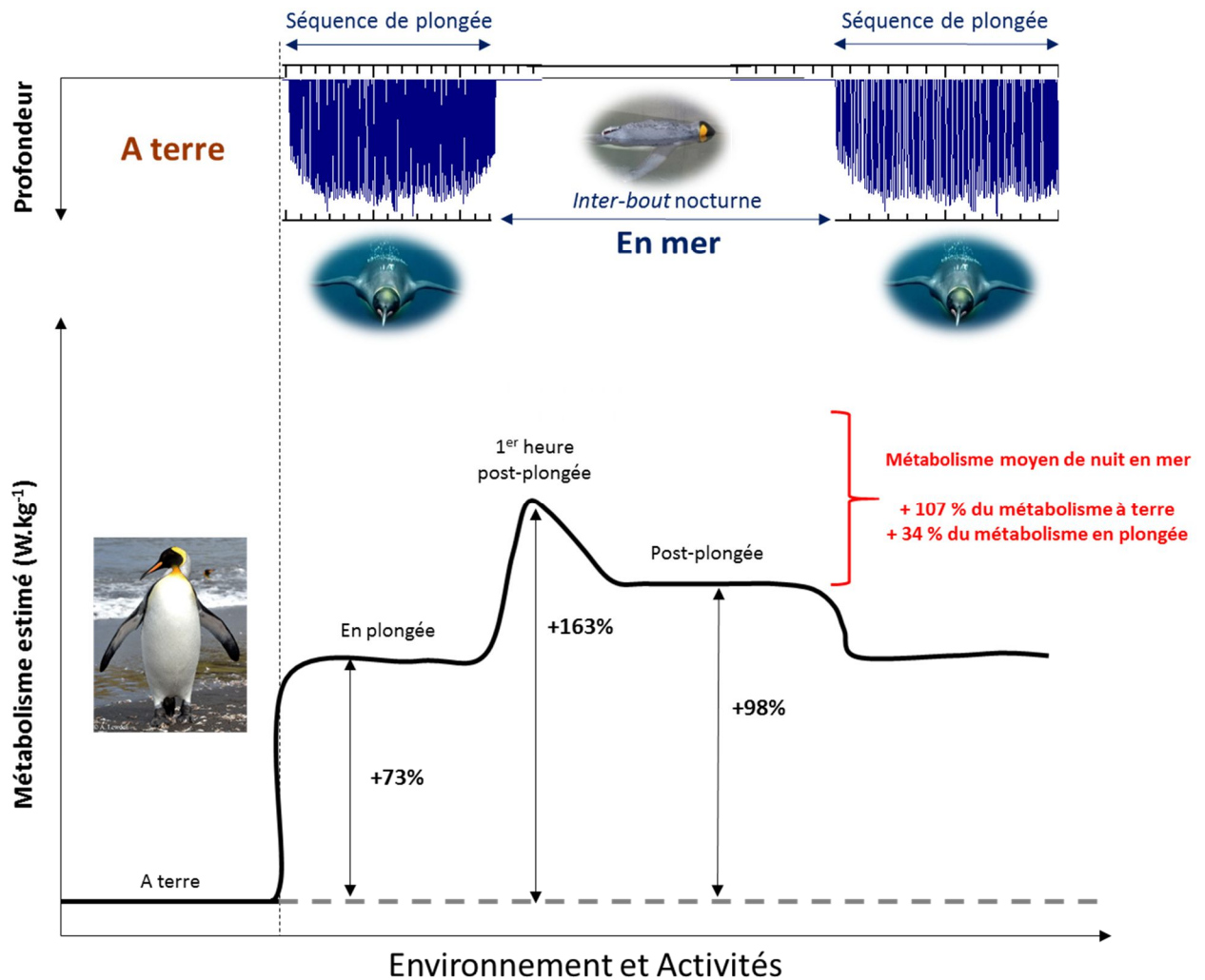


Figure 21 : Comparaison du métabolisme estimé à terre par rapport au métabolisme en mer (bleu) durant le jour en période de plongée (bleu claire) et durant la nuit lorsque les individus se reposent à la surface de l'eau (bleu foncé). Indépendamment des variations qui impactent le métabolisme moyen en mer et le métabolisme moyen en mer durant la nuit, le métabolisme en mer est systématiquement supérieur d'au moins 73% à celui mesuré à terre

Cette réaugmentation des températures jusqu'à la normothermie induit un surcoût énergétique **paradoxal** pour une période de repos (Handrich et al. 1997; Schmidt et al. 2006; figure 20). Qui plus est, le maintien de ces températures corporelles à normothermie durant toute la période de repos à la surface de l'eau induit également un métabolisme supérieur à celui mesuré pendant l'activité diurne de plongée (Froget al. 2004; Tableau 3). Selon l'hypothèse la plus évidente, ce serait une augmentation très importante des pertes de chaleurs périphériques, liée à la différence de température entre la peau et l'eau de mer (à 5-7°C en surface) qui engendrerait ce paradoxe.

2. Le paradoxe du manchot royal

Pour rappel, le **paradoxe de la normothermie nocturne du manchot royal en mer** exprime un métabolisme plus élevé durant la période de repos en mer avec des températures corporelles maintenues stables à normothermie comparativement à la période diurne de plongée, une période d'activité durant laquelle certains tissus sont maintenus en hypothermie (Figure 22).

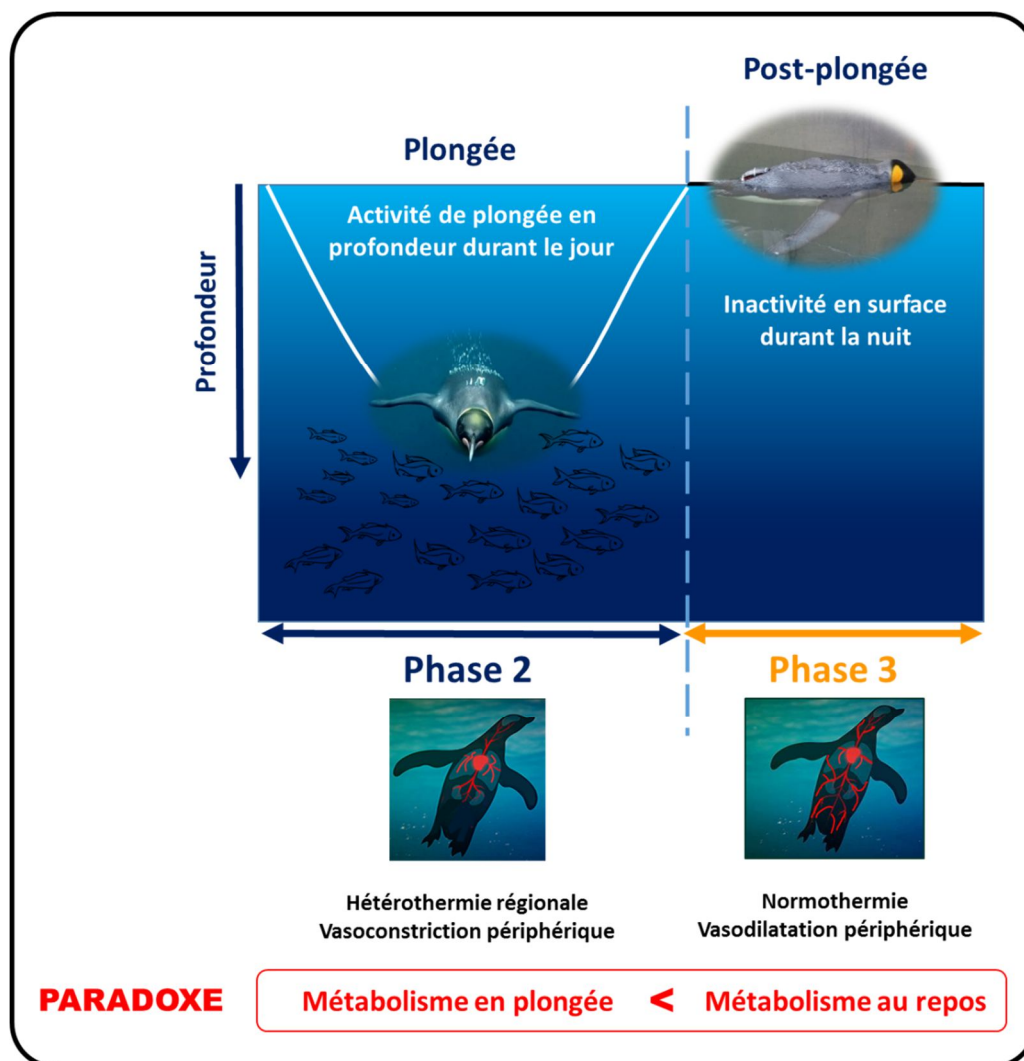


Figure 22 : Représentation schématique du paradoxe du manchot royal (voir texte plus haut pour plus de détails)

Deux hypothèses principales ont été suggérées dans la littérature (Froget et al. 2004; Fahlman et al. 2004) pour tenter d'expliquer ce paradoxe. Ces deux hypothèses tendent à comprendre la valeur adaptative d'une telle réaugmentation des températures corporelles périphériques sachant que lors de l'explication nous avons évoqué ce phénomène pendant les nuits de repos en mer (systématique) mais qu'il peut également avoir lieu pendant les épisodes prolongés d' "inter-bout" en journée (phénomène non systématique). Il est important de noter que cette espèce pélagique peut rester en mer à des centaines de km de la côte, et ce pendant des périodes pouvant dépasser 4 mois (*i.e.* au cours de l'hiver austral).

La première hypothèse aborde ainsi le problème sous l'angle des contraintes induites par l'**activité de plongée** et le problème de sur-saturation d'azote et de risque d'**décompression** évoqué précédemment. Cela concerne donc les épisodes de pause entre les séquences de plongées profondes rencontrés en journée.

La deuxième hypothèse aborde quant-à-elle le problème sous l'angle de **la nutrition**. En effet, l'activité de plongée bien que physiologiquement contraignante et avant tout une activité de recherche alimentaire. Ainsi, suite à l'ingestion de proies et au processus de digestion, les individus doivent stocker les produits de cette digestion circulant dans le sang (principalement les acides gras libres ou FFA pour "*free fatty acid*").

Avec la preuve que la digestion pouvait avoir lieu simultanément à l'activité de plongée durant la journée (Handrich et al. 1997), on peut s'attendre à ce que les FFA soient présents dans le sang des individus et qu'ils s'y accumulent avant leur transfert dans les tissus adipeux abdominaux et sous-cutanés. Or, de par la vasoconstriction périphérique générale durant la plongée matérialisée par des températures cutanées basses, on peut supposer que le tissu adipeux sous-cutané, principal lieu de stockage des lipides chez les manchots (Cherel et al. 1988a) est peu, voir non-vascularisé.

Ainsi, l'hypothèse est que la re-perfusion paradoxale de la périphérie pendant la phase de repos nocturne serait le coût à payer pour reconstituer les réserves adipeuses dans ce tissu périphérique. Cela pourrait également avoir lieu pendant les périodes d'"*inter-bout*", quand celles-ci sont assez longues pour permettre un réchauffement suffisant de la peau. Il est à noter que cette deuxième hypothèse présente deux bénéfices en réponse à une augmentation des coûts de thermorégulation : tout d'abord (1) la reconstitution des réserves énergétiques mais également (2) l'épaississement concomitant de la couche isolante de graisse, permettant une réduction des pertes caloriques dans l'eau lorsque la vasoconstriction périphérique est en place.

3. Définition des objectifs de ma thèse

Les objectifs de cette thèse sont au nombre de 3 et se divisent en deux grandes parties représentant un total de 4 chapitres et d'une étude complémentaire. La première partie correspond aux études menées sur des individus maintenus en piscine tandis que la deuxième partie correspond aux mesures effectuées sur des individus à terre.

3.1 Partie 1 : Mesure des individus en piscine

Le premier objectif de cette thèse a été d'explorer les deux hypothèses, amenées précédemment dans la littérature, en condition de captivité chez le manchot royal. Dans un premier temps, les individus équipés, de façon chirurgicale, d'enregistreurs de températures, disposés à quatre localisations différentes, ont été maintenus dans une piscine d'eau de mer.

Chapitre 1 : Le premier chapitre de ma thèse aborde le paradoxe de la normothermie nocturne sous l'angle de la nutrition avec des individus maintenus dans l'eau froide et **nourris** durant la journée. Ainsi, ce dispositif permet de reproduire, au moins durant la nuit, les conditions rencontrées en milieu naturel. En effet, dans les deux environnements (*i.e.* naturel et expérimental) les manchots après une journée d'alimentation passent la nuit à la surface de l'eau.

Les buts de cette étude sont de déterminer si les épisodes de normothermie nocturne sont toujours exprimés en l'absence d'activité de plongée durant la journée (Figure 23) et s'il a des variations de la durée de ces épisodes en fonction de la condition corporelle des individus.

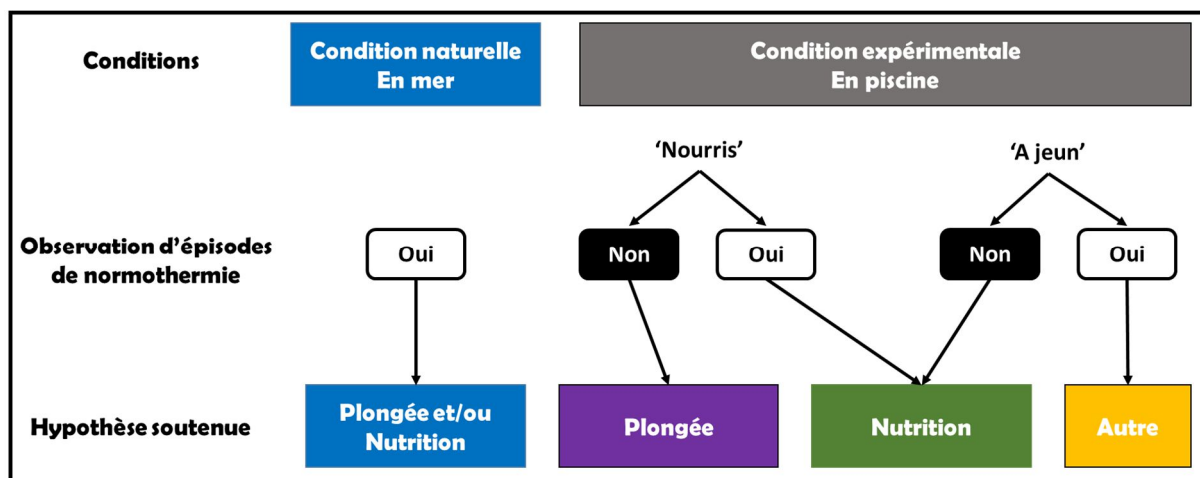


Figure 23 : Représentation simplifiée des différentes hypothèses soutenues en fonctions de l'observation d'épisodes de normothermie nocturne sur des individus mesurés en condition naturelle ou en condition expérimentale

Chapitre 2 : Le second chapitre aborde également le paradoxe du manchot royal sous l'angle de la nutrition mais, cette fois-ci, en mesurant des individus maintenus **à jeun** en piscine. En effet, le but de cette étude est de valider ou non l'hypothèse de la nutrition apportée par la littérature. L'absence d'épisode de normothermie chez des oiseaux à jeun confirmerait l'utilisation de la vasodilatation périphérique à des fins de stockage des lipides après une période d'alimentation (Figure 23).

Le deuxième objectif de thèse abordé par ce chapitre 2 est de mesurer les **dépenses énergétiques** chez des individus à jeun exprimant des températures périphériques variables. Ainsi le coût de thermorégulation dans l'eau en fonction de la température périphérique, et en l'absence d'activité de digestion, sera étudié au cours de ce chapitre.

Etude complémentaire : Les deux premiers chapitres étant basés sur des données mesurées avec des individus en captivité, le troisième chapitre a pour but d'étudier l'effet des conditions expérimentales et de la **manipulation humaine** sur le comportement, la fréquence cardiaque et les températures des oiseaux.

3.2 Partie 2 : Mesure des individus à terre

La deuxième partie du manuscrit fait référence à des mesures effectuées à terre avec des individus en condition expérimentale et naturelle permettant différents types de mesures. En effet, le troisième objectif de cette thèse est d'étudier les coûts associés à la réaugmentation des températures. Il est cependant difficile de déterminer précisément les périodes de réaugmentation des températures périphériques chez des oiseaux dans l'eau. C'est pourquoi nous avons mesuré les oiseaux lorsque nous

étions sûrs qu'ils étaient en période de réaugmentation. Cette période correspond à la sortie de l'eau des individus avec un retour de la température des tissus à normothermie sans pour autant connaître le délai de cette récupération.

Chapitre 3 : La **dynamique** et l'**énergétique** impliquée dans la réaugmentation des tissus après une période d'hypothermie ont été étudiées dans le cadre du chapitre 3. En effet, en lien avec la réaugmentation des températures périphériques mesurée pendant l'inactivité des individus en mer et avec l'hypothèse liée à la nutrition, une des études précédentes de notre équipe a suggéré un effet de l'état nutritionnel sur le coût de réaugmentation des températures corporelles (Halsey et al. 2008). Cependant cette dernière n'a pas pu mesurer les températures périphériques. Ainsi, j'ai étudié en captivité la réaugmentation de trois tissus périphériques et de la cavité abdominale après la sortie de l'eau des individus. Les buts de cette étude sont de déterminer l'ordre de réchauffement (*i.e.* dynamique) des tissus en fonction de leur position (interne ou périphérique) mais également le coût énergétique associé à ce réchauffement chez des individus, en fonction de leur état nutritionnel, récupérant d'une hypothermie induite par une période prolongée en eau de mer.

Chapitre 4 : Pour finir, le dernier chapitre s'est focalisé sur l'utilisation des « **fenêtres thermiques** » chez le manchot royal lors de la réaugmentation des températures corporelles consécutives à la sortie de l'eau. Cette étude a été menée simultanément sur des individus maintenus en condition expérimentale et sur des individus non-dérangés en colonie. A l'aide d'une caméra thermique, les températures des zones corporelles connues pour des ajustements d'échanges thermique périphériques, aileron et pattes, ou non-isolées, bec et œil, ont été mesurées. En condition expérimental, les mêmes paramètres ont été étudiés avec des températures internes mesurées en dessous et à normothermie.

II

Matériel & Méthodes



A. Site d'étude

Terres Australes et Antarctiques Françaises

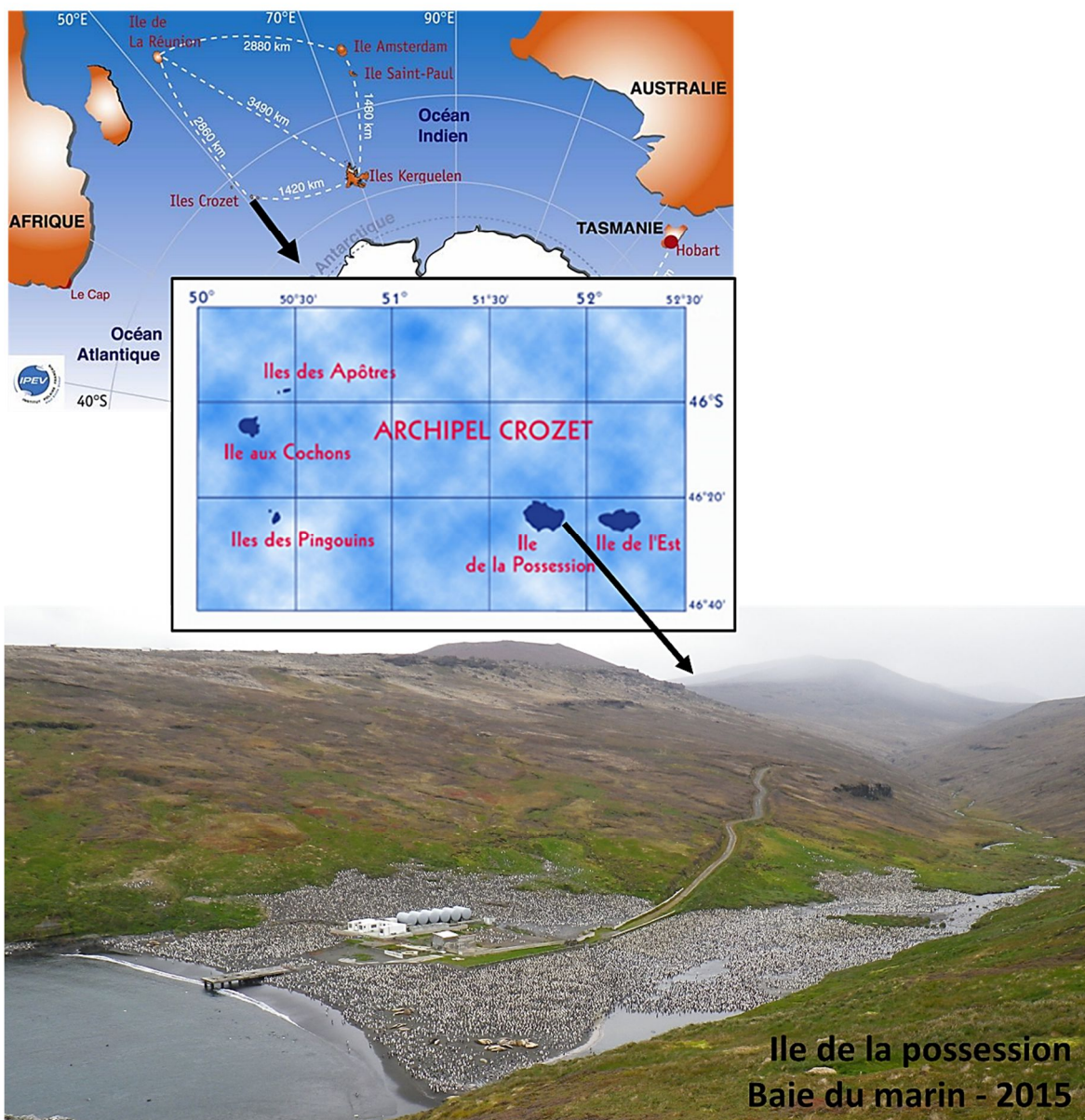


Figure 24 : Position de l'île de la possession dans les terres australes et Antarctiques françaises

Situé au sein des Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF), l'archipel de Crozet (46°25' S, 51°51' E) (Figure 24) abrite 50% de la population mondiale avec 612 000 couples durant la saison de reproduction. L'île de la possession, l'une des îles composant l'archipel, regroupe pas moins de 79 700 couples (Weimerskirch et al. 1992) dont 16 000 couples en colonie de baie du marin (Delord et al. 2004). Les températures moyennes sur l'île de la Possession sont de 5°C avec une moyenne de -3°C en hiver et de +7°C en été. C'est également une île exposée au vent avec des pointes pouvant aller jusqu'à 180 km.h⁻¹.

Plusieurs bâtiments, situés au sein de même de la colonie de manchot royal, permettent de réaliser de nombreuses études scientifiques et d'avoir accès à des installations permanentes telles qu'une salle de chirurgie et un laboratoire avec un accès à l'eau et à l'électricité (Figure 25). De plus, une autorisation spéciale soumise à une réglementation stricte a permis d'installer de façon temporaire une piscine et un système de respirométrie afin de pouvoir mettre en place les études présentées dans le cadre de mon projet de thèse.

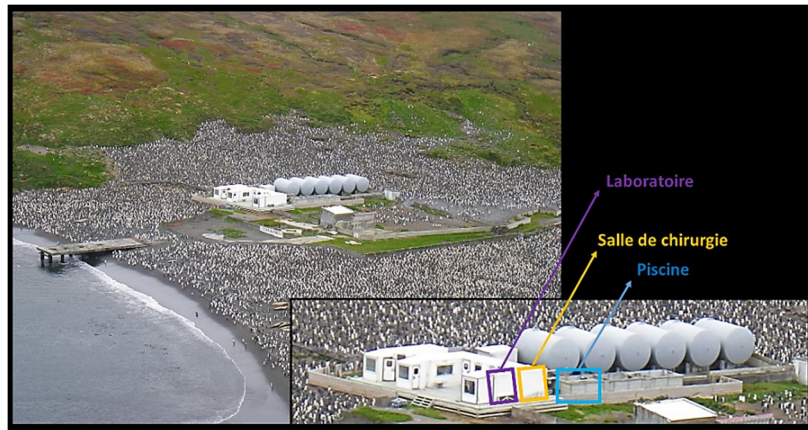


Figure 25 : Installations scientifiques et logistiques présentes en Baie du marin

Ainsi, les données présentées pour les études de ce manuscrit ont été collectées durant 4 sessions de terrain, de Novembre à Janvier, de 2013 à 2017. J'ai été présente sur les trois premières sessions et ai guidé la quatrième à distance.

B. Présentation du modèle d'étude

La famille des manchots (*Sphéniscidés*) est composée de 6 genres pour un total de 18 espèces (Figure 26). Des plus petites aux plus grandes on trouve le groupe des *Eudyptula* (manchot pygmée, à ailerons blancs), les *Sphenicus* (manchot du Cap, de Magellan, Humboldt, Galápagos), les *Eudyptes* (gorfous de Fiorland, Schlegel, de Moseley, sauteur, macaroni et huppé), les *Megadyptes* (manchot antipode), les *Pygoscelis* (manchot à jugulaire, Adélie et Papou) et les *Aptenodytes* (manchot royal et empereur).

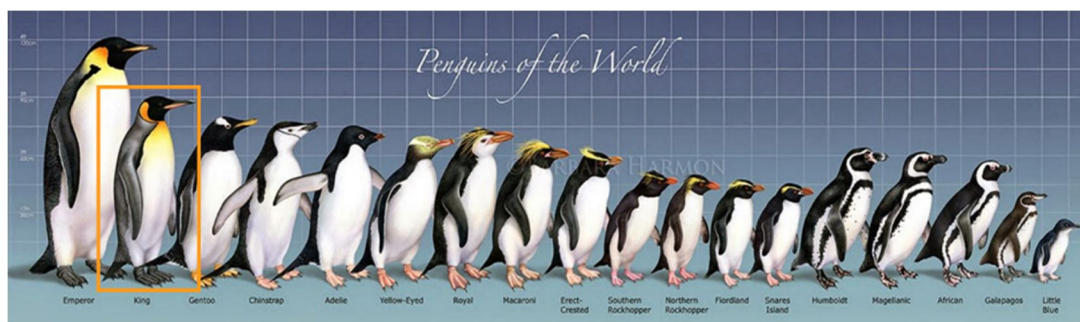


Figure 26 : Représentation des 18 espèces de manchots présentes actuellement sur terre

Du haut de ses 90 cm et avec une moyenne de 12.5 Kg, le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) est la deuxième plus grande espèce de manchots, juste derrière le manchot empereur (*Aptenodytes forsteri*) (Figure 26). Le genre *Aptenodytes* est dérivé du grec ancien qui signifie "sans capacité de voler", bien que tous les manchots "volent sous-l'eau".

1. Biologie de l'espèce

Le manchot royal est une espèce longévive qui se reproduit entre les latitudes 45 et 55° Sud à une distance moyenne de 400 km du front polaire antarctique (17 colonies utilisant les îles "sub-antarctiques", situées dans l'océan Indien et Pacifique sud). Fidèle à son site de reproduction (Olsson 1997; Gauthier-Clerc et al. 2003), cette espèce est une "*central place foraging*" devant parcourir des centaines de kilomètres pour s'alimenter et revenir sur la colonie pour muer et se reproduire. Le régime alimentaire du manchot royal se compose principalement de petits poissons (surtout des Myctophidés ou poissons des glaces) et de céphalopodes (Cherel et Ridoux 1992; Olsson et North 1997) qu'il capture à la hauteur du front polaire antarctique, une zone de forte productivité primaire (Figure 27 ; Laubscher et al. 1993; Moore et Abbott 2000).

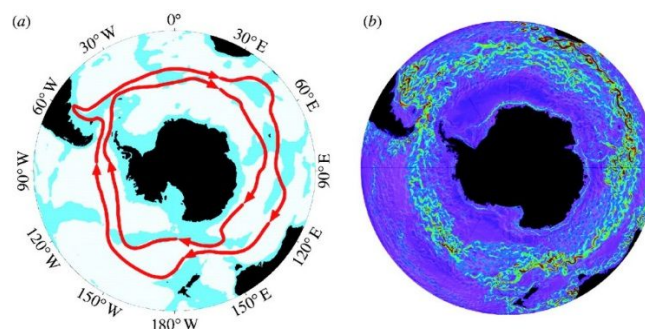


Figure 27 : Représentation des courants circumpolaires sub-antarctiques et antarctiques (A) et de la production primaire associée à la présence de ces deux courants (B). © Alchetron.com Antarctic circumpolar current

Ainsi, les individus adaptent la distance qu'ils parcourent lors de leurs voyages alimentaires en fonction de la position du front polaire (Le Maho et al. 1993; Gauthier-Clerc et al. 2001) qui peut se déplacer de plusieurs centaines de kilomètres selon les années (Bost et al. 2015). Au-delà de ces longues distances horizontales, le manchot royal se déplace également à la verticale et effectue régulièrement des plongées entre 2 et 6 min et 175 mètres de profondeur en moyenne (maximum de 9,2 min et de 343 m de profondeur (Pütz et al. 1998; Pütz et Cherel 2005)).

Le succès de l'approvisionnement alimentaire en mer est primordial car les séjours à terre des oiseaux dépendent en grande partie des réserves énergétiques qui ont été accumulées durant ces séjours en mer (Cherel et al. 1994). Ainsi, les périodes à terre sont exclusivement des **périodes de jeûne** (Cherel et Le Maho 1985; Cherel et al. 1988) et correspondent à des périodes importantes (*i.e.* reproduction et mue) du cycle biologique des manchots (Weimerskirch et al. 1992) (Box 8). Les individus de manchots royaux vivent donc en alternance entre des séjours d'alimentation **en mer** et des séjours de jeûne **à terre**,

correspondant à une alternance de deux milieux ambiants présentant des contraintes thermiques différentes.

BOX 8 : Cycle biologique du manchot royal

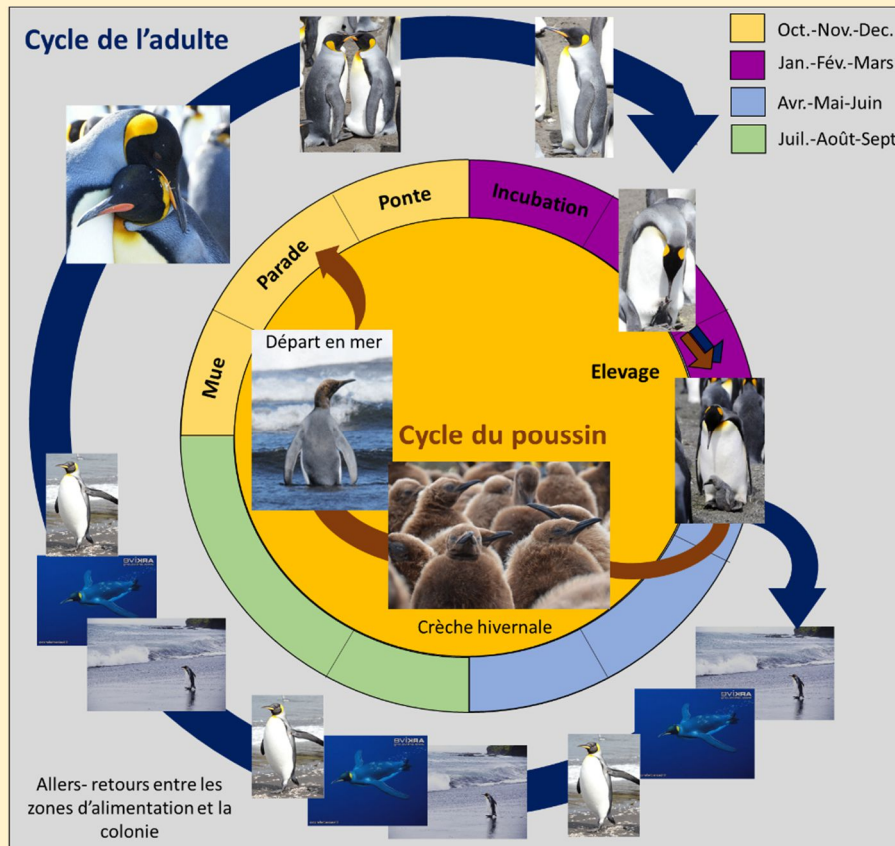


Figure H : Schématisation du cycle biologique du manchot royal. Le cycle bleu correspond au cycle de l'adulte tandis que le cycle marron correspond au cycle de la première année du poussin

Le cycle du manchot royal s'étend sur une durée de 14 mois (Figure H). Les individus viennent tout d'abord muer sur la colonie au mois d'octobre durant 2 à 5 semaines (Stonehouse 1967; Cherel et al. 1988a; Bourgeon et al. 2007) avant de repartir en mer reconstituer leurs réserves énergétiques après cette période de jeûne à terre. A leur retour, les individus vont s'apparier et la femelle va pondre un œuf unique sur un emplacement dans la colonie. Le mâle va prendre le premier tour d'incubation (Stonehouse 1960) tandis que la femelle part en mer afin de reconstituer ses réserves énergétiques consommées par la production de l'œuf. Jusqu'à l'émancipation thermique, les deux individus vont s'alterner pour l'incubation et l'élevage du poussin. Les jeunes vont ensuite se regrouper en crèche dans l'attente du retour d'un des deux adultes (Saraux et al. 2012) qui continueront à le nourrir jusqu'à son départ en mer.

La croissance du poussin n'est pas achevée alors que le mois de Mai et la saison hivernale arrivent sur la colonie. Ainsi, les juvéniles vont passer l'hiver à terre attendant le retour alternatif de leurs parents pour recevoir de la nourriture que ces derniers sont parfois allés chercher à 1000 km de la colonie (Charrassin and Bost 2001; Pütz 2002), le front polaire s'éloignant de la colonie durant l'hiver.

Au retour des beaux jours en septembre, la croissance des jeunes, arrêtée pendant l'hiver, va reprendre et se terminer par une mue. Cette mue va permettre au poussin de presque un an d'acquies un plumage imperméable pour partir en mer. Les adultes vont à leur tour muer et redémarrer une saison de reproduction.

2. Energétique du manchot royal

2.1 Réduction des pertes de chaleur

Comme la plupart des espèces marines, le manchot royal présente un plumage imperméable (mais voir Partie B2.1 en Introduction) et dense (Figure 28) composé de 32 plumes.cm² (Pap et al. 2017) permettant une bonne isolation des individus. De plus, de même que pour le manchot empereur, les plumes du manchot royal sont surmontées d'une filoplume venant renforcer la capacité d'isolation du plumage. Les pertes de chaleur sont également réduites par la couche de graisse sous cutanée qui vient exacerber l'isolation des individus faisant face à des périodes prolongées dans les eaux froides de la zone subantarctique (Figure 29).

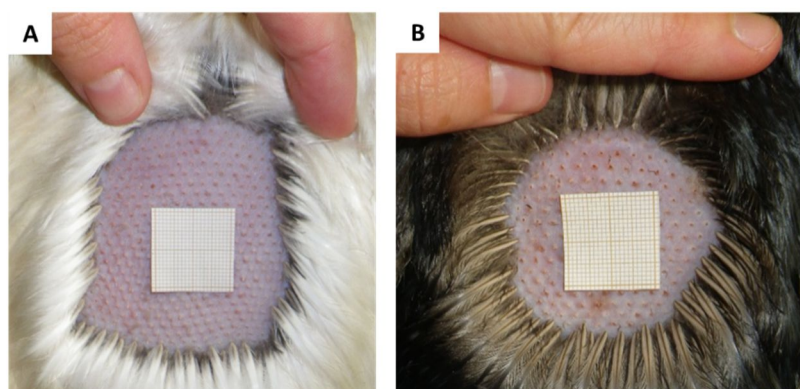


Figure 28 : Technique d'échantillonnage pour l'estimation de la densité du plumage en prélevant des plumes sur la face ventrale (A) et dorsale (B) de carcasses de manchot royal pour l'étude interspécifique Pap et al. 2017 et Osvath et al. *in prep.*

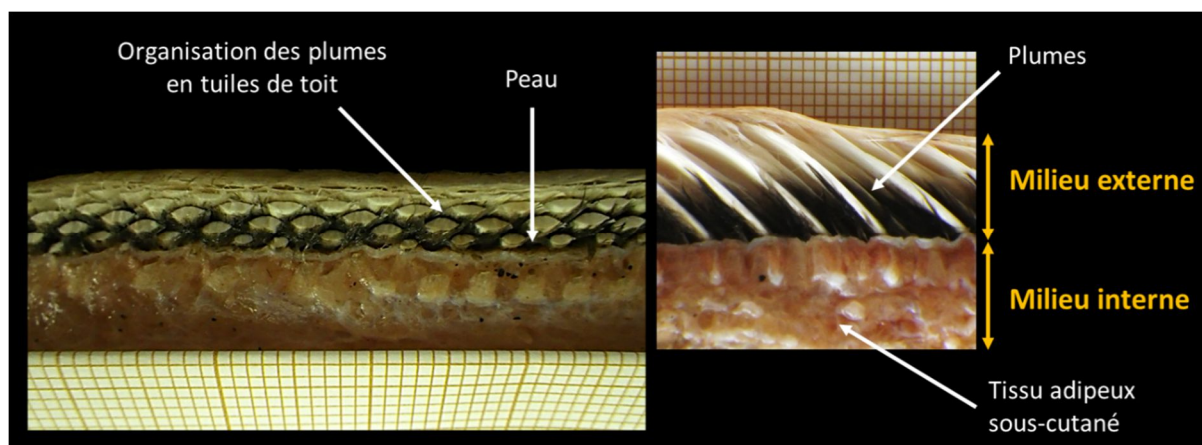


Figure 29 : Vue en coupe transversale, le tissu adipeux compose la zone sous-cutanée tandis que la face externe de la peau est surmontée de plumes

Comme évoqué en Introduction, les manchots présentent des échangeurs thermiques à contre-courant, au niveau du plexus artériel huméral de l'aile (Trawa 1970; Frost et al. 1975; Thomas et Fordyce 2007 ; Figure 30). Ce système de contre-courant a été identifié chez le manchot royal (Miller 1778) et est composé de 7 à 8 artères chez cette espèce. Cette caractéristique anatomique, détaillée ci-après, permet une régulation fine des pertes de chaleur au niveau de la surface de l'aile (*i.e.* fenêtre thermique) qui a fait l'objet de l'étude présentée en Chapitre 4. Il semble que la mise en place de cette

structure ait eu lieu il y a 49 millions d'années (Thomas et al. 2011) et permette aujourd'hui des différences de températures pouvant aller jusqu'à 30°C entre l'épaule et l'extrémité de l'aile (Prevost et Sapin-Jaloustr 1964; Ponganis et al. 2003).

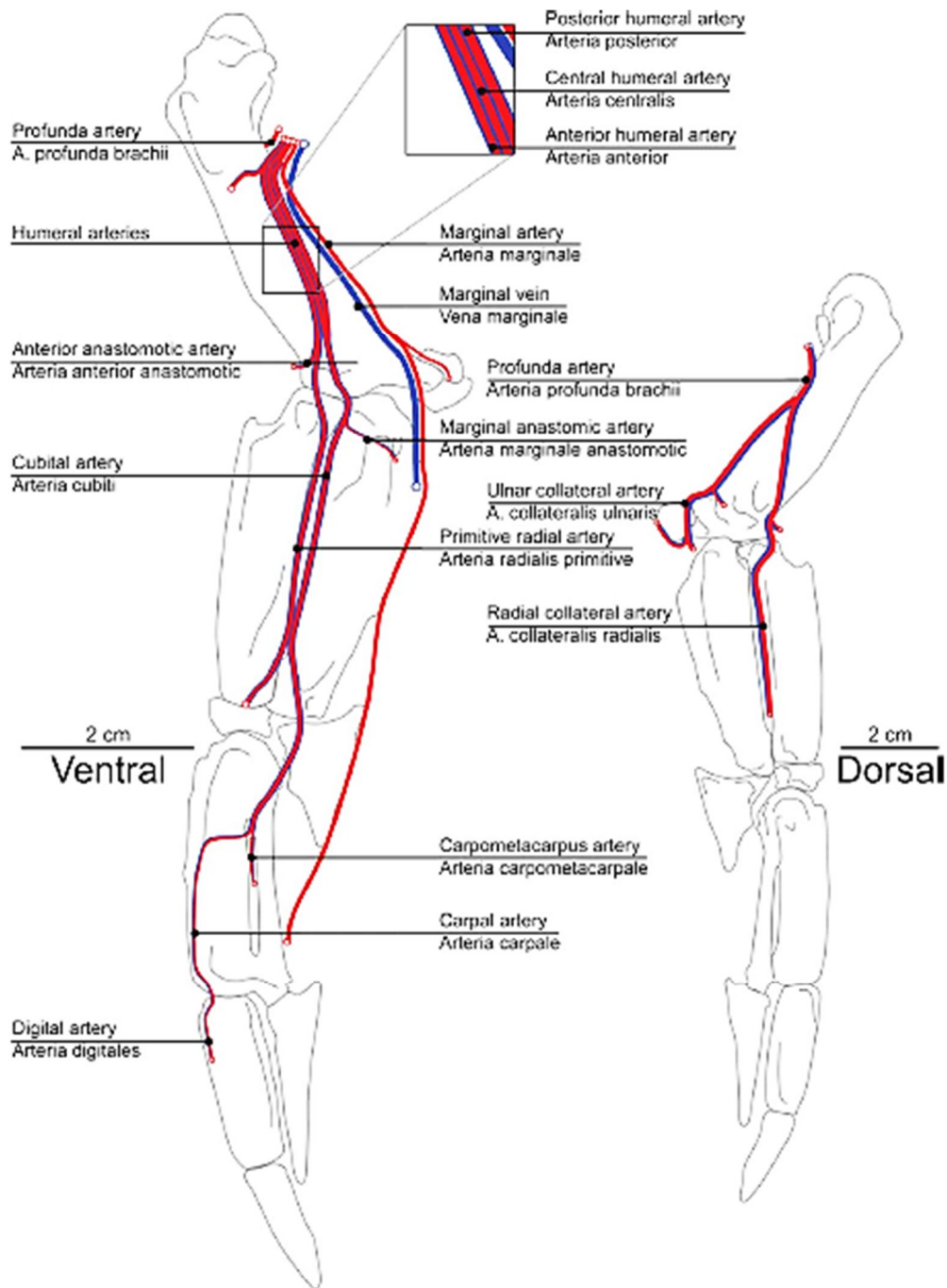


Figure 30 : Anatomie vasculaire de l'aile du gorfou huppé (*Eudiptes sclateri*) face ventrale à gauche et face dorsale à droite.

Adapté de Thomas et al. 2012

Il a été suggéré que, sous l'effet de la pression de sélection, le nombre d'artères impliqué dans le système de contre-courant augmente avec la taille des individus (Figure 31B) fournissant aux espèces de plus grande taille un meilleur système de rétention de la chaleur (Thomas et al. 2012). De plus, il a également été montré un lien entre le nombre d'artères et la température de l'eau sachant que les espèces de

manchots semblent respecter la règle de Bergmann avec les manchots de plus grande taille vivant dans les régions les plus froides (Figure 31A).

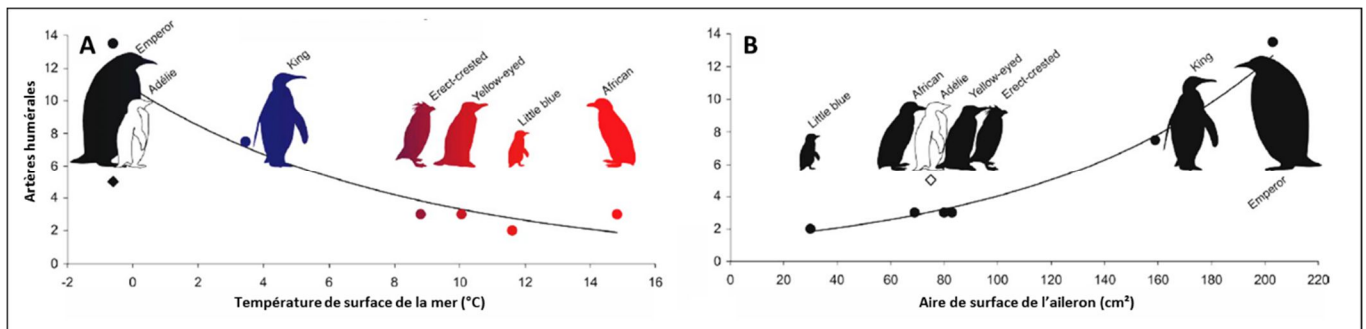


Figure 31 : Relation entre le nombre d'artères humérales et la température de l'eau autour du site de reproduction (A) et le nombre d'artères humérales en fonction de la taille et de l'aire des ailerons (B). Adapté de Thomas et al. 2012

Ce système de contre-courant a également été décrit au niveau du cou et des jambes (Frost et al. 1975). Enfin, il est pertinent de noter que le système vasculaire est moins ramifié au niveau des membres qu'au niveau de la zone sous-cutanée du tronc. En effet, il n'y a pas de tissu adipeux ni au niveau des ailerons ni au niveau des pattes (Figure 32) et donc pas de ressources énergétiques à mobiliser au niveau des membres au moyen d'une vascularisation développée. Il est important de souligner cette information anatomique qui est abordée plus en détail dans le cadre du Chapitre 4.

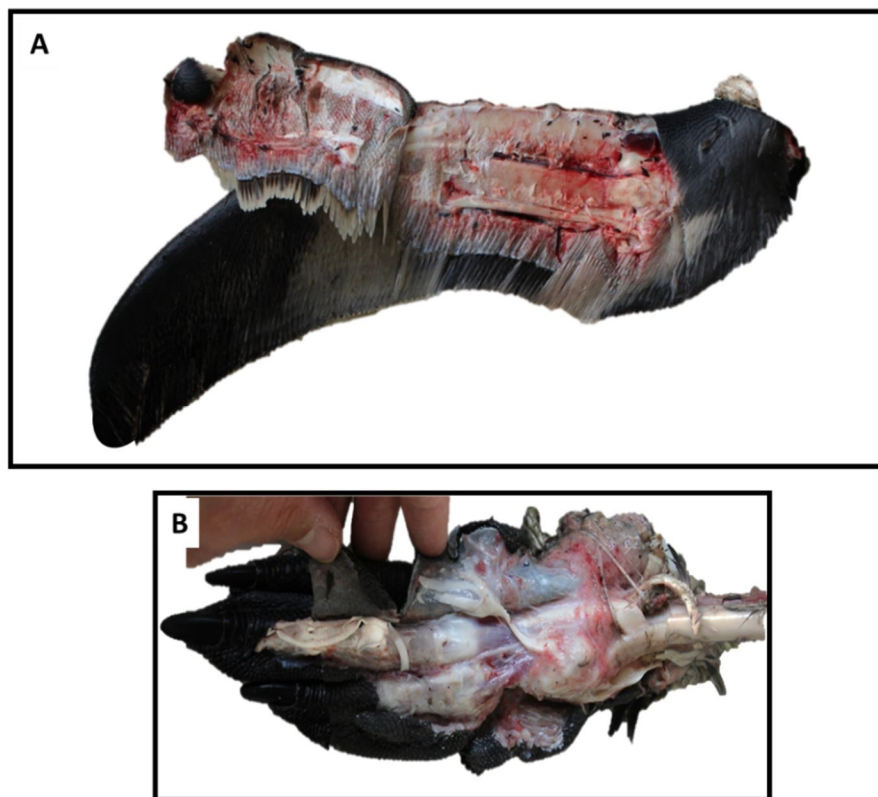


Figure 32 : Dissection de membres de manchot royal. La dissection de l'aile (A) a révélé la position du principal réseau de vaisseau sanguin et l'absence de tissu adipeux ainsi qu'au niveau du pied (B)

2.2 Métabolisme de la thermogénèse

Le taux métabolique du manchot royal en condition naturelle (FMR pour "*field metabolic rate*") dans l'eau est entre 3 à 4 fois supérieur au BMR (Kooyman et al. 1982; Barré et al. 1986). Cette augmentation doit alors être soutenue par une mobilisation plus importante de l'énergie disponible dans l'organisme.

Ainsi, l'activité de thermogénèse chez les oiseaux, semble être sous la stimulation du glucagon qui joue un rôle lipolytique (Duchamps et al. 1999), soit une mobilisation des lipides. En effet, les lipides représentent le principal substrat énergétique utilisé par le muscle squelettique lors de l'acclimatation au froid (Himms-Hagen 1972; Vallerand et Jacobs 1992). Son utilisation a notamment été démontrée lors de l'augmentation de la thermogénèse chez des manchots royaux acclimatés (Talbot et al. 2004). De plus, l'injection de triglycérides, chez des juvéniles de manchots royaux, induit une augmentation du métabolisme de repos. Cette augmentation est attribuée non seulement à l'activité du muscle squelettique mais également à d'autres tissus tel que le foie. En effet, la régulation de ce dernier est dépendante des lipides et participe donc partiellement à l'augmentation des dépenses énergétiques chez les oiseaux (Teulier et al. 2012). Ainsi, l'action lipolytique du glucagon, permettant la mobilisation des acides gras, pourrait stimuler l'activité des protéines découplantes impliquées dans l'oxydation de ces acides gras et dans la production de chaleur sans frissonnement (Roussel et al. 2000; Talbot et al. 2004; Rey et al. 2010).

Constituant le stock de triglycérides, le tissu adipeux, principalement situé en position sous-cutanée chez le manchot royal (Cherel et al. 1993), joue alors un rôle important dans le maintien du taux d'acides gras plasmatiques. Effectivement, le changement de couleur du tissu adipeux initialement blanc vers une couleur plus rosée lors de l'acclimatation au froid des individus, suggère une augmentation de la vascularisation de ce tissu (Barré et al. 1986b) et donc une mobilisation des triglycérides à cet endroit.

2.3 Métabolisme du jeûne

Alors que les réserves énergétiques prennent part de façon prépondérante dans le métabolisme de production de chaleur, ces dernières vont diminuer durant les périodes de jeûne. Or, les manchots royaux font face à deux types de jeûne au cours de leur vie : Le jeûne durant l'hiver de leur 1^{ère} année de vie et le jeûne à l'âge adulte au cours de chaque saison de reproduction.

La diminution des réserves énergétiques est relativement lente chez le manchot royal. Tout d'abord, la phase II du jeûne (Box 9) est très longue pouvant s'étendre sur plusieurs mois (Cherel et Le Maho 1985). De plus, la perte de masse quotidienne, correspondant à 6,3 g.kg⁻¹ par jour chez le poussin en hiver et entre 9,3 et 20,1 g.kg⁻¹ par jour chez l'adulte respectivement durant la saison de reproduction et la mue, reste relativement faible comparativement à d'autres espèces d'oiseaux (Cherel et al. 1987; Cherel et al. 1988a; Cherel et al. 1988b; Mata et al. 2001) et au rat par exemple (34 g.kg⁻¹ par jour).

A- Au stade poussin

Les poussins de manchot royal passent le premier hiver de leur vie à terre faisant face à des périodes de jeûne pouvant aller jusqu'à 5 mois (Cherel et Le Maho 1985). Les juvéniles peuvent perdre jusqu'à 74% de leurs réserves corporelles (Le Ninan et al. 1988) soulignant le challenge énergétique de cette période et de nombreux poussins ne survivent pas à cette période critique de leur développement (Stonehouse 1960). D'ailleurs plusieurs mécanismes d'économie d'énergie sont mis en place durant ce jeûne prolongé tels que : le ralentissement de la croissance (Stonehouse 1960), l'épargne des protéines (Cherel et Le Maho 1985; Le Ninan et al. 1988; Corbel et al. 2008) l'ajustement du métabolisme cellulaire (Monternier et al. 2014) mais également l'utilisation de l'hétérothermie (Eichhorn et al. 2011).

B- Au stade adulte

Les périodes de jeûne peuvent se prolonger chez le manchot royal adulte sur plusieurs semaines notamment durant la période d'incubation de l'œuf à terre. Ainsi, il a été démontré que, durant cette période de restriction énergétique, les individus étaient capables de réduire leur métabolisme (Le Maho et Despin 1976). De même que chez les poussins (Eichhorn et al. 2011), une réduction des coûts de thermorégulation s'opère également par la réduction des températures corporelles (Fahlman et al. 2005). De plus, une diminution de la fréquence cardiaque a été observée au cours de la période d'incubation (Viblanç et al. 2014).

2.4 Métabolisme de la plongée

Le métabolisme du manchot royal lors de la plongée (Figure 20,21) mais également après les séquences de plongée (i.e. Paradoxe du manchot royal ; Figure 22) montre également des caractéristiques spécifiques à cette espèce. Ayant conduit à la problématique de ma thèse et ayant été largement abordé dans l'introduction (Partie D2.4 La plongée chez les manchots), cette partie ne sera pas redéveloppée ici.

BOX 9 : Différentes phases du jeûne chez le manchot royal

Les trois phases du jeûne peuvent facilement être identifiables par la perte de masse chez les manchots royaux (Le Maho et al. 1983; Cherel et Le Maho 1985a; Cherel et al. 1988a; Figure I) mais ces trois phases représentent également des modifications au niveau du métabolisme (Cherel et al. 1999; Le Maho et al. 1988; Groscolas et Robin 2001).

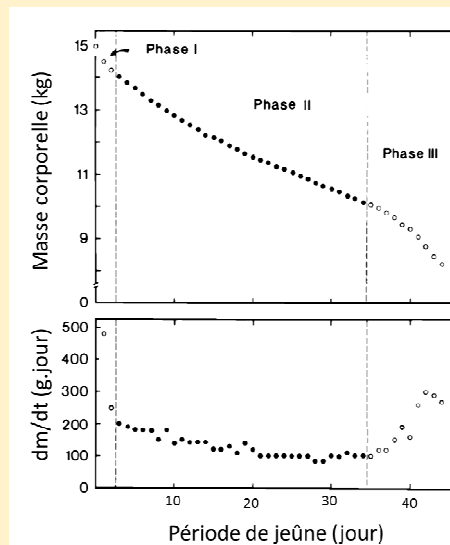


Figure I : Trois phases caractérisées par la masse corporelle et le changement de perte de masse quotidienne (dm/dt) par rapport au temps de jeûne chez le manchot royal. Adapté de Cherel et al. 1988

Phase I : La première phase du jeûne correspond à une courte période au début du jeûne. Cette phase est caractérisée par une diminution rapide de la masse liée à une augmentation de la mobilisation des lipides face à une utilisation restreinte des protéines.

Phase II : La conservation des protéines caractérise la deuxième phase du jeûne qui est la phase la plus longue (Cherel et al. 1988a ; Figure I). Ainsi, lors d'un jeûne prolongé, l'utilisation des lipides se fera de façon préférentielle avec une conservation relative des protéines corporelles (Le Maho et al. 1988; Cherel et al. 1994). Cette phase prend fin lorsque le seuil limite bas des stocks de graisse est atteint (Cherel et al. 1999; Le Maho et al. 1988; Groscolas et Robin 2001). Il est à noter que la perte de masse est plus lente durant cette phase (Cherel et al. 1988a ; Figure I).

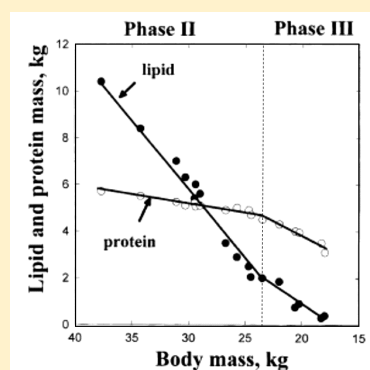


Figure J : Total de la masse des lipides et des protéines diminuant de façon linéaire par rapport à la diminution de la masse au cours du jeun chez le manchot empereur (*Aptenodytes forsteri*). Adapté Groscolas et Robin 2001

Phase III : La troisième phase correspond à une modification de la production d'énergie. En effet, simultanément à une accélération du catabolisme des protéines, s'opère une diminution de la contribution des lipides à la production d'énergie (Le Maho et al. 1988; Cherel et al. 1999; Groscolas et al. 2001). L'entrée en phase III est également accompagnée d'un changement au niveau des hormones avec une augmentation de la circulation de glucocorticoïdes possiblement liée à la stimulation de la dégradation des protéines (Cherel et al. 1988b).

Si la phase III du jeûne se poursuit, alors un signal de réalimentation se mettra en place avant que la diminution des réserves énergétiques chez l'individu ne devienne létale (Groscolas et Robin 2001). Les individus en colonie repartiront en mer en abandonnant l'œuf ou le poussin.

3. Activité de digestion

3.1 En mer

L'utilisation de l'hétérothermie, caractérisée par la diminution des températures de plusieurs tissus, a été mise en évidence lors des séquences de plongées chez le manchot royal (Handrich et al. 1997; Schmidt et al. 2006). Cependant, on note que cette diminution ne s'étend pas à l'estomac et que ce dernier montre des températures étant jusqu'à 20°C supérieures à la température de l'abdomen localisé à, à peine, 5cm de l'estomac (Figure 20 ; Handrich et al. 1997). Ainsi, il a été suggéré que l'activité de digestion pouvait être à l'origine de ces températures élevées et que cette activité commençait avant la fin des séquences de plongées. Lors de la dernière séquence de plongée avant le retour des adultes sur la colonie des températures différentes ont été mesurées au niveau de l'estomac. En effet, la température de l'estomac est maintenue basse durant toute la durée de cette dernière séquence contrairement aux précédentes séquences de plongées (Handrich et al. 1997). Ce résultat pourrait souligner une réduction de l'activité de digestion afin de garder une quantité de poisson intact pour l'alimentation du poussin à terre.

3.2 A terre

Etant donné l'absence de nourriture à terre pour les adultes, l'activité de digestion est totalement absente lorsque les oiseaux se trouvent dans la colonie. Et pourtant, durant la saison de reproduction, les adultes doivent être capables de nourrir le poussin dès son éclosion et même après plusieurs jours de jeûne en incubation. Ainsi, les individus mâles ont la capacité de maintenir de la nourriture quasi-intacte dans leur estomac (Gauthier-clerc et al. 2000). En effet, une étude a montré que chez le manchot royal, 90% des mâles relevant leur femelle à une période proche de la date d'éclosion avaient l'estomac plein et que 40% des mâles incubant prenaient effectivement en charge l'alimentation du poussin à l'éclosion, et même après 20 jours d'incubation (*i.e.* jeûne). Ainsi, les individus mâles sont capables de nourrir le poussin avec la nourriture des derniers repas en mer (réduction de l'activité de digestion) maintenue intacte dans l'estomac à 38°C au cours du jeûne d'incubation (Gauthier-clerc et al. 2000). Plusieurs processus sont à l'origine de ce maintien de nourriture dans un état favorable à la régurgitation tel que la température et le PH du milieu stomacal (Thouzeau et al. 2003; 2004) favorable au développement d'une flore bactérienne spécifique (*e.g.* Spheniscin ; Thouzeau et al. 2003).

C. Matériel et Méthodes

Le but principal de ma thèse étant l'étude des variations de températures périphériques et internes chez le manchot royal **dans l'eau**, la première étape a été de construire une structure (*i.e.* piscine) afin de pouvoir maintenir les oiseaux dans l'eau durant plusieurs jours consécutifs (Chapitre 1 et 2). Avant leur immersion, les manchots ont été équipés de *loggers* de températures permettant l'enregistrement des données durant toute la durée de l'expérimentation. D'autres techniques se sont par la suite ajoutées à

ce dispositif de base afin d'étudier plus en détails les coûts de thermorégulation (Chapitre 2 et 3) et la dynamique de changement de température (Chapitre 3 et 4).

1. La piscine

Afin d'étudier la thermorégulation d'individus adultes dans l'eau en fonction de l'état nutritionnel de ces derniers, une piscine d'eau de mer a été construite à l'intérieur d'un enclos en bois fermé (3x3 mètres), à ciel ouvert, à proximité immédiate de la colonie. Cette piscine mesure 2.5 mètres de long, pour 1.30 mètres de large et 1.20 mètres de haut (Figure 33A). Au cours des trois années d'expérimentation, et forte de l'expérience acquise chaque année, la piscine a évolué et s'est perfectionnée afin dans un premier temps d'améliorer le confort des individus et d'installer un système de respirométrie.

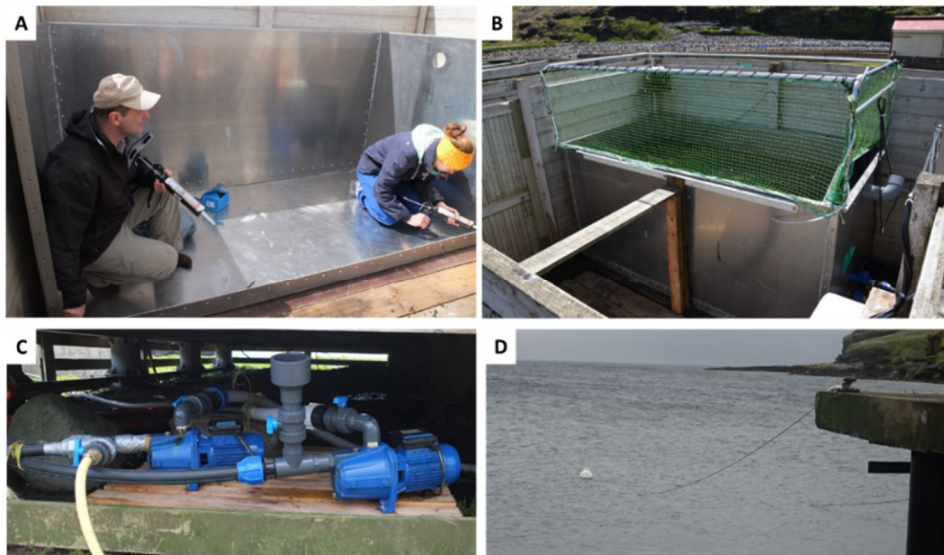


Figure 33 : Construction de la piscine (A) pour une version simplifiée la première année (B) mais comprenant déjà le mécanisme de base de renouvellement d'eau à l'aide de deux pompes (C) permettant de pomper l'eau de mer de la baie

Le principe de fonctionnement de la piscine a pour but de reproduire un environnement le plus proche possible de celui rencontré par un manchot en haute mer pendant la phase nocturne d'inactivité en surface. Dans un premier temps cet environnement correspond à une qualité de l'eau parfaite, d'un point de vue pureté et température. Ainsi, un système de pompage sophistiqué (Figure 31C) a été mis en place avec une première pompe amenant l'eau de la baie à la piscine et une deuxième pompe sortant l'eau de la piscine vers la baie (Figure 31D). Ce système a permis un renouvellement constant de l'eau de la piscine. D'ailleurs, l'enregistrement continu de la température de l'eau au cours des expérimentations, et grâce à ce système de pompage d'eau de mer, nous avons pu constater le maintien de la qualité de l'eau de mer et de sa température.

La deuxième année, un système de gouttière à débordement a été mis en place afin d'éliminer les fèces et les plumes présents à la surface de l'eau et pouvant nuire à la propreté du plumage des individus et donc impacter à la fois la flottabilité mais également l'isolation thermique de ces derniers.

Par ailleurs, un système de filet a été installé afin d'éviter toutes sorties spontanées de la piscine, pour les individus qui seraient arrivés à se hisser sur les rebords de cette dernière (Figure 31B)

Enfin la troisième année, pour mesurer le métabolisme des individus dans diverses conditions, un système d'armature portant une cloche de respirométrie (voir partie 4.1, ci-après) et empêchant le retour des manchots en surface ailleurs que sous la cloche, a été installé. Ce dispositif pouvait être relevé facilement à tout moment grâce à un système de poulies surplombant la piscine (Figure 34).



Figure 34: Piscine durant la 3ième année d'expérience, opérationnelle pour des mesures de respirométrie

2. La chirurgie

L'équipement des individus s'est fait sous anesthésie gazeuse. Le protocole de chirurgie a été mis en place et éprouvé par des vétérinaires depuis de nombreuses années. Les doses de médicaments, les procédures d'anesthésie et chirurgicales ont été adaptées à l'espèce. Toutes les anesthésies générales et les chirurgies ont été réalisées en présence d'un vétérinaire et d'assistants en tenue stérile (Figure 35).



Figure 35 : Equipement stérile lors d'une intervention chirurgicale sur manchot royal en baie du marin. L'habillement des intervenants se compose d'un calot, d'un masque, d'une blouse et d'une paire de gants stériles. On aperçoit également un champ stérile qui recouvre le sujet anesthésié

2.1. Pré-anesthésie et induction

Afin que l'individu soit dans les meilleures conditions pour la phase d'induction, une première injection de valium (diazépam) lui est faite 30 minutes avant l'induction, ainsi qu'une injection de Robinul (glycopyrrolate) afin de limiter la production salivaire durant la chirurgie et une dose de Rimadyl (caprofène) afin de prévenir l'inflammation post-opératoire. Suite à ces injections, l'individu est maintenu au calme sans dérangement.

Après un délai de 30 minutes, l'individu est amené en salle de chirurgie. Par le biais d'un masque, l'individu est maintenu sous Isoflurane et oxygène à dose élevée pendant 4 minutes afin d'induire l'anesthésie. Par la suite, l'individu sera maintenu sous anesthésie grâce à un débit constant d'oxygène mélangé à une concentration plus modérée d'Isoflurane.

L'individu est ensuite placé sur la table de chirurgie et intubé par une sonde trachéale à ballonnet préalablement induite de tronothane, un anesthésiant local. L'utilisation de ce dispositif permet d'éviter les fuites d'oxygène, de connaître la concentration exacte d'Isoflurane respirée par l'animal et d'éviter le passage d'éléments de régurgitation dans les voies respiratoires. Afin d'éviter le dessèchement de la pupille de l'ocryl-gel est déposé sur la cornée et une compresse stérile est déposée sur cette dernière afin de fournir une protection supplémentaire à l'œil. Une seconde série d'injections est réalisée, composées de Dolorex (butorphanol) afin de prévenir la douleur post-opératoire et du Marbocyl (marbofloxacine) afin de débiter la couverture antibiotique.

Enfin, des blocs de glace sont positionnés sur les pattes et sous les ailerons, des zones faiblement isolées (*i.e.* fenêtres thermiques), afin d'éviter l'hyperthermie des individus constatée en l'absence d'un dispositif de refroidissement.

2.2. Chirurgie

La zone d'implantation des loggers de température est tout d'abord déplumée sur 2 rangées de plumes et sur 2 cm de long. Après un nettoyage de la peau à l'alcool, une injection de xylocaïne adrénalisée est effectuée. En tant que vasoconstricteur, ce produit limitera les saignements lors de l'incision et limitera également la douleur sur cette zone (analgésique). Un champ stérile est ensuite disposé autour de cette zone et est désinfecté par 3 bains successifs de bétadine savon, alcool et bétadine pure. La zone ainsi dite "propre", l'implantation peut débiter.

Une incision de 1.5 cm est réalisée au milieu de la zone déplumée. A l'aide d'ustensiles chirurgicaux, une "poche" est alors créée au milieu dans le tissu adipeux sous-cutané à égale distance entre le muscle et la peau sur un plan transversal et non pas directement sous l'incision, mais en décalé sur un plan frontal. Ainsi, le logger ne se trouvera pas directement sous la zone déplumée mais bel est bien sous une zone intacte.

La zone est par la suite refermée à l'aide de points de suture résorbables. La même procédure est appliquée sur chaque zone d'implantation d'un logger.

2.3. Réveil et soins post-opératoires

Après avoir refermé la dernière zone d'implantation, le débit d'Isoflurane est baissé en gardant le même débit d'oxygène. Aux premiers signes de réveil, l'individu est désintubé et étroitement surveillé durant les premières minutes afin d'éviter toutes régurgitations qui pourraient venir obstruer les voies respiratoires. Une fois l'animal redevenu vigile, il est isolé en enclos, au calme et à l'abri du soleil. L'animal est contrôlé à distance de nombreuses fois durant l'heure suivant le réveil afin de s'assurer d'une récupération normale.

Les individus sont placés sous couverture antibiotique durant les 3 jours suivants, avec deux injections quotidiennes matin et soir. De plus, en cas d'inconfort de l'animal les premières 12h post-chirurgicales, une injection d'anti-inflammatoire et de dolorex peut être rajoutée.

3. La surveillance vidéo



Figure 36 : Moniteur situé dans le bureau/laboratoire permettant une surveillance des individus en piscine à distance et une intervention rapide en cas de besoin

Un système de surveillance vidéo a été mis en place sur toutes les expérimentations menées en piscine afin de pouvoir contrôler les individus à tout moment de la journée sans dérangement des oiseaux. Ce dispositif était composé d'une caméra (Reconyx HC600 HyperFire models) placée au-dessus de la piscine avec un angle de vue couvrant toute la surface de l'eau et d'un moniteur transmettant les images dans le bureau/laboratoire de travail (Figure 36). De plus, le moniteur a également permis l'enregistrement 24h/24 des vidéos permettant par la suite de revenir sur le comportement des individus en piscine (Etude complémentaire ; Figure 37).

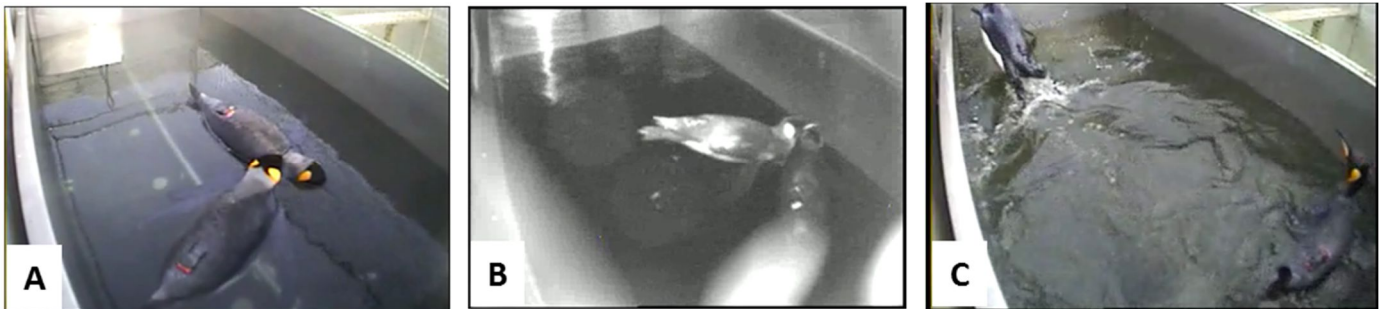


Figure 37 : Exemple d'images enregistrées par le moniteur permettant le suivi et l'étude du comportement des individus de jour (A) comme de nuit (B) avec la détermination de comportements telle que la fuite (C)

4. Mesure des températures corporelles

4.1 Températures internes

Afin d'enregistrer les températures corporelles des individus pendant toutes les phases de l'expérimentation, 4 loggers ont été implantés, 3 loggers au niveau des tissus adipeux périphériques du flanc, du dos et de la plaque incubatrice et 1 dernier logger au niveau de la cavité abdominale (Figure 38).

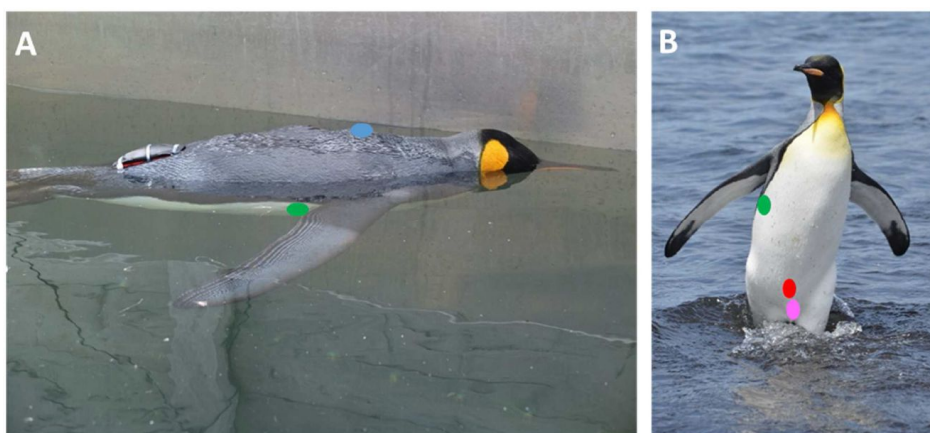


Figure 38 : Position des enregistreurs de températures détectés aux rayons X sur un individu vivant. Le logger du dos (bleu), du flanc (vert) et de la plaque incubatrice (rose) sont placés dans le tissu adipeux sous-cutané, périphérie, tandis que le logger de la cavité abdominale (rouge) est en position plus interne. Adapté de Lewden et al. 2017b

Les enregistreurs de températures ('Ibuttons', modèle MXMDS1922L-F5; AVNET183 MEMEC, figure 39) ont une résolution de $\pm 0.0625^{\circ}\text{C}$ pouvant enregistrer des températures entre $0-50^{\circ}\text{C}$ à une fréquence

d'un point toutes les 11 minutes (pour une autonomie de mémoire de 21 jours). Avec un diamètre de 17.35 mm et une épaisseur de 5.89 mm (Figure 39), pour une masse de 2.9 g, ces loggers, même au nombre de 4, n'induisent aucune gêne aux individus équipés.



Figure 39 : Evaluation de la taille réelle de quatre boutons

4.2 Températures superficielles par thermographie

La technique de **thermographie infra-rouge** est une technique de mesure non-invasive largement utilisée ces dernières années pour identifier des surfaces d'échanges thermiques (*e.g.* Tattersall et al. 2009) mais également pour étudier la thermorégulation d'individus dans différentes conditions de stress thermique (*e.g.* McCafferty et al. 2001; McCafferty et al. 2013; Van de Ven et al. 2016), de stress de capture (Jerem et al. 2015), de manipulation (Herborn et al. 2015) ou encore d'impact d'équipement d'appareils de mesures (McCafferty et al. 2007)(voir McCafferty et al. 2013 pour revue). Cette technique permet de détecter les radiations infrarouges (de longueur d'onde entre 8-12 μm) émises par tout corps dont la température est supérieure à 0°C. Cependant ces radiations étant absorbées par l'eau, il est impossible d'effectuer des mesures sous l'eau. Les images thermiques reflètent uniquement la température de surface sur une zone sans plume. Ainsi, l'œil et le bec chez les oiseaux sont des zones bien indiquées (*e.g.* chez le manchot royal; Figure 40) et largement utilisées dans les études précédemment citées.

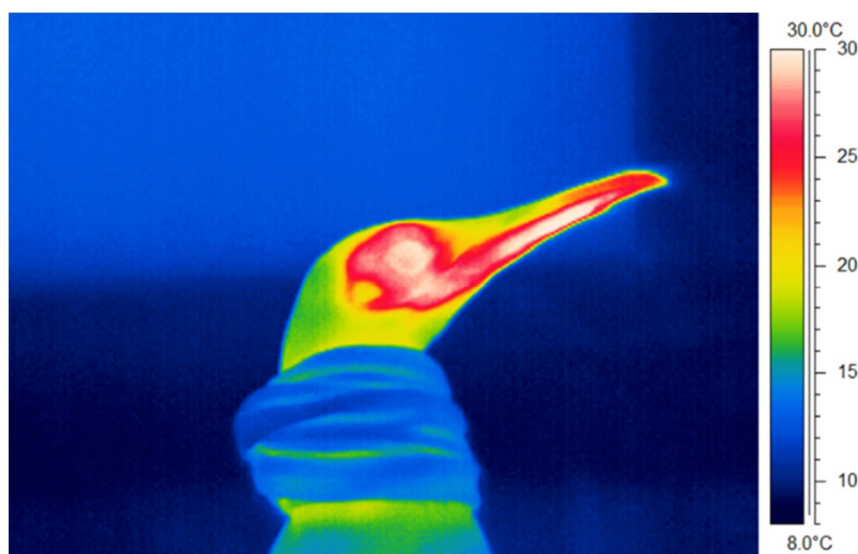


Figure 40 : Visualisation à l'aide de thermographie infra-rouge de zones d'échanges thermiques sans plume, l'œil et le bec, chez le manchot royal © A.Lewden

Cependant, due à la proximité des vaisseaux sanguins sous la surface de la peau, si cette dernière est moins bien isolée par les plumes ou le tissu adipeux (Trawa 1970; Frost et al. 1975; Despin et al 1978), les images thermiques peuvent représenter le réseau de veines sous-cutanées et refléter le degré de vasodilatation/constriction sous-cutanée (Tattersall et al. 2009; Weissenbock et al. 2010). Ainsi en raison de l'absence de tissu adipeux, les ailerons de manchots sont des candidats idéaux pour l'étude de la perfusion périphérique en période de ré-augmentation des températures (Chapitre 4).

Dans le but d'améliorer la qualité des photos thermiques, un studio photo a été aménagé au sein d'un bâtiment sur le terrain, à proximité de la colonie. En effet, cette espace clos permet dans un premier temps de s'extraire des radiations solaires et de créer un arrière-plan d'absorption et de températures uniformes. De plus, dans l'optique de standardiser la prise de photo, le studio permet également d'être à égal distance du manchot tout au long de l'expérience et à la même distance pour tous les individus mais également d'avoir le même angle de prise de vue (Figure 41).

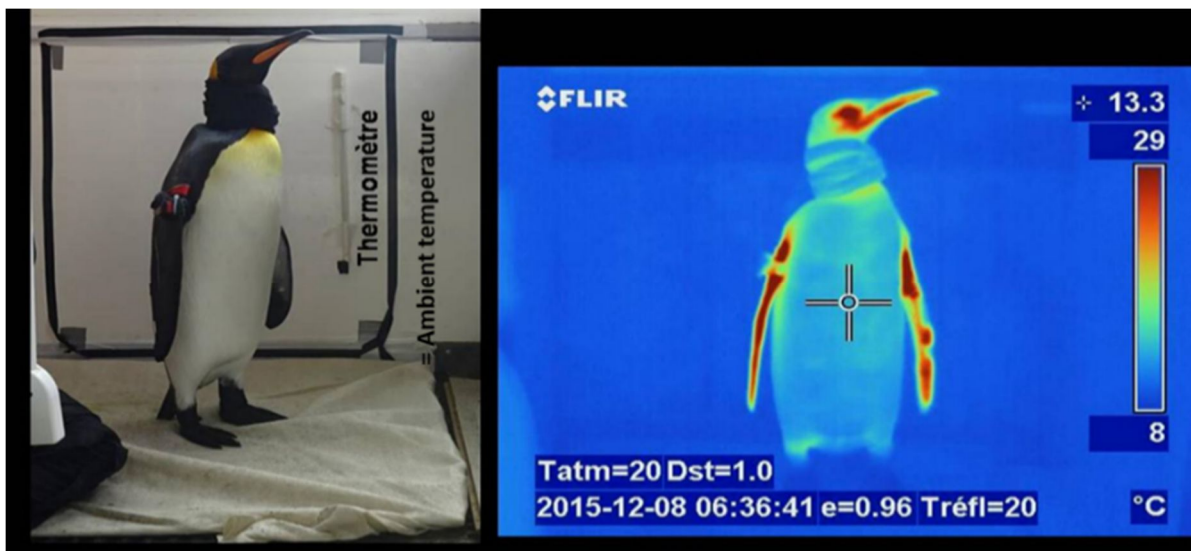


Figure 41 : Image thermique prise d'un manchot royal dans le studio photographique permettant d'obtenir un arrière-plan uniforme sans variation de température

5. Mesure de l'activité métabolique

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai mesuré l'activité métabolique de manchots maintenus dans la piscine mais présentant des températures périphériques variées (Chapitre 2) et l'activité métabolique durant des périodes de réchauffement des tissus périphériques dans l'air (Chapitre 3).

5.1 La respirométrie

La majorité de l'énergie utilisée chez les endothermes est dérivée du processus d'oxydo-réduction (*e.g.* glycolyse, dégradation des acides des gras) (Schmidt-Nielsen 1979). Ainsi, l'une des méthodes pour estimer l'activité métabolique d'un organisme est de mesurer les échanges respiratoires de ce dernier.

Le principe de respirométrie est de mesurer la consommation d'oxygène et/ou la production de CO₂ d'un organisme maintenu dans un environnement hermétiquement clos (*i.e.* chambre métabolique) alimenté par un débit d'air de quantité et de composition connue

En effet, grâce à différentes équations (Lighton 2008), connaissant le débit d'air circulant dans la chambre métabolique, la composition de l'air entrant dans la chambre et en mesurant la composition de l'air sortant de la chambre, il est alors possible de déterminer quelle a été la consommation d'oxygène et la production de CO₂ de l'organisme présent dans la chambre métabolique.

Cette technique permet de mesurer des individus dans différentes conditions. Lorsque les individus sont maintenus dans leur zone de thermoneutralité (TNZ), à jeun et au repos, il est alors possible de déterminer le BMR de ces derniers (voir McKechnie 2008 pour revue). Si la température ambiante de la chambre métabolique est maintenue à des températures inférieures à la TNZ alors il sera possible de mesurer le métabolisme des individus en production de chaleur (*i.e.* thermogénèse) jusqu'à atteindre la capacité maximum de production (*e.g.* Swanson et Liknes 2006; Swanson 2010; Lewden et al. 2012). Le métabolisme lors de la dissipation de chaleur peut également être mesuré en maintenant la température de la chambre métabolique au-dessus de la TNZ (*e.g.* McKechnie et al. 2016; Smith et al. 2017; O'Connor et al. 2017). Enfin, le métabolisme durant l'activité physique telle que la marche ou le vol (*e.g.* Froget et al. 2002) ou métabolisme lors de la digestion (*e.g.* Enstipp et al. 2008) est également évaluable par le système de respirométrie.

Ainsi, le dispositif mis en place permettait de mesurer deux types de chambres métaboliques : L'une où les individus étaient dans l'eau, et l'autre où les individus étaient dans l'air (Figure 42).

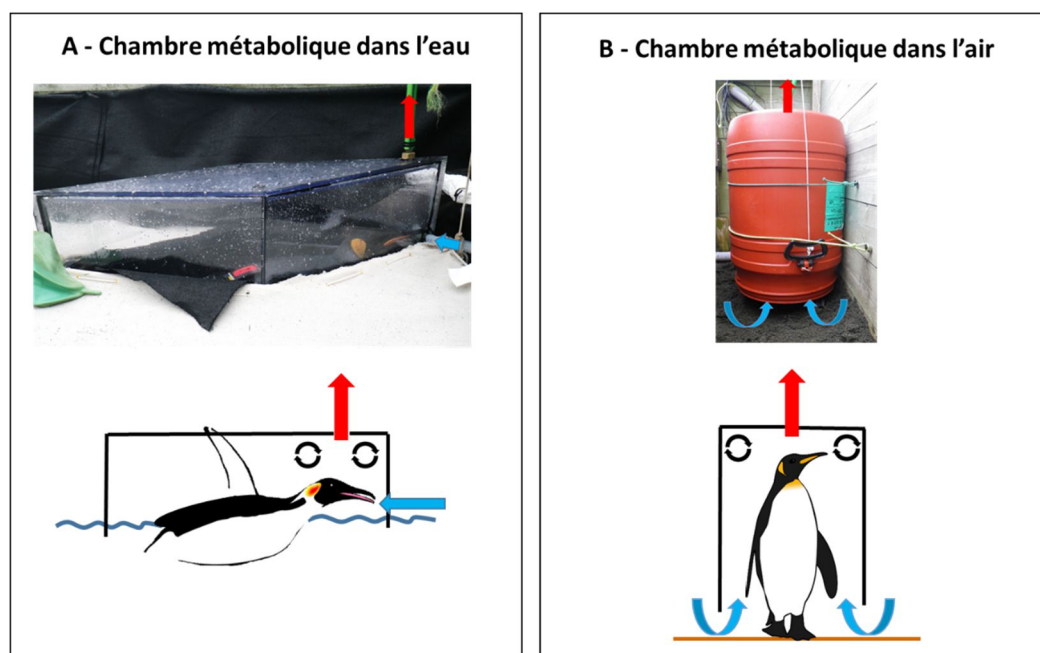


Figure 42: Présentation des chambres métaboliques du système de respirométrie mis en place pour mesurer les individus dans l'eau (A) et à terre (B). Les flèches bleues correspondent aux entrées d'air tandis que les flèches rouges à la sortie de l'air dans un tuyau menant à l'analyseur de composition de l'air en humidité, oxygène et CO₂

5.2 Mesure de la fréquence cardiaque

Une autre méthode pour estimer les dépenses énergétiques d'un organisme est celle de mesurer la fréquence cardiaque de ce dernier. En effet, de par la relation qu'il existe entre la consommation d'oxygène et la fréquence cardiaque (équation de Fick's), il est alors possible d'estimer l'une à partir de l'autre. Ainsi, bien que cette relation ne soit pas tout à fait constante et puisse varier en fonction de la condition corporelle (voir partie E-1 de l'introduction) de nombreuses études ont pu explorer les dépenses énergétiques des manchots royaux en milieu naturel (*e.g.* Groscolas et al. 2010; Viblanc et al. 2014 ; 2015).

Nous avons équipé les individus de la piscine (Chapitre 1 et 2) d'enregistreurs de fréquence cardiaque. Ces enregistreurs sont composés deux parties :

1) Deux électrodes, placées en sous-cutanés (Figure 43), capables de déceler l'activité électronique liée aux contractions du muscle cardiaque et transmettant l'information au moniteur.

2) Le moniteur qui va convertir l'information à l'aide d'un algorithme pré-programmé et la stocker dans une mémoire interne. Ainsi, ce dispositif peut avoir une autonomie de plusieurs jours sans nécessiter d'intervention. Cependant, en présence d'eau de mer ce dispositif, très efficace à terre, s'est révélé être plus difficile à mettre en place pour des mesures effectuées sur des individus maintenus en piscine.

En raison de la discontinuité des données acquises nécessitant une analyse plus complexe qu'initialement prévue, les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse sont des résultats préliminaires (*i.e.* Etude complémentaire) et sont présentés à titre indicatif pour des analyses complémentaires qui seront effectuées dans les prochains mois.

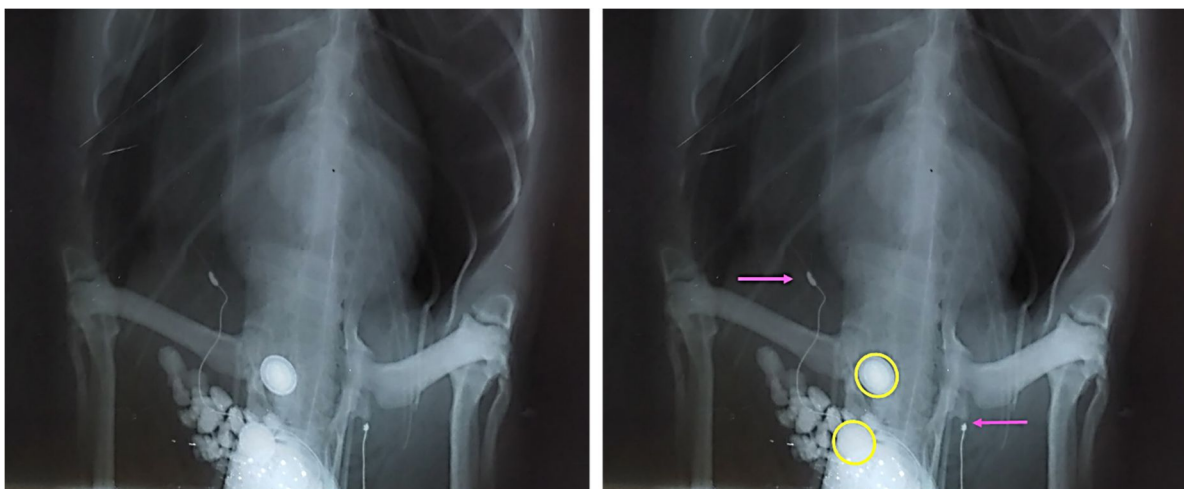


Figure 43 : Identification par radiographie de la position des deux électrodes en sous-cutanés au niveau du dos (flèches roses) à hauteur des os du bassin. Les boutons positionnés dans la cavité abdominale et au niveau de la plaque incubatrice (rond jaune) sont également identifiables sur cette radiographie.

5.3 Mesure de l'accélération

L'accélérométrie est la mesure des mouvements d'un individu dans les trois dimensions spatiales. Bien qu'utilisé depuis de nombreuses années chez l'homme (Cavagna et al. 1963), l'accélérométrie comme indicateur de la dépense énergétique n'a été que depuis peu appliquée au monde animal (Wilson et al. 2006; voir Halsey et al. 2011a pour revue). En effet, les coûts énergétiques des mouvements d'un individu constituent souvent la majorité des dépenses énergétiques (Karasov 1992). Ainsi, ils peuvent être corrélés aux dépenses énergétiques de ce dernier procurant un index de la consommation d'oxygène (Elliott et al. 2013; Gleiss et al. 2011; Halsey et al. 2011a; Wilson et al. 2006). L'accélérométrie comme index de la consommation d'oxygène a également été calibrée récemment via la respirométrie en laboratoire (Halsey et al. 2011b; Lighton et Halsey 2011; Welch 2011). Plus récemment encore, Hicks et al. 2017 semble valider le lien entre l'accélération et la fréquence cardiaque de l'activité chez le cormoran huppé (Figure 44).

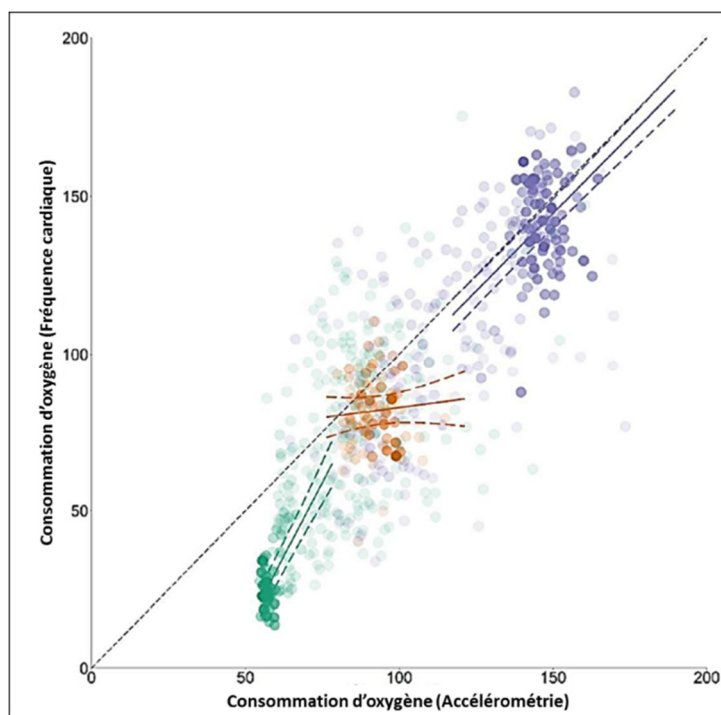
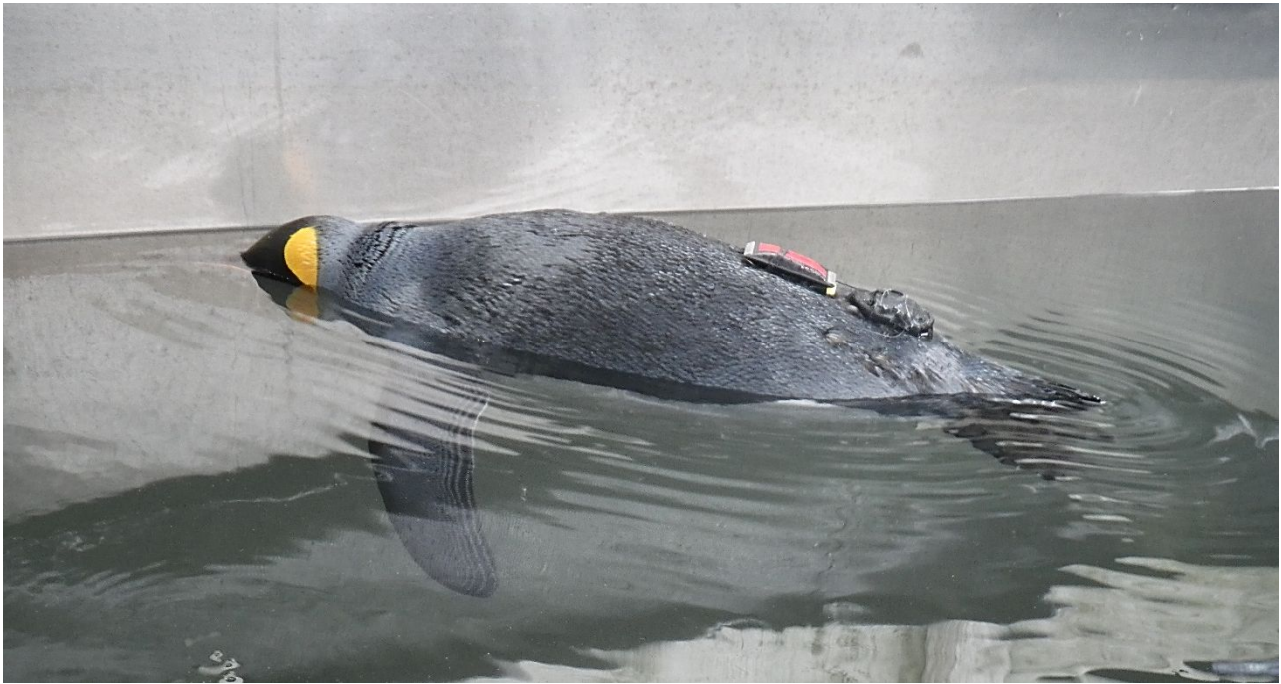


Figure 44 : Relation entre deux méthodes de prédictions de la consommation d'oxygène en fonction du type d'activité : le repos (vert), la plongée (orange) et le vol (violet) Adapté de Hick et al. 2017

Dans le but de contrôler, d'étudier et/ou de corrélérer l'activité des individus en piscine aux températures corporelles mesurées, les manchots en piscine ont été équipés d'un accéléromètre en bas du dos. Cependant, ces données n'ont pas encore fait l'objet d'analyses poussées et seront évoquées uniquement dans la partie discussion.

Partie 1

Stratégies de thermorégulation liées aux contraintes physiologiques dans l'eau



- ❖ **Chapitre 1** : Lewden, A., Enstipp, M.R, Picard, B., van Walsum, T., Handrich, Y. (2017b). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea : thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Biol.* **220**, 3084-3094.
- ❖ **Chapitre 2** : Lewden, A., Enstipp, M.R., Bonnet, B., Bost, C., Georges, J.Y., Handrich, Y. (2017) Thermal strategies of king penguins during prolonged fasting in water. *J. Exp. Biol.* _ Proof
- ❖ **Etude complémentaire** : Impact des conditions expérimentales sur les individus de manchots royaux maintenus en piscine.

III

Chapitre 1

Lewden, A., Enstipp, M.R, Picard, B., van Walsum, T., Handrich, Y. (2017b). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea : thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Biol.* 220, 3084-3094.



RESEARCH ARTICLE

High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea: thermoregulation versus fat deposition

Agnès Lewden^{1,*}, Manfred R. Enstipp^{1,2}, Baptiste Picard², Tessa van Walsum³ and Yves Handrich¹

ABSTRACT

Marine endotherms living in cold water face an energetically challenging situation. Unless properly insulated, these animals will lose heat rapidly. The field metabolic rate of king penguins at sea is about twice that on land. However, when at sea, their metabolic rate is higher during extended resting periods at the surface than during foraging, when birds descend to great depth in pursuit of their prey. This is most likely explained by differences in thermal status. During foraging, peripheral vasoconstriction leads to a hypothermic shell, which is rewarmed during extended resting bouts at the surface. Maintaining peripheral perfusion during rest in cold water, however, will greatly increase heat loss and, therefore, thermoregulatory costs. Two hypotheses have been proposed to explain the maintenance of a normothermic shell during surface rest: (1) to help the unloading of N₂ accumulated during diving; and (2) to allow the storage of fat in subcutaneous tissue, following the digestion of food. We tested the latter hypothesis by maintaining king penguins within a shallow seawater tank, while we recorded tissue temperature at four distinct sites. When king penguins were released into the tank during the day, their body temperature immediately declined. However, during the night, periodic rewarming of abdominal and peripheral tissues occurred, mimicking temperature patterns observed in the wild. Body temperatures, particularly in the flank, also depended on body condition and were higher in 'lean' birds (after 10 days of fasting) than in 'fat' birds. While not explicitly tested, our observation that nocturnal rewarming persists in the absence of diving activity during the day does not support the N₂ unloading hypothesis. Rather, differences in temperature changes throughout the day and night, and the effect of body condition/mass supports the hypothesis that tissue perfusion during rest is required for nutritional needs.

KEY WORDS: Seabirds, Heterothermia, Subcutaneous fat, Normothermia, Fat storage, Heat loss

INTRODUCTION

Marine endotherms living in cold water are confronted with potentially significant heat loss and high thermoregulatory costs, as the heat capacity and thermal conductivity of water are substantially higher than those of air (Kooyman et al., 1976; Dejours, 1987). Hence, effective insulation is of great importance. Most marine mammal species possess a substantial subdermal fat layer (blubber) to achieve such insulation. By contrast, many marine birds rely to a

large extent on the air layer that is trapped within their plumage. While air is a better insulator than fat, problems arise during diving, when the increasing pressure with depth reduces the insulating air layer trapped within the plumage, so that heat loss increases (Kooyman et al., 1976; Wilson et al., 1992; De Vries and Van Erden, 1995; Ponganis et al., 2003). Hence, avian divers that rely exclusively on their plumage air layer for insulation (e.g. cormorants) face an enormous heat loss to the environment, burdening their energy budget (Grémillet et al., 2001; but see Enstipp et al., 2007). Penguins possess both (1) air that is trapped within their dense down layer and (2) a layer of adipose tissue, uniformly distributed under the skin (subcutaneous fat; Pond and Mattacks, 1985). The subcutaneous fat layer and the alteration of peripheral blood perfusion (vasoconstriction) enable these birds to build up a thermal gradient between the warmer body core and the cooler body shell, reducing heat flux to the environment and keeping thermoregulatory costs at bay (Kooyman et al., 1976; Ponganis et al., 2001, 2003). The effectiveness of such a response has been demonstrated experimentally in marine mammals (e.g. Kvadsheim and Folkow, 1997). Effective thermoregulatory capacity is a prerequisite for the extreme dive performance of the two largest penguin species, the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) and the emperor penguin (*Aptenodytes forsteri*). Current depth records for these species are 343 m versus 564 m, with maximum dive durations of 9.2 min versus 27.6 min, respectively (Wienecke et al., 2006; Sato et al., 2011; Pütz et al., 1998; Pütz and Cherel, 2005). Certainly, the hydrodynamic design and propulsive mode (wing propelled) of penguins enables these birds to move through the water column at low energetic costs (Culik et al., 1994, 1996a). However, exactly how these penguins achieve such extreme dive performance is still the subject of intense research. Recent studies on emperor penguins (mostly concerning birds diving from isolated ice holes) have started to unravel the physiological mechanisms behind such performance (Knower Stockard et al., 2005; Ponganis et al., 2007, 2009, 2011; Meir et al., 2008; Meir and Ponganis, 2009; Williams et al., 2011). Unfortunately, because of the lack of a comparable set-up, such studies have not been possible with king penguins.

However, a number of studies have investigated the diving energetics and thermoregulation of king penguins foraging at sea (Froget et al., 2004; Culik et al., 1996b; Handrich et al., 1997; Schmidt et al., 2006; Enstipp et al., 2017). These studies found substantial temperature declines in core (abdominal) and/or peripheral tissues (Culik et al., 1996b; Handrich et al., 1997; Schmidt et al., 2006; Enstipp et al., 2017) and this has led to the suggestion of a regional hypothermia as a mechanism to lower diving metabolism and increase breath-hold duration (Butler, 2004; Schmidt et al., 2006). For example, Handrich et al. (1997) recorded abdominal temperatures in foraging king penguins that fell as low as 11°C. While some of this extreme tissue cooling might have been caused by the ingestion of cold prey, abdominal temperature was

¹Université de Strasbourg, CNRS, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France. ²Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS, UMR 7372, 79360 Villiers en Bois, France. ³University of Roehampton, Department of Life Sciences, London SW15 4JD, UK.

*Author for correspondence (agnes.lewden@iphc.cnrs.fr)

 A.L., 0000-0002-9303-2735

10–20°C below the recorded stomach temperature (Handrich et al., 1997). Furthermore, Schmidt et al. (2006) found that pectoral muscle temperature of king penguins during foraging bouts dropped on average by ~2°C, with maximal declines of up to 5.5°C. The temperature of the subcutaneous brood patch, a bare and highly vascularized skin area, decreased on average by ~13°C, with maximal declines of up to 21.6°C (Schmidt et al., 2006). In king penguins swimming/diving within a shallow (30 m) static water channel for up to 3 h, Fahlman et al. (2005) also observed a temperature decline in subcutaneous tissues as well as in the lower, middle and upper abdomen that depended on the nutritional status of the birds. Lastly, Enstipp et al. (2017) reported peripheral temperature drops (subcutaneous flank) in juvenile king penguins foraging at sea to as low as 12.5°C.

Following these hypothermic periods, the birds rest for extended periods at the surface and rewarm both their deep and peripheral tissues to normothermic values (Schmidt et al., 2006). Reperfusion of peripheral tissues while resting (i.e. vasodilation), and the associated peripheral rewarming, might be important as it ensures the supply of oxygen and nutrients to these tissues, while it removes metabolic by-products (Kooyman, 1989). However, this also leads to an increase in heat loss during this inactive period and might explain why metabolic rate estimates for king penguins at sea are higher at night (when they are resting at the surface) than during the daytime, when they forage (Froget et al., 2004). The study by Froget et al. (2004) also reported metabolic rate estimates for king penguins at sea that were about twice those of birds ashore in the colony, illustrating the scope of metabolic costs associated with activity and thermoregulation at sea. Besides increased heat loss and heat production, the heat increment of feeding, associated with the digestion/assimilation of food, will also increase metabolism during these resting periods, while some of that heat might be used to substitute for regulatory thermogenesis (Green et al., 2006; Lovvorn, 2007; Enstipp et al., 2008). However, the reasons why king penguins maintain a peripheral normothermia when resting in cold water, despite the potentially high energetic costs associated with it, are still unclear. Two general hypotheses have been proposed: (1) the ‘N₂ unloading hypothesis’ and (2) the ‘nutritional hypothesis’. In the N₂ unloading hypothesis, the maintenance of peripheral perfusion during extended surface breaks in king penguins is required to help unloading of N₂, accumulated during diving (Fahlman et al., 2007). N₂ accumulation was suggested to explain why king penguins terminate foraging bouts, especially during the day, when prey might be readily available (Fahlman et al., 2007). In general, N₂ is highly fat soluble and accumulates in subcutaneous fat during diving (Behnke et al., 1935). Hence, at the end of extended deep diving bouts, a poor peripheral circulation (vasoconstriction) might delay N₂ clearance and, thereby, increase the likelihood of bubble formation (Fahlman et al., 2007). Accordingly, perfusion of subcutaneous adipose tissues after diving might speed up the removal of N₂ and help to avoid decompression sickness (Fahlman et al., 2007). In the nutritional hypothesis, maintenance of peripheral perfusion during inactivity at night could be required for the assimilation of free fatty acids (FFA) following digestion of food (Schmidt et al., 2006). Subcutaneous adipose tissue is the most important tissue in penguins for FFA storage (Cherel et al., 1993). Accordingly, peripheral perfusion is required to allow fat deposition, and this might explain the observed general rewarming that occurs after foraging, when birds rest at the surface.

In this study, we explored the nutritional hypothesis by monitoring the temperature of various tissues of king penguins as a proxy of tissue perfusion, while birds underwent alimentary

manipulation inside a water tank. Our objectives were as follows: (1) to investigate tissue temperatures of king penguins resting in a shallow seawater tank during the day (digestive period) and night (post-digestive period), in the absence of diving activity, and (2) to investigate the effect of body condition on observed tissue temperature variations (‘fat’ versus ‘lean’ birds).

We predicted that if peripheral reperfusion/rewarming is related to the requirements of fat deposition in subcutaneous tissues, we should see a general increase in peripheral tissue temperature during the post-digestive period (at night), when compared with the digestive period (during the day). Furthermore, peripheral tissue temperatures of birds should be affected by their body condition, as ‘lean’ birds should preferentially restore subcutaneous fat stores (to improve insulation) and, therefore, display higher peripheral temperatures, reflecting greater peripheral perfusion. By contrast, ‘fat’ birds might deposit fat preferentially in abdominal adipose tissue and display higher abdominal temperatures than ‘lean’ birds.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were conducted on Possession Island, Crozet Archipelago (46°25’S, 51°51’E), in the Southern Indian Ocean during the Austral summer (November 2014 to March 2015). At the time of capture, king penguins were in the courtship phase of their breeding cycle at the colony ‘La Baie du Marin’. We equipped eight adult males (identified by song; Jouventin, 1982) with temperature data loggers (see below). All experimental procedures were approved by the French ethics committee (APAFIS, permit no. 02015041411414001) and the French Polar Environmental Committee (permit no. 2013-76, 2014-121).

Experimental set-up

Surgical procedure

On the day of capture, body mass and a number of morphometric measurements were taken (e.g. length of flippers, feet, beak and head). Birds then underwent surgical implantation of temperature data loggers at four different sites (see below). The surgical procedure followed the protocol previously detailed in Froget et al. (2004) and Fahlman et al. (2005), with the following modifications concerning drug administration: in preparation for surgery, birds were injected with a mixture of Valium (1 ml; Virbac, Carros, France), glycopyrrolate (0.6 ml; Vétoquinol, Paris, France) and butorphanol (1 ml; Vétoquinol) into the pectoral muscle, 30 min before anaesthesia was induced with isoflurane, delivered in O₂. To avoid post-operative infection, birds were injected with marbofloxacin (Vétoquinol) into the brachial flipper vein. Injections of Rimadyl and cefalexin (Vétoquinol) were delivered during surgery and every 12 h post-surgery for up to 72 h, to reduce potential pain and inflammation.

Temperature loggers

Penguins were implanted with temperature loggers (iButton MXMDS1922L-F5, Memec, Avnet, Massy, France; resolution ±0.0625°C, range 0–50°C, diameter and height 17.35×5.89 mm, mass 2.9 g, recalibrated in a water bath with an absolute accuracy of ±0.1°C) at four distinct locations (Fig. 1), which recorded instant temperature every 11 min. Three of the four temperature loggers were implanted into the subcutaneous fat layer within the flank, back and brood patch, while the last logger was placed into the abdominal cavity, lateral to the brood patch (Fig. 1). The three peripheral loggers were positioned about halfway between the muscle and the skin, and care was taken to achieve comparable logger positioning in all birds. During experimentation, we also

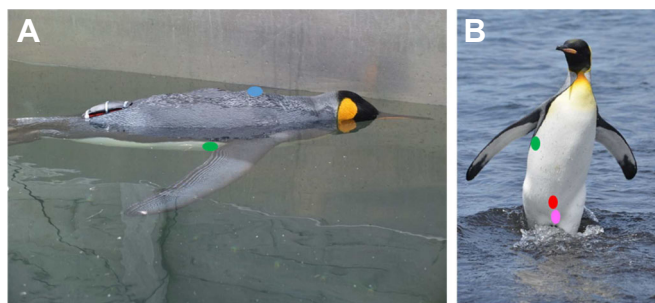


Fig. 1. Experimental set-up and the position of the loggers. (A) A king penguin resting in the seawater tank, showing the position of two of the four temperature loggers. When king penguins floated in the tank, the back logger (blue dot) remained above water, whereas loggers at all other positions were submerged. (B) The position of the loggers in the flank (green dot), the brood patch (pink dot) and the abdominal cavity (red dot). The external logger on the lower back was part of a different study.

recorded ambient air temperature in the enclosure and water temperature (T_w) within the tank (monitored with iButtons; those in water were submerged to 0.8 m).

To allow full recovery from surgery, birds were kept together in a wooden enclosure (in air; 3×3 m, no roof) without disturbance (apart from feeding) for an average of 6.1 ± 0.1 days, before introduction into the seawater tank. Upon completion of experimentation, birds underwent the same procedure to remove the temperature loggers. Before release back into the colony, penguins were colour marked (using hair dye: Belle Color, L'Oreal, Clichy, France) so they could be followed throughout the breeding season.

Seawater tank

A water tank (2.5×1.3×1.2 m length×width×height, filled to a water level of 0.8 m) was built adjacent to lab facilities and the colony. Fresh seawater was pumped continuously from the adjacent bay. A surface skimmer at one end of the tank and a sufficiently high water turnover (complete turnover within 1 h) ensured a good water quality within the tank and maintained a fairly constant water temperature throughout experimentation (mean T_w $5.7 \pm 0.6^\circ\text{C}$). Birds inside the water tank were monitored continuously by video camera (DVR Eye, Pix Controller, Export, PA, USA).

Feeding and experimentation

Penguins did not ingest food voluntarily and were, consequently, force fed. For this, birds were captured within the wooden enclosure or from within the water tank and briefly restrained while being weighed (accuracy ± 0.1 kg) and fed whole fish (sardines, *Sardina pilchardus*, stored at 5°C ; Armement des Mascareignes, Le Port, France). Birds easily adapted to this procedure, which never exceeded 10 min (mean duration 6.9 ± 3.7 min). During recovery from surgery (on average, 2.2 ± 0.1 days after surgery) and before introduction into the water tank, birds were fed 3 times per day for 4 successive days (stage 1), to enable them to regain their original body mass at capture. Mean meal size was 0.3 ± 0.1 kg, which amounted to a total of 3.3 ± 0.4 kg of fish fed to each bird within 4 days. Consequently, body mass of birds at the time of introduction into the water tank did not differ from their initial mass at first capture ($P=0.63$).

To investigate the hypothesis that maintained peripheral perfusion at night is related to fat deposition, all birds underwent a specific protocol that included feeding and fasting periods inside a shallow seawater tank and/or in air (see Fig. 2 for an outline of the

temporal organization of our experiment). The experimental protocol included four distinct periods, during which we recorded tissue temperature: (1) stage 1, during which birds rested for 4 days inside the wooden enclosure ('fat' birds in air); (2) stage 2, during which birds spent 2 consecutive days inside the shallow seawater tank ('fat' birds in water, body mass 13.6 ± 0.4 kg; Table 1); (3) stage 3, during which birds fasted for 10 days and were alternated between the water tank and the wooden enclosure; (4) stage 4, during which birds spent another 3 consecutive days inside the water tank ('lean' birds in water; body mass 11.9 ± 0.7 kg; Table 1). During stage 1 (in air), birds were fed 0.9 ± 0.1 kg fish per day (see above). When inside the water tank (2 days during stage 2 and 3 days during stage 4; but not during the fasting period), birds were fed four meals per day, at 08:30 h, 11:30 h, 14:30 h and 17:30 h, and were fasted at night. Total meal size per day per bird at that point varied between 1.5 ± 0.2 and 1.8 ± 0.0 kg. Hence, we simulated conditions typically encountered by these birds at sea, albeit in the absence of diving activity.

Data analysis

All data of one bird were removed from the analysis because of its digestive problems and repeated food regurgitation. Furthermore, one logger in the back (bird ID2) and one logger in the abdominal cavity (ID5) failed to record data. Within the four distinct stages, days were split into daytime periods (08:00 h to 22:00 h; last feeding occurred at 17:30 h) and night-time periods (22:00 h to 08:00 h); during the latter, birds rested without disturbance. The lower critical temperature for adult king penguins in air has been estimated at -5°C (Froget et al., 2002). Air temperatures throughout experimentation ranged between 4.6 and 17.3°C . Hence, when birds rested in air (with the possibility of remaining in the shade on sunny days), they were within their thermoneutral zone. For our investigation, we considered the tissue temperatures of birds recorded during stage 1 (in air) to represent the normothermic condition for each respective tissue.

In our analysis, we first focused on the general temperature patterns recorded in our penguins within the seawater tank (stage 2 and stage 4; 5 days in total), to allow a comparison with temperature patterns observed in foraging birds at sea. We then concentrated our investigation on tissue temperatures recorded in penguins during stage 2 ('fat' birds in water). Specifically, for the flank tissue (permanently submerged in a penguin when resting in water, Fig. 1), we investigated normothermic periods ($\sim 37^\circ\text{C}$) that occurred during the night. We also compiled a frequency distribution for all four tissue temperature recordings obtained during the night in stage 2 and contrasted this with tissue temperatures obtained during stage 1 ('fat' birds in air). Lastly, we studied temperature changes during the two periods that birds spent in water with contrasting body conditions (stage 2 versus stage 4).

We considered birds to be in a digestive state throughout the daytime and in a post-digestive state for most of the night. Frequent defecation throughout the daytime was observed in all birds (with the exception of the bird excluded from the analysis), indicating that birds digested the provided food. During digestive activity, blood flow to the digestive organs within the body core will increase (Gallavan and Chou, 1985; Bottje and Harrison, 1986, 1987), while peripheral perfusion will be reduced. Hence, if a peripheral reperfusion/rewarming is related to the requirements of fat deposition in subcutaneous tissues, we would expect to see an increase in peripheral tissue temperature during the post-digestive period (at night), when compared with the digestive period (daytime). Furthermore, we would also expect that the body condition of birds will affect peripheral tissue temperature, for the

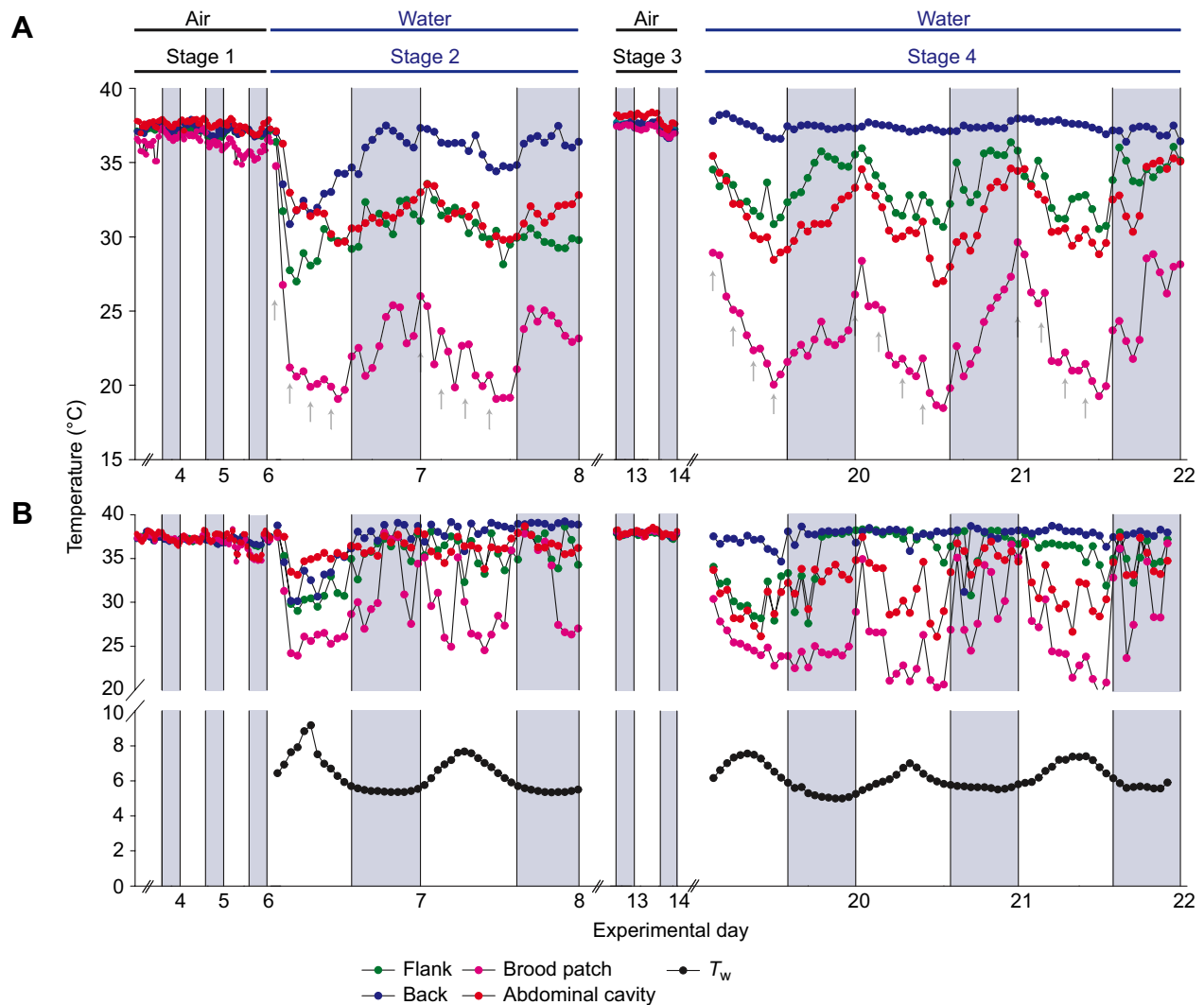


Fig. 2. Temperature recordings from four tissues when king penguins rested in air and in water. (A) Hourly mean temperature from 7 birds throughout the experiment. The initial part of the experiment (stage 1, 4 days in air) was followed by 2 days in water (stage 2, 'fat' birds), after which birds were fasted for 10 days in air/water (stage 3), before they spent another 3 days in water (stage 4, 'lean' birds). Feeding events occurred during the day, as indicated by the arrows. (B) Temperature recordings from a single bird (ID 3) for comparison, plotted with water temperature (T_w). Night periods are indicated by the grey bars at the top. Only 3 days are displayed for stage 1, and only a period of 34 h, when birds rested in air, is shown for stage 3. Tissue temperature oscillations between day and night are visible in water, while they are absent in air.

following reasons. While the exact time course and preferential site of fat deposition/mobilization in birds is not clear, Blem (1990) suggested that 'subcutaneous fat may tend to be the first deposited and the last to be used', while intraperitoneal fat 'may be the first to be mobilized during stress'. By contrast, experiments conducted with rats suggest that abdominal adipose tissue is important for the short-term (meal-to-meal) dynamics of both fat mobilization and storage, while subcutaneous adipose tissue is more important for the long-term management of energy reserves (West et al., 1989; Sugden et al., 1994; Bertile et al., 2003). From studies concerning fuel mobilization during fasting, it seems clear that subcutaneous fat provides most fuel during these periods in penguins and seals (Cherel and Le Maho, 1985; Nordøy and Blix, 1985; Nordøy et al., 1990; Markussen and Ryg, 1992; Cherel et al., 1994), while seal pups might increase protein catabolism, to retain a critical blubber layer for insulation (Øritsland et al., 1985). Clearly, the benefit of the time course with respect to subcutaneous fat suggested by Blem (1990) is obvious for avian divers like penguins, where subcutaneous fat provides most insulation. Accordingly, after a

fasting period, birds should preferentially restore their subcutaneous fat layer to provide insulation in cold water. If so, then peripheral tissue temperatures during rest (reflecting perfusion) should be higher in fasted (hereafter 'lean') birds, when compared with non-fasted (hereafter 'fat') birds. However, higher peripheral temperatures in lean birds might also be a consequence of their reduced insulation, when compared with fat birds, without any differences in perfusion. Hence, there are two potential explanations for the elevated peripheral temperatures in lean birds: (1) active regulation of peripheral perfusion, presumably to deposit subcutaneous fat; and (2) reduced subcutaneous insulation leading to greater heat flux from the core to the skin. To distinguish between these two potential causes, we focused on temperatures recorded within the flank. We determined (1) the total amount of time that flank temperature was above 36°C (i.e. near normothermia) during the night in fat and lean birds and (2) the mean temperature during these near-normothermic episodes (birds did not maintain a constant normothermic level and temperature oscillations were common, so that birds showed multiple near-normothermic periods

Table 1. Tissue temperatures of king penguins resting during the night in air (stage 1) or in water (stage 2 and stage 4) and corresponding body masses

Bird ID	Body mass (kg)		Flank temperature (°C)			Back temperature (°C)			Brood patch temperature (°C)			Abdominal cavity temperature (°C)		
	Stage 2	Stage 4	Stage 1	Stage 2	Stage 4	Stage 1	Stage 2	Stage 4	Stage 1	Stage 2	Stage 4	Stage 1	Stage 2	Stage 4
ID1	14.2	12.6	37.5±0.2	34.3±5.0	36.7±2.6	37.2±0.2	37.2±2.0	37.2±0.5	37.5±0.3	29.7±5.1	23.2±6.7	37.9±0.3	37.7±0.4	35.9±1.1
Max.				37.9	38.4		38.4	38.3		36.7	37.1		38.4	38.2
Min.				23.3	27.2		29.4	36.3		20.2	16.1		36.4	33.2
ID2	13.2	11.2	37.4±0.2	27.4±4.1	33.0±4.7	–	–	–	37.0±0.4	21.6±1.7	25.04±4.4	38.1±0.2	36.0±0.7	35.8±1.4
Max.				36.5	38.7	–	–	–		30.4	36.8		37.9	39.1
Min.				22.9	24.0	–	–	–		18.8	18.4		34.4	33.8
ID3	13.6	12.0	37.0±0.3	35.4±2.2	35.4±3.3	37.0±0.3	37.6±1.0	37.6±1.5	36.9±0.8	31.6±4.8	31.6±5.4	36.9±0.9	35.8±1.1	35.8±2.1
Max.				37.9	38.5		38.6	38.6		37.4	38.0		38.3	38.3
Min.				29.3	27.4		33.5	29.2		24.7	22.2		32.6	28.0
ID4	13.7	11.8	36.7±0.6	30.7±5.8	35.7±1.8	36.8±0.6	35.9±1.1	36.8±0.5	36.5±1.0	25.2±5.8	25.9±3.0	37.5±0.5	32.8±3.3	32.6±2.9
Max.				37.6	38.0		37.6	37.8		36.8	32.5		38.4	37.2
Min.				24.4	31.2		32.2	35.3		17.9	20.4		27.0	26.6
ID5	13.2	11.8	36.9±0.3	37.4±0.6	36.2±1.0	37.2±0.3	37.6±0.5	37.27±0.4	36.5±0.9	29.4±5.3	25.2±3.3	–	–	–
Max.				38.2	37.7		38.3	38.0		37.7	36.0		–	–
Min.				34.0	33.2		35.3	34.7		20.3	20.1		–	–
ID6	13.6	11.8	36.7±0.4	23.9±2.0	32.3±2.9	37.2±0.4	32.7±3.8	37.5±1.3	35.2±2.1	15.6±1.3	19.9±2.2	37.4±0.6	25.7±3.5	27.5±3.2
Max.				34.9	38.5		38.0	38.9		18.6	24.9		33.0	35.5
Min.				22.0	29.2		25.1	29.5		14.0	16.3		21.7	22.3
ID7	13.7	11.8	36.7±0.4	27.0±4.1	33.4±3.3	37.0±0.4	37.6±1.1	37.4±0.9	36.2±0.5	16.0±1.3	23.9±5.0	37.6±0.3	24.0±2.1	24.0±5.7
Max.				37.8	37.5		39.0	38.4		19.3	36.8		29.4	36.8
Min.				23.9	27.5		32.2	33.2		14.2	18.8		20.9	18.8
Mean±s.d.	13.6±0.4	11.9±0.7	36.9±0.3	30.1±4.8	34.5±3.0	37.0±0.2	36.6±1.3	37.4±0.9	37.1±0.3	23.5±5.8	24.8±4.5	37.5±0.4	31.7±4.8	31.8±2.7

Mean temperature values (±s.d.), as well as maximum and minimum temperatures are shown. $N=7$ birds for flank and brood patch tissues and $N=6$ birds for back tissue and abdominal cavity.

of varying duration; Fig. 2B). We reasoned that if mean temperature levels during these near-normothermic periods were similar in the two conditions, while lean birds spent a greater part of the night at elevated flank temperatures, this would lend support to the nutritional hypothesis.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed in JMP® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Body mass differences of birds during different stages and differences in the mean temperature of tissues between the day and night were tested using a paired *t*-test. Temperature variations of tissues between the first and last hour of day and night periods during stage 2 and stage 4 were investigated using linear mixed model analysis (LMM). We included hour (first versus last), period (day versus night), body condition (fat versus lean) and the interaction term hour×period as fixed effects, while bird ID was included as a random effect. Similarly, mean flank temperatures during near-normothermic periods and the total time per night spent above 36°C (stage 2 versus stage 4) were investigated using LMM analysis. For tissues where body condition significantly affected temperature variations between day and night, LMM was also used to investigate the effect of body mass and meal size on tissue temperatures at night. If interactions within a model were significant, we conducted a *post hoc* Tukey HSD test. Significance was accepted at $P<0.05$. All values are presented as means±s.d., unless indicated otherwise.

RESULTS

Upon first introduction into the seawater tank, birds explored the tank and even briefly submerged for a few seconds. However, they quickly adapted to the set-up and, apart from grooming, rested calmly at the surface throughout experimentation (Fig. 1A). When left undisturbed, activity levels of birds did not differ between day and night and no antagonistic behaviour between birds was observed. Recorded temperatures in all tissues declined strongly when birds

entered the water ($T_w=5.7±0.6°C$; mean temperature declines: back $5.5±1.0°C$, flank $10.2±1.9°C$, brood patch $15.8±2.6°C$, abdominal cavity $5.5±1.7°C$; Fig. 2). Feeding events throughout the day caused additional temperature declines in all tissues, sometimes preceded by temperature reversals (Fig. 2). During the night inside the seawater tank, periodic rewarming was observed in all tissues and we found a considerable overlap of tissue temperatures when birds rested in water (stage 2) or in air (stage 1; Fig. 3).

Diel temperature patterns

Overall, tissue temperatures of our birds during the 5 day period they spent in the seawater tank (stage 2 and stage 4) did not differ significantly between day and night, and this was true for all tissues investigated (flank: $31.7±3.3$ versus $33.1±4.4°C$; back: $36.3±2.3$ versus $37.0±1.3$; brood patch: $22.5±2.9$ versus $24.3±4.9°C$; abdominal cavity: $31.3±4.2$ versus $32.1±4.6°C$; $P>0.05$ for all tissues). As birds could not dive/forage within our set-up (apart from occasional brief/shallow submersions), this is not surprising. However, while overall temperature values did not differ significantly between day and night, temperature variation during these periods did (LMM; interaction: hour×period; Table 2). During the day, the temperature of all tissues decreased significantly between the first and last hour (08:00–09:00 h versus 21:00–22:00 h; see Fig. 4). At night, temperatures increased between the first and last hour (22:00–23:00 h versus 07:00–08:00 h). However, given the considerable individual variation, this temperature increase was only significant for the brood patch and the abdominal cavity (Fig. 4).

Temperatures during the night (post-digestive)

As conditions in the tank during the night resembled the situation during the night at sea (i.e. birds in the post-digestive condition, resting at the surface), which was clearly not the case for the day period, we focused our following investigations on night periods only. When resting in air during stage 1, birds maintained stable

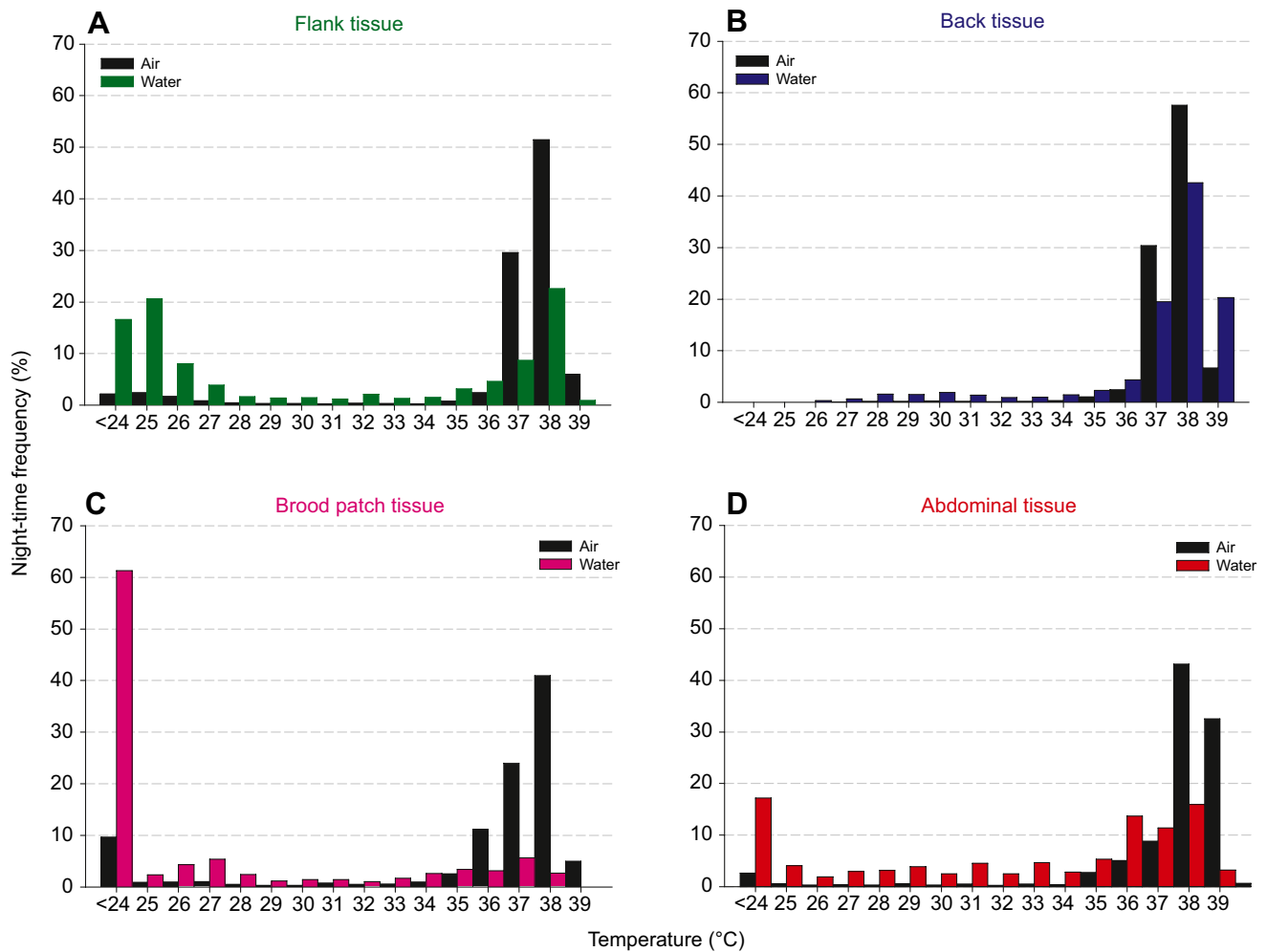


Fig. 3. Frequency distribution of tissue temperature from four sites recorded during the night, when birds rested in air or in water (stage 2). A large overlap between the black and coloured bars (as in the back tissue) indicates that recorded tissue temperatures were similar when birds rested in air and in water, with temperatures being normothermic in air ($\sim 37^{\circ}\text{C}$).

temperatures in all tissues throughout the night, with temperatures varying by less than 1°C (Table 1, Fig. 2). We chose mean temperatures from this period to represent the normothermic condition for each tissue investigated. Accordingly, normothermic temperature was defined as $36.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ for the flank, $37.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ for the back, 37.1 ± 0.3 for the brood patch, and $37.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ for the abdominal cavity, respectively (Table 1, Fig. 2A). In contrast to the situation in air, tissue temperatures of birds in water varied greatly during the night in stage 2 (Table 1). The greatest temperature difference was found in the brood patch, with a difference of 16.5°C between the maximum and minimum temperature recorded in one bird (Fig. 2B). Similar temperature differences for birds in water during the night (stage 2) were also found for the flank (14.6°C), back (12.9°C) and abdominal tissues (11.3°C ; Table 1). Despite a considerable variation, tissue temperatures generally increased throughout the night (Fig. 2) and in some cases normothermic values were reached (see maximum values in Table 1 and individual temperature traces in Fig. 2B). This was especially true for the back and the flank tissues, where some birds (e.g. ID1 and ID5) maintained peripheral tissues at normothermic values for extended periods (e.g. for an entire night, ~ 10 h), while such periods were rather short-lived in other birds (e.g. ID3 and ID7) or completely absent (ID2, ID4, ID6). There was also a considerable

overlap in observed temperatures at night between birds resting in air (normothermic temperatures) and birds resting in water (stage 2; Fig. 3). Temperatures within the back tissue overlapped by 74% in the two conditions and were mostly above or slightly below the established normothermic threshold when birds rested in air (Fig. 3). Similarly, temperature overlaps of 45% and 42% were observed for the flank tissue and the abdominal cavity, respectively. Furthermore, for 32% of the night, peripheral flank tissue reached temperatures in excess of 37°C . The least overlap was found in the brood patch (30%), where temperatures for birds resting in water were frequently well below the normothermic threshold (Fig. 3).

The effect of body condition (lean versus fat birds)

After fasting, mean body mass of birds during stage 4 (lean birds; 11.9 ± 0.7 kg) was significantly lower than that during stage 2 (fat birds; 13.6 ± 0.4 kg; $P < 0.0001$). Temperatures of the flank and back tissues during the night in lean birds (stage 4) were significantly higher than those in fat birds (stage 2), indicating that body condition (body mass) affected these tissue temperatures (LMM; flank: $P < 0.0001$, back: $P = 0.04$; Table 2, Fig. 5). However, as birds did not maintain temperatures at a stable level and multiple temperature oscillations typically occurred throughout the night, so

Table 2. Results from linear mixed model analysis concerning the effects of time of day and body condition on tissue temperature

	Flank		Back		Brood patch		Abdominal cavity	
	t	P	t	P	t	P	t	P
Hour (last)	-1.74	0.0841	-1.30	0.1961	-4.39	<0.0001***	-1.96	0.0529
Period (night)	0.10	0.9188	-0.13	0.8958	-1.45	0.1484	-0.07	0.9408
Hour (last) × period (night)	5.26	<0.0001***	3.76	0.0003**	9.5	<0.0001***	8.71	<0.0001***
Body condition (fat)	-4.24	<0.0001***	-5.40	<0.0001***	-0.3	0.7416	0.4	0.69
		Estimate ± s.e.		Estimate ± s.e.		Estimate ± s.e.		Estimate ± s.e.
		-0.54 ± 0.80		-		-1.51 ± 0.34		-0.52 ± 0.27
		-		-		3.28 ± 0.34		-
		1.63 ± 0.31		0.58 ± 0.15		-		2.32 ± 0.27
		-1.36 ± 0.32		-0.85 ± 0.16		-		-

General linear mixed model estimates for the effects of time (hour: first versus last; period: day versus night; and the interaction term hour × period) and body condition (fat versus lean) on tissue temperature variations in king penguins. The model was run separately for all tissues; bird ID was included as a random effect. Flank: $R^2=0.41$, $N=137$; back: $R^2=0.39$, $N=117$; brood patch: $R^2=0.59$, $N=137$; abdominal cavity: $R^2=0.74$, $N=117$. ** $P<0.005$; *** $P<0.001$.

that normothermic periods alternated with hypothermic periods (Fig. 6), considering only mean temperatures might be misleading. For the flank temperature, we therefore calculated the total amount of time birds spent per night in near-normothermic conditions ($>36^\circ\text{C}$) and the mean temperature during these near-normothermic periods. This showed that in the fat condition, flank temperature was on average elevated above 36°C for $37.1\pm 9.9\%$ of the night, while in the lean condition this was the case for $51.7\pm 8.9\%$ of the night. However, given the considerable individual variation, this difference failed to reach statistical significance (LMM, $P=0.13$). During the daytime, the respective values were $16.8\pm 9.7\%$ and $18.2\pm 8.9\%$ for the fat and lean condition, respectively. Mean flank temperature during near-normothermic periods throughout the night did not differ between conditions (37.5 ± 0.3 and $37.6\pm 0.6^\circ\text{C}$ in the fat and lean condition, respectively; LMM, $P=0.39$). Lastly, mean abdominal temperature during the night did not differ significantly between stage 2 and stage 4 (Table 1). However, while mean abdominal temperature ($31.8\pm 5.3^\circ\text{C}$) was higher than mean flank temperature ($30.3\pm 4.7^\circ\text{C}$) in fat birds (stage 2), the reverse was true for lean birds (stage 4; 31.7 ± 3.8 versus $33.7\pm 2.7^\circ\text{C}$; Table 1, Fig. 2) but differences failed to reach significance, given the considerable individual variation.

DISCUSSION

We found that king penguins, fed and released for the first time into a seawater tank during the day, immediately reduced their body temperature (Fig. 2). When maintained inside this tank for 2–3 days, episodic rewarming of abdominal and peripheral tissues to normothermic values occurred during the night, when birds rested. While the temperature patterns varied greatly between tissues and individual birds, and temperatures underwent rapid changes rather than being maintained at a stable level, patterns nevertheless mimicked those observed in the wild, where tissue rewarming occurs during nightly resting at the surface (Schmidt et al., 2006). Differences in temperature changes throughout the day (when feeding occurred) and the night (when birds rested undisturbed), and the negative relationship between tissue temperature (flank and back) and body condition/body mass are in agreement with our predictions and support the hypothesis that tissue perfusion during rest (as reflected in recorded tissue temperatures) is required for nutritional needs.

Diel temperature patterns

A number of studies have investigated the foraging behaviour of adult king penguins at sea during various phases of their breeding cycle (Pütz and Bost, 1994; Pütz et al., 1998; Charrassin et al., 1998, 2001, 2002). At sea, their activity follows a diel pattern: during daylight hours, birds forage for extended periods, often diving to great depth in pursuit of their prey; at night, birds conduct shallow travelling dives and/or rest at the surface (Pütz et al., 1998; Moore et al., 1999; Pütz and Cherel, 2005). Typically, body temperature also follows a diel pattern: when foraging during the day, abdominal and peripheral tissue temperatures fall well below normothermic values and even in the hard-working pectoral muscle, temperature declines of up to 5.5°C have been observed (Culik et al., 1996b; Handrich et al., 1997; Schmidt et al., 2006). When resting at the surface during the night, tissue temperatures return to normothermic values (Culik et al., 1996b; Handrich et al., 1997; Schmidt et al., 2006).

In our set-up, birds could not dive (apart from brief/shallow submersions) and, consequently, we did not observe such a clear diel temperature pattern. Overall tissue temperatures of our birds did

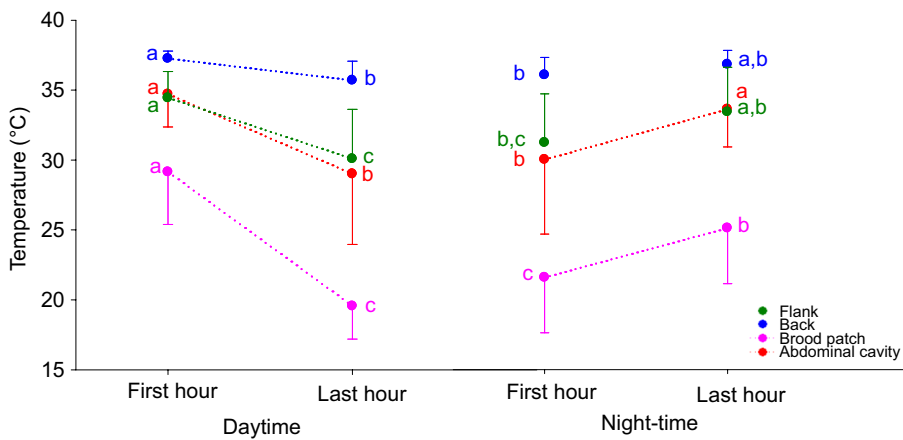


Fig. 4. Tissue temperature changes of king penguins during the day and night in water. Marginal means (\pm s.e.) for 6–7 birds (see Materials and methods) were estimated for different tissues, using separate linear mixed models (LMMs) during the first/last hour of the day and night. Dotted lines indicate a significant difference between the first and last hour of each period (*post hoc* Tukey HSD, $P < 0.05$) for all tissues. Data points that do not share the same letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

not differ significantly between day and night periods. However, despite individual variation, there was a general pattern of declining temperatures during the day and increasing temperatures during the night (Figs 2 and 4), mimicking patterns observed at sea. The

decrease of abdominal temperature during the day was probably caused by the ingestion of cold fish (Culik et al., 1996b; Eichhorn et al., 2011; Fig. 2B), while the decrease of peripheral temperatures (flank, back, brood patch) may be due to a redistribution of blood flow associated with digestive processes (Gallavan and Chou, 1985; Bottje and Harrison, 1986, 1987; Fahlman et al., 2005). However, some of the recorded temperature changes, especially during the day, could also be a consequence of stress associated with the force-feeding procedure, which might have altered blood flow (Cabanac and Aizawa, 2000; Edgar et al., 2013; Herborn et al., 2015).

Temperatures during the night (post-digestive)

Given the limitations of our experimental set-up with respect to replicating daytime conditions typical for king penguins at sea, we focused our analysis on the night-time, where conditions were similar to the wild (i.e. fed birds resting at the surface). Here, we found that all birds displayed normothermic periods in all tissues investigated (Table 1, Figs 2B and 3). While such normothermia was maintained in some birds and tissues for extended periods (e.g. during the entire night in the flank of ID5), tissue temperatures in most birds oscillated over shorter periods. Consequently, normothermic periods in our birds were of shorter duration than those observed in the wild (see Schmidt et al., 2006). Given the shorter duration of normothermic periods within our set-up, temperature averages of peripheral tissues in king penguins resting for extended periods at the sea surface (brood patch $37.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$ and flank $37.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$; Schmidt, 2006; Schmidt et al., 2006) were considerably higher than the temperatures in our birds, averaged throughout the night (brood patch $23.5 \pm 5.8^\circ\text{C}$ and flank $30.1 \pm 4.8^\circ\text{C}$; Table 1). Nevertheless, during normothermic periods, our birds reached temperatures comparable to those of king penguins at sea in all tissues investigated (see maximum values in Table 1). The shorter normothermic periods and the great inter-individual variability observed in our birds could be related to the experimental set-up imposed on the birds (short-term captivity, frequent force-feeding during the day) and/or their known capacity to slow down/delay digestive activity (Thouzeau et al., 2003, 2004). In fact we observed one bird (excluded from the analysis) that regurgitated complete meals in an undigested state 12 h after force-feeding. Clearly, if birds did not digest their provided meals or slowed digestion considerably, perfusion and temperature patterns different from the wild situation are to be expected. However, frequent defecation was observed during the daytime, indicating that birds digested food. This is further supported by the observed tissue temperature increases during the night in all birds after being fed during the day.

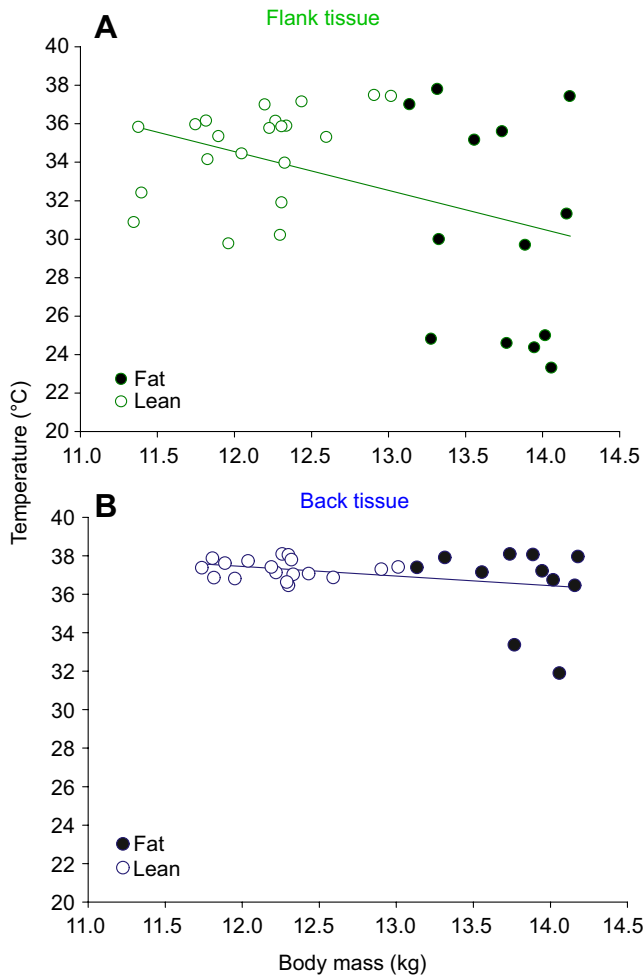


Fig. 5. Flank and back temperature of 7 king penguins resting in water during the night in the lean (stage 2) and fat (stage 4) condition. Values for flank (A) and back (B) temperature were averaged for each night spent in water. Body condition (mass) significantly affected flank temperature, such that temperatures were higher in lean birds than in fat birds (LMM, $P < 0.0001$, $r^2 = 0.68$, $n = 34$ nights). This was also true for the back tissue, albeit the relationship was driven by one individual (LMM, $P = 0.04$, $r^2 = 0.37$, $n = 29$ nights).

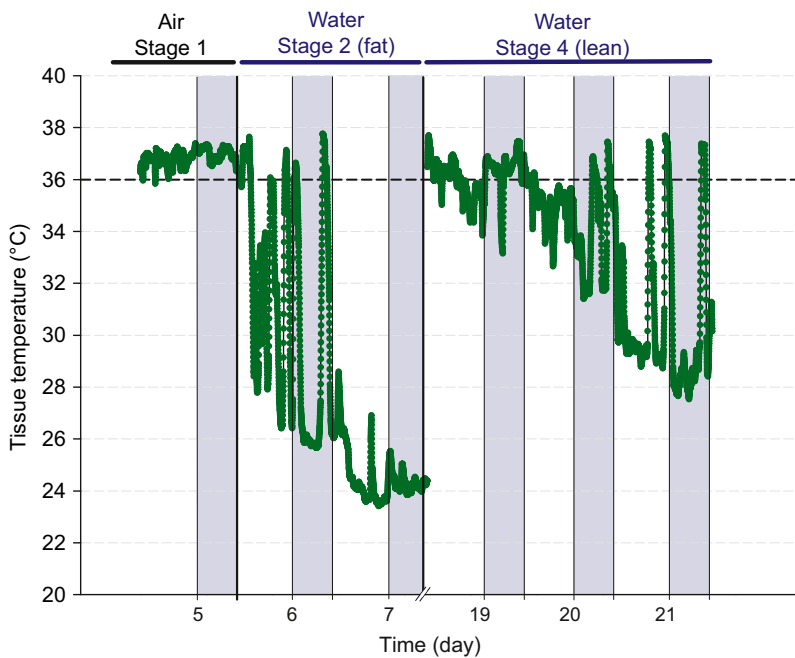


Fig. 6. Continuous temperature recording for the flank tissue of a king penguin (ID1) resting in air (stage 1) and in water (stage 2 and stage 4). Stage 2 and 4 were separated by a 10 day fasting period, not shown here. Night periods are indicated by the grey bars at the top. The dotted line indicates the temperature threshold above which temperatures were considered to be near-normothermic (36°C). Periodic tissue rewarming above the threshold occurred during the night in both the fat and lean condition. However, this occurred more frequently in the lean condition, while the mean temperature during these near-normothermic periods did not differ between conditions.

Tissue temperatures in penguins resting in water during the night differed considerably between sites (Table 1, Figs 2 and 3), with the highest and lowest temperatures recorded from the back and the brood patch, respectively. Temperature was consistently at the highest level in the back, which was the only site typically not submerged (apart from periods of short/shallow submersions) and, hence, exposed to air rather than water (Fig. 1A). Clearly, the heat conservation scenario at this site must have differed considerably from that at all other sites, so that birds could maintain perfusion and high tissue temperatures in the back without being subjected to increased heat loss associated with cold water exposure. By contrast, the lowest temperatures were recorded at the brood patch (Table 1, Figs 2 and 3). This bare and highly vascularized skin fold facilitates the rapid transfer of heat from parent to egg during incubation (Midtgård, 1984, 1985), while it might be a prime site for heat loss when birds are at sea, especially during foraging. Schmidt et al. (2006) suggested that the brood patch might be important in regulating pectoral muscle temperature during diving by allowing a controlled loss of heat via an adjustment of its perfusion ('peripheral perfusion adjustment'). While the recorded brood patch temperatures in our birds resting in water at night were considerably lower than the temperatures observed in birds at sea (Schmidt et al., 2006), they oscillated strongly between day and night (Fig. 2), suggesting some important changes in perfusion status.

Effect of body condition and the nutritional hypothesis

Based on the temperature recordings in various tissues of king penguins foraging at sea (pectoral muscle, brood patch, flank), Schmidt and colleagues (Schmidt, 2006; Schmidt et al., 2006) suggested that the high temperatures observed at night, presumably associated with high heat loss and thermoregulatory costs, are linked with the requirements of maintaining peripheral perfusion to facilitate the deposition of subcutaneous fat after successful foraging. Our experiments recording tissue temperatures in fat and lean birds showed a trend of increasing tissue temperatures during the night (Figs 2 and 4, Table 2), which fits well with our prediction in support of the nutritional hypothesis. Furthermore, night temperatures in the flank were significantly affected by body

condition (Tables 1 and 2). As predicted, flank temperatures of penguins during the night were significantly higher in the lean condition than in the fat condition. These higher flank temperatures recorded in lean birds could be the consequence of either (1) an active regulation of peripheral perfusion, presumably to deposit subcutaneous fat, or (2) a reduced subcutaneous insulation leading to greater heat flux from the core to the skin, without changes in perfusion. As near-normothermic periods that occurred throughout the night reached similar temperature levels in both fat (stage 2) and lean birds (stage 4) but the overall duration of these periods per night was longer in lean birds, our results argue against simple changes in body insulation explaining the observed patterns (Fig. 6). Rather, our results suggest that these higher mean temperatures in the flank of lean birds are the consequence of an active vasomotor regulation, presumably to allow deposition of subcutaneous fat. Such preferential deposition of subcutaneous fat in lean birds would be of great benefit for their insulation in cold water and would keep heat loss at bay (see Enstipp et al., 2017). It also agrees with the suggestion by Blem (1990) that subcutaneous fat in birds tends to be the first deposited. By contrast, fat birds are well insulated; hence, the need to perfuse subcutaneous tissues for fat deposition should be reduced. These birds might instead store any surplus FFA in abdominal adipose tissue and reduce peripheral perfusion to avoid additional heat loss. Our finding that flank temperatures in lean birds remain consistently above abdominal temperatures, while the reverse tends to be true for fat birds, supports such a scenario (Table 1, Fig. 2).

Hence, our results are in general agreement with the suggestion that the apparent paradox of high peripheral temperatures in king penguins during extended resting phases at the surface (reflecting sustained peripheral perfusion) is associated with perfusion requirements for subcutaneous fat deposition. The high thermoregulatory costs associated with such maintained peripheral perfusion are illustrated by our observation that some birds with high peripheral temperatures during the night lost body mass during experimentation (stage 2), despite feeding.

There has been evidence for a delay of digestive processes in king penguins and seals (Gauthier-Clerc et al., 2000; Sparling et al., 2007). By contrast, Svård et al. (2009) found that food digestion

began during foraging in fasted Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) and was not deferred until afterwards, suggesting that access to the ingested energy was important in these nutritionally stressed animals. Our penguins defecated frequently throughout the day in both conditions (fat and lean) and, hence, it seems unlikely that they deferred digestion. Accordingly, our results support the hypothesis that nutritionally stressed lean birds had a greater need to deposit any surplus FFA in the subcutaneous fat for insulation, when compared with fat birds. That a sufficient subcutaneous fat layer is of great importance is illustrated by the observation that fasting grey seal pups (*Halichoerus grypus*) increase protein catabolism to retain a critical subcutaneous fat layer for thermoregulatory reasons (Øritsland et al., 1985). Similarly, Enstipp et al. (2017) found a substantial decline in peripheral temperatures reached during foraging bouts of juvenile and adult king penguins over time and attributed this to changes in body insulation (i.e. subcutaneous fat).

As an alternative to the nutritional hypothesis explaining peripheral normothermia during extended surface breaks in king penguins, Fahlman et al. (2007) suggested that such perfusion is required to support the unloading of N₂, accumulated during diving. Hence, they suggested that N₂ accumulation might force king penguins to terminate foraging bouts, even when prey might be readily available (Fahlman et al., 2007). While such a scenario seems plausible, it is unclear how birds might detect critical levels of N₂ that could trigger peripheral perfusion to flush out N₂. Furthermore, although not explicitly investigated in our experiment, peripheral rewarming observed in our birds during the night (reflecting peripheral perfusion) in the absence of diving activity during the day does not lend support to the N₂ unloading hypothesis. Accordingly, we suggest that increased peripheral temperatures observed during the night in our birds reflect tissue perfusion required for the deposition of fat in subcutaneous adipose tissue. Higher peripheral temperatures in the lean condition reflect the preferential deposition of subcutaneous fat under these circumstances.

Finally, Fahlman et al. (2005) suggested that the metabolic and regional temperature changes they observed in fasting (non-fed) king penguins in water (trials of ~3 h) were associated with the need to mobilize fuel from subcutaneous adipose tissue. This is of course the flip side of the coin and it would be most interesting to study the temperature changes associated with both feeding (fat deposition) and fasting (fat mobilization) periods. Such a study should shed more light on the apparent trade-off between nutritional dynamics and thermoregulation.

Acknowledgements

We are grateful to Mathieu Brucker for his technical expertise and support in building the seawater tank. Thibaut Hestin, Caroline Bost and Quentin Schull provided valuable help in the field. We would also like to thank the three referees for their constructive criticism and helpful comments.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: A.L., Y.H.; Methodology: A.L., Y.H.; Software: B.P.; Formal analysis: A.L., B.P.; Investigation: A.L., T.v.W.; Writing - original draft: A.L., M.R.E.; Writing - review & editing: A.L., M.R.E.; Supervision: Y.H.

Funding

Research project No. 394 was supported by the Institut Polaire Français Paul Emile Victor and by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-INEE). Logistic support in the field was provided by the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF). A.L. was the recipient of a scholarship from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de la recherche et de la technologie.

References

- Behnke, A. R., Thomson, R. M. and Shaw, L. A. (1935). The rate of elimination of dissolved nitrogen in man in relation to the fat and water content of the body. *Am. J. Physiol.* **114**, 137–146.
- Bertile, F., Criscuolo, F., Oudart, H., Le Maho, Y. and Raclot, T. (2003). Differences in the expression of lipolytic-related genes in rat white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 540–546.
- Blem, C. R. (1990). Avian energy storage. *Curr. Ornithol.* **7**, 59–113.
- Bottje, W. G. and Harrison, P. C. (1986). The effect of high ambient temperature and hypercapnia on postprandial intestinal hyperemia in domestic cockerels. *Poult. Sci.* **65**, 1606–1614.
- Bottje, W. G. and Harrison, P. C. (1987). Celiac cyclic blood flow pattern response to feeding and heat exposure. *Poult. Sci.* **66**, 2039–2042.
- Butler, P. J. (2004). Metabolic regulation in diving birds and mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **141**, 297–315.
- Cabanac, M. and Aizawa, S. (2000). Fever and tachycardia in a bird (*Gallus domesticus*) after simple handling. *Physiol. Behav.* **69**, 541–545.
- Charrassin, J.-B., Bost, C. A., Pütz, K., Lage, J., Dahier, T., Zorn, T. and Le Maho, Y. (1998). Foraging strategies of incubating and brooding king penguins *Aptenodytes patagonicus*. *Oecologia* **114**, 194–201.
- Charrassin, J.-B., Kato, A., Handrich, Y., Sato, K., Naito, Y., Ancel, A., Bost, C.-A., Gauthier-Clerc, M., Ropert-Coudert, Y. and Le Maho, Y. (2001). Feeding behaviour of free-ranging penguins determined by oesophageal temperature. *Proc. Biol. Sci.* **268**, 151–157.
- Charrassin, J.-B., Le Maho, Y. and Bost, C.-A. (2002). Seasonal changes in the diving parameters of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Mar. Biol.* **141**, 581–589.
- Cherel, Y. and Le Maho, Y. (1985). Five months of fasting in king penguin chicks: body mass loss and fuel metabolism. *Am. J. Physiol.* **249**, R387–R392.
- Cherel, Y., Charrassin, J.-B. and Handrich, Y. (1993). Comparison of body reserve buildup in prefasting chicks and adults of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Physiol. Zool.* **66**, 750–770.
- Cherel, Y., Gilles, J., Handrich, Y. and Le Maho, Y. (1994). Nutrient reserve dynamics and energetics during long-term fasting in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Zool.* **234**, 1–12.
- Culik, B. M., Wilson, R. and Bannasch, R. (1994). Underwater swimming at low energetic cost by pygoscelid penguins. *J. Exp. Biol.* **197**, 65–78.
- Culik, B. M., Pütz, K., Wilson, R. P., Allers, D., Lage, J., Bost, C.-A. and Le Maho, Y. (1996a). Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **199**, 973–983.
- Culik, B. M., Pütz, K., Wilson, R. P., Bost, C.-A., Le Maho, Y. and Verselin, J.-L. (1996b). Core temperature variability in diving king penguins (*Aptenodytes patagonicus*): a preliminary analysis. *Polar Biol.* **16**, 371–378.
- De Vries, J. and van Eerden, M. R. (1995). Thermal conductance in aquatic birds in relation to the degree of water contact, body mass, and body fat: energetic implications of living in a strong cooling environment. *Physiol. Zool.* **68**, 1143–1163.
- Dejours, P. (1987). Water and air physical characteristics and their physiological consequences. In *Comparative Physiology: Life in Water and on Land* (ed. P. Dejours, L. Bolis, C. R. Taylor and E. R. Weibel), pp. 3–11. Berlin: Springer Verlag.
- Edgar, J. L., Nicol, C. J., Pugh, C. A. and Paul, E. S. (2013). Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. *Physiol. Behav.* **119**, 195–200.
- Eichhorn, G., Groscolas, R., Le Glaunec, G., Parisel, C., Arnold, L., Medina, P. and Handrich, Y. (2011). Heterothermy in growing king penguins. *Nat. Commun.* **2**, 435.
- Enstipp, M. R., Jones, D. R., Lorentsen, S.-H. and Grémillet, D. (2007). Energetic costs of diving and prey-capture capabilities in cormorants and shags (*Phalacrocoracidae*) underline their unique adaptation to the aquatic environment. *J. Ornithol.* **148** Suppl. 2, S593–S600.
- Enstipp, M. R., Grémillet, D. and Jones, D. R. (2008). Heat increment of feeding in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) and its potential for thermal substitution. *J. Exp. Biol.* **211**, 49–57.
- Enstipp, M. R., Bost, C.-A., Le Bohec, C., Bost, C., Le Maho, Y., Weimerskirch, H. and Handrich, Y. (2017). Apparent changes in body insulation of juvenile king penguins suggest an energetic challenge during their early life at sea. *J. Exp. Biol.* **220**, 2666–2678.
- Fahlman, A., Schmidt, A., Handrich, Y., Woakes, A. J. and Butler, P. J. (2005). Metabolism and thermoregulation during fasting in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*, in air and water. *Am. J. Physiol.* **289**, R670–R679.
- Fahlman, A., Schmidt, A., Jones, D. R., Bostrom, B. L. and Handrich, Y. (2007). To what extent might N₂ limit dive performance in king penguins? *J. Exp. Biol.* **210**, 3344–3355.
- Froget, G., Handrich, Y., Le Maho, Y., Rouanet, J.-L., Woakes, A. J. and Butler, P. J. (2002). The heart rate/oxygen consumption relationship during cold exposure of the king penguin: a comparison with that during exercise. *J. Exp. Biol.* **205**, 2511–2517.
- Froget, G., Butler, P. J., Woakes, A. J., Fahlman, A., Kuntz, G., Le Maho, Y. and Handrich, Y. (2004). Heart rate and energetics of free-ranging king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **207**, 3917–3926.

- Gallavan, R. H. and Chou, C. C.** (1985). Possible mechanisms for the initiation and maintenance of postprandial intestinal hyperemia. *Am. J. Physiol.* **249**, G301-G308.
- Gauthier-Clerc, M., Le Maho, Y., Clerquin, Y., Drault, S. and Handrich, Y.** (2000). Penguin fathers preserve food for their chicks. *Nature* **408**, 928-929.
- Green, J. A., Frappel, P. B., Clark, T. D. and Butler, P. J.** (2006). Physiological response to feeding in little penguins. *Physiol. Biochem. Zool.* **79**, 1088-1097.
- Grémillet, D., Wanless, S., Carss, D. N., Linton, D., Harris, M. P., Speakman, J. R. and Le Maho, Y.** (2001). Foraging energetics of arctic cormorants and the evolution of diving birds. *Ecol. Lett.* **4**, 180-184.
- Handrich, Y., Bevan, R. M., Charrassin, J.-B., Butler, P. J., Putz, K., Woakes, A. J., Lage, J. and Le Maho, Y.** (1997). Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* **388**, 64-67.
- Herborn, K. A., Graves, J. L., Jerem, P., Evans, N. P., Nager, R., McCafferty, D. J. and McKeegan, D. E. F.** (2015). Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiol. Behav.* **152**, 225-230.
- Jouventin, P.** (1982). *Visual and Vocal Signals in Penguins, Their Evolution and Adaptive Characters*. Berlin: Verlag Paul Parey.
- Knower Stockard, T., Heil, J., Meir, J. U., Sato, K., Ponganis, K. V. and Ponganis, P. J.** (2005). Air sac PO₂ and oxygen depletion during dives of emperor penguins. *J. Exp. Biol.* **208**, 2973-2980.
- Kooyman, G. L.** (1989). *Diverse Divers*. Berlin: Springer Verlag.
- Kooyman, G. L., Gentry, R. L., Bergman, W. P. and Hammel, H. T.** (1976). Heat loss in penguins during immersion and compression. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **54**, 75-80.
- Kvadshem, P. H. and Folkow, L. P.** (1997). Blubber and flipper heat transfer in harp seals. *Acta Physiol. Scand.* **161**, 385-395.
- Lovvorn, J. R.** (2007). Thermal substitution and aerobic efficiency: measuring and predicting effects of heat balance on endotherm diving energetics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **362**, 2079-2093.
- Markussen, N. H. and Ryg, M.** (1992). Metabolic rate and body composition of harbour seals, *Phoca vitulina*, during starvation and refeeding. *Can. J. Zool.* **70**, 220-224.
- Meir, J. U. and Ponganis, P. J.** (2009). High-affinity hemoglobin and blood oxygen saturation in diving emperor penguins. *J. Exp. Biol.* **212**, 3330-3338.
- Meir, J. U., Stockard, T. K., Williams, C. L., Ponganis, K. V. and Ponganis, P. J.** (2008). Heart rate regulation and extreme bradycardia in diving emperor penguins. *J. Exp. Biol.* **211**, 1169-1179.
- Midtgård, U.** (1984). Density of arteriovenous anastomoses in some skin areas of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Anat. Rec.* **209**, 455-459.
- Midtgård, U.** (1985). Arteriovenous anastomoses in the incubation patch of herring gulls. *Condor* **87**, 549-551.
- Moore, G. J., Wienecke, B. and Robertson, G.** (1999). Seasonal change in foraging areas and dive depths of breeding king penguins at Heard Island. *Polar Biol.* **21**, 376-384.
- Nordøy, E. S. and Blix, A. S.** (1985). Energy sources in fasting grey seal pups evaluated with computed tomography. *Am. J. Physiol.* **249**, R471-R476.
- Nordøy, E. S., Ingebretsen, O. C. and Blix, A. S.** (1990). Depressed metabolism and low protein catabolism in fasting grey seal pups. *Acta Physiol. Scand.* **139**, 361-369.
- Ørntland, N. A., Päsche, A. J., Markussen, N. H. and Ronald, K.** (1985). Weight loss and catabolic adaptations to starvation in grey seal pups. *Comp. Biochem. Physiol. A* **82**, 931-933.
- Pond, C. M. and Mattacks, C. A.** (1985). Cellular structure of adipose tissue in birds. *J. Morphol.* **185**, 195-202.
- Ponganis, P. J., van Dam, R. P., Knower, T. and Levenson, D. H.** (2001). Temperature regulation in emperor penguins foraging under sea ice. *Comp. Biochem. Physiol. A* **129**, 811-820.
- Ponganis, P. J., van Dam, R. P., Levenson, D. H., Knower, T., Ponganis, K. V. and Marshall, G.** (2003). Regional heterothermy and conservation of core temperature in emperor penguins diving under sea ice. *Comp. Biochem. Physiol. A* **135**, 477-487.
- Ponganis, P. J., Stockard, T. K., Meir, J. U., Williams, C. L., Ponganis, K. V., van Dam, R. P. and Howard, R.** (2007). Returning on empty: extreme blood O₂ depletion underlies dive capacity of emperor penguins. *J. Exp. Biol.* **210**, 4279-4285.
- Ponganis, P. J., Stockard, T. K., Meir, J. U., Williams, C. L., Ponganis, K. V. and Howard, R.** (2009). O₂ store management in diving emperor penguins. *J. Exp. Biol.* **212**, 217-224.
- Ponganis, P. J., Meir, J. U. and Williams, C. L.** (2011). In pursuit of Irving and Scholander: a review of oxygen store management in seals and penguins. *J. Exp. Biol.* **214**, 3325-3339.
- Pütz, K. and Bost, C.-A.** (1994). Feeding behavior of free-ranging king penguins (*Aptenodytes Patagonicus*). *Ecology* **75**, 489-497.
- Pütz, K. and Chereil, Y.** (2005). The diving behaviour of brooding king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) from the Falkland Islands: variation in dive profiles and synchronous underwater swimming provide new insights into their foraging strategies. *Mar. Biol.* **147**, 281-290.
- Pütz, K., Wilson, R. P., Charrassin, J.-B., Raclot, T., Lage, T., Le Maho, Y., Kierspel, M. A. M., Culik, B. M. and Adelung, D.** (1998). Foraging strategy of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) during summer at the Crozet Islands. *Ecology* **79**, 1905-1921.
- Sato, K., Shiomi, K., Marshall, G., Kooyman, G. L. and Ponganis, P. J.** (2011). Stroke rates and diving air volumes of emperor penguins: implications for dive performance. *J. Exp. Biol.* **214**, 2854-2863.
- Schmidt, A.** (2006). Etude de la thermorégulation en mer chez le manchot royal: mécanismes et conséquences énergétiques. PhD thesis, Université de Strasbourg, France.
- Schmidt, A., Alard, F. and Handrich, Y.** (2006). Changes in body temperature in king penguins at sea: the result of fine adjustments in peripheral heat loss? *Am. J. Physiol.* **291**, R608-R618.
- Sparling, C. E., Fedak, M. A. and Thompson, D.** (2007). Eat now, pay later? Evidence of deferred food-processing costs in diving seals. *Biol. Lett.* **3**, 94-98.
- Sugden, M. C., Grimshaw, R. M., Lall, H. and Holness, M. J.** (1994). Regional variations in metabolic responses of white adipose tissue to food restriction. *Am. J. Physiol.* **267**, E892-E899.
- Svärd, C., Fahlman, A., Rosen, D. A. S., Joy, R. and Trites, A. W.** (2009). Fasting affects the surface and diving metabolic rates of Steller sea lions *Eumetopias jubatus*. *Aquat. Biol.* **8**, 71-82.
- West, D. B., Prinz, W. A. and Greenwood, M. R.** (1989). Regional changes in adipose tissue blood flow and metabolism in rats after a meal. *Am. J. Physiol.* **257**, R711-R716.
- Wienecke, B., Robertson, G., Kirkwood, R. and Lawton, K.** (2006). Extreme dives by free-ranging emperor penguins. *Polar Biol.* **30**, 133-142.
- Williams, C. L., Meir, J. U. and Ponganis, P. J.** (2011). What triggers the aerobic dive limit? Patterns of muscle oxygen depletion during dives of emperor penguins. *J. Exp. Biol.* **214**, 1802-1812.
- Wilson, R. P., Hustler, K., Ryan, P. G., Burger, A. E. and Noldeke, E. C.** (1992). Diving birds in cold water: do Archimedes and Boyle determine energetic costs? *Am. Nat.* **140**, 179-200.

IV

Chapitre 2

Lewden, A., Enstipp, M.R., Bonnet, B., Bost, C., Georges, J.Y., Handrich, Y. (2017)
Thermal strategies of king penguins during prolonged fasting in water. *J. Exp. Biol.* *Proof*



RESEARCH ARTICLE

Thermal strategies of king penguins during prolonged fasting in water

Agnès Lewden^{1,*}, Manfred R. Enstipp^{1,2}, Batshéva Bonnet², Caroline Bost², Jean-Yves Georges¹ and Yves Handrich¹

ABSTRACT

Most animals experience periods of unfavourable conditions, challenging their daily energy balance. During breeding, king penguins fast voluntarily for up to 1.5 months in the colony, after which they replenish their energy stores at sea. However, at sea, birds might encounter periods of low foraging profitability, forcing them to draw from previously stored energy (e.g. subcutaneous fat). Accessing peripheral fat stores requires perfusion, increasing heat loss and thermoregulatory costs. Hence, how these birds balance the conflicting demands of nutritional needs and thermoregulation is unclear. We investigated the physiological responses of king penguins to fasting in cold water by: (1) monitoring tissue temperatures, as a proxy of tissue perfusion, at four distinct sites (deep and peripheral); and (2) recording their oxygen consumption rate while birds floated inside a water tank. Despite frequent oscillations, temperatures of all tissues often reached near-normothermic levels, indicating that birds maintained perfusion to peripheral tissues throughout their fasting period in water. The oxygen consumption rate of birds increased with fasting duration in water, while it was also higher when the flank tissue was warmer, indicating greater perfusion. Hence, fasting king penguins in water maintained peripheral perfusion, despite the associated greater heat loss and, therefore, thermoregulatory costs, probably to access subcutaneous fat stores. Hence, the observed normothermia in peripheral tissues of king penguins at sea, upon completion of a foraging bout, is likely explained by their nutritional needs: depositing **free fatty acids (FFAs)** in subcutaneous tissues after profitable foraging or mobilizing **FFAs** to fuel metabolism when foraging success was insufficient.

KEY WORDS: Thermoregulation, Seabirds, Subcutaneous fat, Normothermia, Fat mobilization, Heat loss

INTRODUCTION

Most animals experience periods of unfavourable conditions, where, e.g. climatic conditions and/or food scarcity might challenge their daily energy balance. If energy expenditure is exceeding energy intake, animals might be able to draw from previously stored energy (e.g. subcutaneous fat) and/or they might change their activity patterns in an attempt to reduce energy expenditure. In the long run, however, the energy budget will have to be balanced to avoid negative consequences for fitness and survival (Drent and Daan, 1980).

In birds, many species regularly encounter voluntary fasting periods (e.g. during reproduction), which range from a few days up to several months. The most extreme example is the 4 months fasting period of male emperor penguins (*Aptenodytes forsteri*) during courtship and incubation in the middle of the Antarctic winter, when air temperatures may reach as low as -40°C and wind speeds as high as 40 m s^{-1} (Stonehouse, 1953; Le Maho et al., 1976). Accumulating fat depots before fasting periods and reducing energy use during these periods by reducing activity or the need for active heat production will all be important strategies to buffer these animals against starvation (Hohtola, 2012). For example, Tattersall et al. (2016) showed that fasting Muscovy ducklings (*Cairina moschata*) at thermoneutrality reduce blood perfusion to thermal windows (e.g. bill surfaces), thereby lowering thermal conductance, allowing birds to maintain their core temperature at lower energetic costs. Similarly, huddling in fasting emperor penguins is a well-known mechanism to reduce heat loss, reducing thermoregulatory costs (Gilbert et al., 2008). Furthermore, allowing a regulated drop in body temperature will reduce the costs of maintaining normothermia below thermal neutrality (Hohtola, 2012). This is due to: (1) a reduction in tissue metabolism due to the temperature dependence of metabolism (Q_{10} effect); and (2) the declining temperature gradient between the animal and its surroundings, reducing heat loss (McCue, 2010). The ability of some bird species to lower their body temperature during periods of food limitation has been known for a long time (Chossat, 1843; Hohtola, 2012). Regulated hypothermia has been observed in many bird species, spanning a body mass (M_b) range of between $<3\text{ g}$ and ca. 6500 g, and associated reductions in metabolic rate have also been reported (see McKechnie and Lovegrove, 2002 and McCue, 2010 for review).

In large birds, such as geese and penguins, core temperature reductions during fasting are typically small (Le Maho et al., 1981; Groscolas, 1986; Fahlman et al., 2005; but see Butler and Woakes, 2001 and Eichhorn et al., 2011). Nevertheless, these animals usually show a decline in their **basal metabolic rate** during fasting, most likely due to a decline in peripheral temperature, reducing the **body volume** that is maintained at normothermia (Dewasmes et al., 1980; Le Maho et al., 1981; Cherel et al., 1988; Fahlman et al., 2005).

During breeding, king penguins (*Aptenodytes patagonicus* J. F. Miller 1778) alternate shifts at the colony with foraging trips at sea. While extended fasting periods at sea are unlikely, birds might have to travel extensively to reach profitable foraging grounds, during which feeding might not be possible. During the Austral winter, the availability of their preferred prey (myctophid fish; Cherel and Ridoux, 1992; Raclot et al., 1998; Bost et al., 2002) declines (Kozlov et al., 1991), so that birds have to roam over greater distances and dive to greater depths to capture prey (Charrassin and Bost, 2001; Charrassin et al., 2002). Furthermore, Bost et al. (2015) showed that during the last decades, frequent large-scale climatic

¹Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France.

²Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS, UMR 7372, 79360 Villiers en Bois, France.

*Author for correspondence (agnes.lewden@iphc.cnrs.fr)

 A.L., 0000-0002-9303-2735

List of abbreviations

FFAs	free fatty acids
M_b	body mass (kg)
RMR	resting metabolic rate
T_w	water temperature (°C)
\dot{V}_{O_2}	oxygen consumption rate (ml min ⁻¹)
$s \dot{V}_{O_2}$	mass-specific oxygen consumption rate (ml min ⁻¹ kg ⁻¹)
\dot{V}_{CO_2}	CO ₂ production rate (ml min ⁻¹)

anomalies occurred in the southern Indian and Atlantic Oceans that shifted the preferred foraging zone of king penguins southward, so that the distance birds had to travel and their foraging depth increased significantly. Hence, foraging might not always be profitable, so that the energy balance of birds on a daily basis might be negative. During these periods, birds have to rely on energy reserves, stored in the abdominal and subcutaneous adipose tissues (Cherel et al., 1994). However, access of these energy stores requires tissue perfusion, which will lead to a warming of these tissues. In the case of the subcutaneous fat store, this will increase the thermal gradient between the periphery and the surrounding water, increasing heat loss, which is considerably greater in water than in air (Kooyman et al., 1976; Dejours, 1987), elevating thermoregulatory costs. Hence, **because of** the dual function of their subcutaneous adipose tissue, which serves as an energy store but also as an important insulator, king penguins face a conflicting situation during periods of insufficient food intake at sea: (1) maintain peripheral vasoconstriction, as during diving, to reduce heat loss but potentially run out of fuel; or (2) vasodilate the periphery to access the fuel source but increase heat loss and thermoregulatory costs. For juvenile king penguins, during their first months at sea, such an energetic challenge might be **crucial** (Orgeret et al., 2016; Enstipp et al., 2017).

Previous studies investigated some of these issues in king penguins that floated inside a shallow water channel (at 4°C; Fahlman et al., 2005). During these short trials (~3 h), resting metabolic rate (RMR) was significantly greater in fasted birds when compared with fed birds, most likely **because of** differences in body insulation. However, when investigating the effect of total fasting duration on penguin RMR in water, Fahlman et al. (2004) found that total fasting duration (in air) had little effect on penguin RMR in water. **As** birds were maintained in air and only entered the water channel for relatively short periods at a time **in these studies**, the physiological responses of birds to extended fasting periods in water remain unclear.

Hence, our study investigated the conflicting situation encountered by king penguins when fasting for extended periods in cold water. Implanting temperature loggers into peripheral and deep tissues before birds underwent a specific protocol of fasting in air or water, we studied the changes of tissue temperatures associated with fasting in water as an index of tissue perfusion status. We also investigated the metabolic costs associated with fasting in water, the effect of fasting duration, and the relationship between peripheral tissue temperature and bird metabolic rate. We predicted that birds will initially maintain peripheral perfusion when fasting in water ('short' fast) to mobilize fuel but will reduce peripheral perfusion during a later fasting period ('long' fast). The latter prediction we based on the expectation that birds should maintain a **crucial** fat layer thickness to avoid heat loss and thermoregulatory costs to spiral out of control, as has been suggested for seal pups (Øritsland et al., 1985). Finally, we

compared the observed temperature changes of king penguins when fasting in water with changes that occur when birds are feeding in water (Lewden et al., 2017).

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted at the king penguin colony ('La Baie du Marin') on Possession Island, Crozet Archipelago (46°25'34"S, 51°51'36"E); a colony of ~16,000 breeding pairs (Delord et al., 2004). During three consecutive Austral summers, between November 2013 and March 2016, we captured a total of 17 male king penguins (identified by song; Jouventin, 1982) during the courtship phase of their breeding cycle, equipped them with temperature data loggers and maintained them for ~4 weeks each in a captive setting. All birds underwent a specific protocol that consisted of a series of feeding and fasting periods in air and/or in water. In a previous **study**, we investigated the physiological responses of king penguins to feeding, when maintained inside a shallow **seawater** tank (see Lewden et al., 2017). Here, we report our investigation into the physiological responses of king penguins to prolonged fasting in water. Both investigations were conducted as a single experiment and the experimental protocol was designed accordingly (Fig. 1). The aim of both investigations was to shed some light into the apparent trade-off between nutritional dynamics and thermoregulation of king penguins at sea. Hence, in the current **study**, we will contrast and discuss our results from both investigations. All experimental procedures were approved by the French ethics committee (APAFIS, permit no. 02015041411414001) and the French Polar Environmental Committee (permit no. 2013-76, 2014-121).

Temperature loggers and surgical procedure

Individual **penguins** were equipped with four temperature loggers (iButton, MXMDS1922L-F5; Maxim Integrated, San Jose, CA, USA; resolution ±0.0625°C; range 0–50°C; diameter and height 17.4×5.9 mm; mass 2.9 g; recalibrated in a water bath with an absolute accuracy of ±0.1°C) at four distinct locations, which recorded instant temperature every 11 min. **Three of the four** temperature loggers **were** implanted into the subcutaneous fat layer within (1) the flank, (2) the back and (3) the brood patch, while the last logger (4) was placed into the abdominal cavity, lateral to the brood patch. The **three** peripheral loggers were positioned about halfway between the muscle and the skin, and care was taken to achieve comparable logger positioning in all birds. During experimentation, we also recorded ambient air temperature in the enclosure and water temperatures (T_w) within the tank (monitored with **iButtons**; in water submerged to 0.8 m). Temperature loggers were implanted **on** the day of capture under general **anaesthesia**, as detailed in Lewden et al. (2017). After surgery, birds were maintained inside a wooden enclosure (3×3 m, no roof) for an average of 6.0 ±0.1 days for recovery, before experimentation started.

Experimental design

To investigate the physiological responses of king penguins to fasting in cold water, all birds underwent a specific protocol that consisted of two 2-day fasting periods inside a shallow **seawater** tank, which were separated by fasting periods of 4–7 days in air (see Figs 1 and 2 for an outline of the temporal organization of our experiment). Two birds at a time were maintained inside this shallow **seawater** tank (2.5×1.3×1.2 m; length, width and height, filled to a **depth of** 0.8 m) that was supplied continuously with fresh **seawater** from the adjacent bay (mean T_w in tank: 7.7±0.9°C; see Lewden et al., 2017 for details). When initially introduced to the tank, birds conducted a few brief and shallow dives, after which they

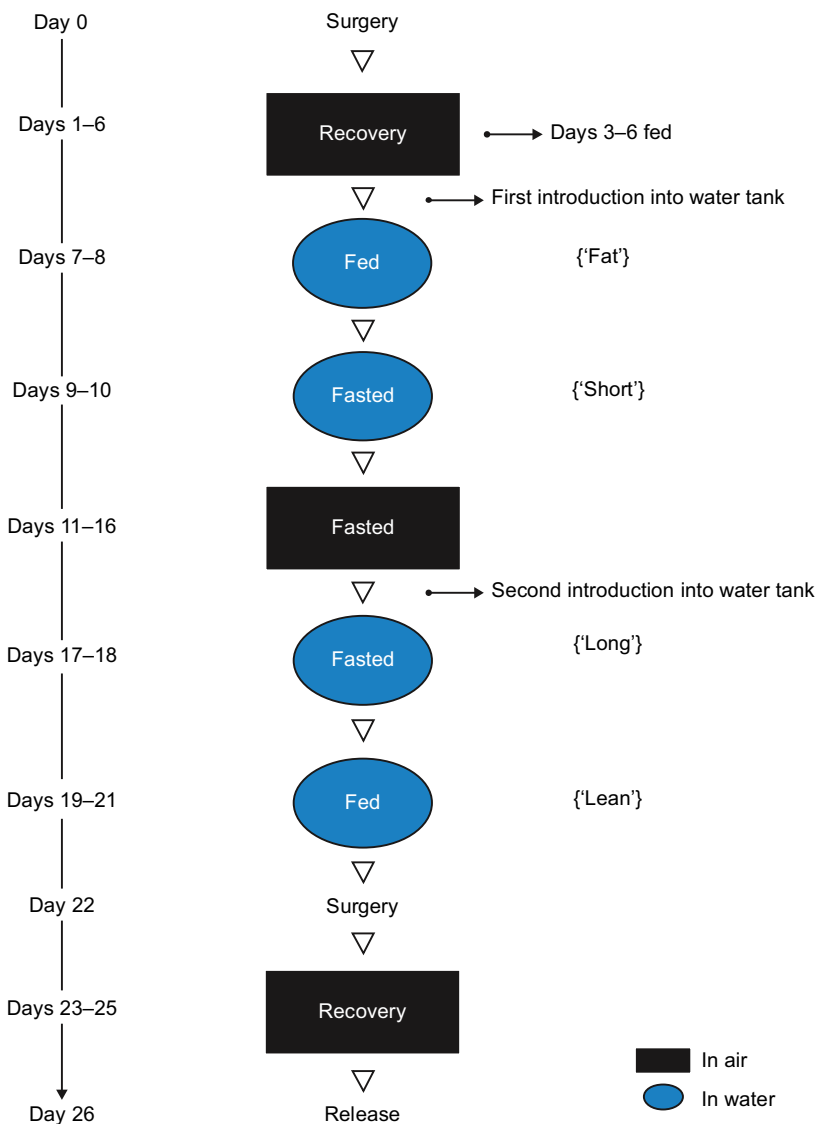


Fig. 1. Flow chart illustrating the experimental protocol to investigate the physiological responses of king penguins to feeding and fasting in water. The black and blue bars indicate periods spent in air and in water, respectively. The fasting duration in air differed between trials (range 7–10 days), while birds fasted on average for 10 days between feeding sessions in the tank (range 8–11 days). ‘Fat’ and ‘Lean’ refer to different body condition states during feeding trials in water (see Lewden et al., 2017), whereas ‘Short’ and ‘Long’ refer to different fasting durations in the current study.

typically floated calmly. No antagonistic behaviour between birds was observed. The experimental protocol was designed to facilitate both investigations (the physiological effect of feeding and fasting in water) and an idealized outline is presented in Fig. 1. However, the experimental protocol varied between years, allowing the effect of total fasting duration (in air and water) on peripheral perfusion to be investigated, as visible in Fig. 2: during year 1 ($N=6$), stage 2, the first fast in the water tank started with birds that had fasted in air for 6 days (Fig. 2A), whereas during year 2 ($N=7$), stage 2, started with birds that had been fed inside the water tank (Fig. 2B). Accordingly, fasting duration in air (7–10 days) and total fasting duration (11–14 days) varied between years, whereas the fasting time in water was identical in all cases, i.e. 4 days (Figs 1 and 2). The accumulative time spent fasting during each year (in air/water) is indicated in Fig. 2 (‘Total fasting duration’). Concerning the current investigation, our protocol included four distinct periods, during which we recorded tissue temperatures in birds: (1) stage 1 (not shown in Fig. 2 and not included in our analysis), during which birds fasted for 6 days inside the wooden enclosure (but see above); (2) stage 2, during which birds spent two consecutive days fasting inside the water tank (experimental days I–II; ‘short’ fast); (3) stage

3, during which birds fasted for 4–7 days inside the wooden enclosure in air; and (4) stage 4, during which birds spent another two consecutive days fasting inside the water tank (experimental days III–IV; ‘long’ fast; Figs 1 and 2).

When inside the water tank, disturbance of birds was kept to a minimum. However, each bird was captured and removed briefly (<5 min) from the tank once every other day for weighing (M_b). During the third year ($N=4$ birds), the focus was on respirometry trials, which were conducted with single birds in the morning and afternoon. Accordingly, one of the birds was removed from the tank during these periods. During this last year, two birds also underwent a fasting period of 6 days in air before introduction to the water tank, while the other two birds were fed up to the day before introduction. Upon introduction during that year, birds were fasted within the water tank for a continuous period of up to 4 days.

Respirometry trials

During the third year, we measured oxygen consumption rates (\dot{V}_{O_2}) in four penguins, when they floated calmly inside the seawater tank, using an open-circuit respirometry system (‘Turbofox’; Sable Systems, Henderson, NV, USA). Respirometry trials were

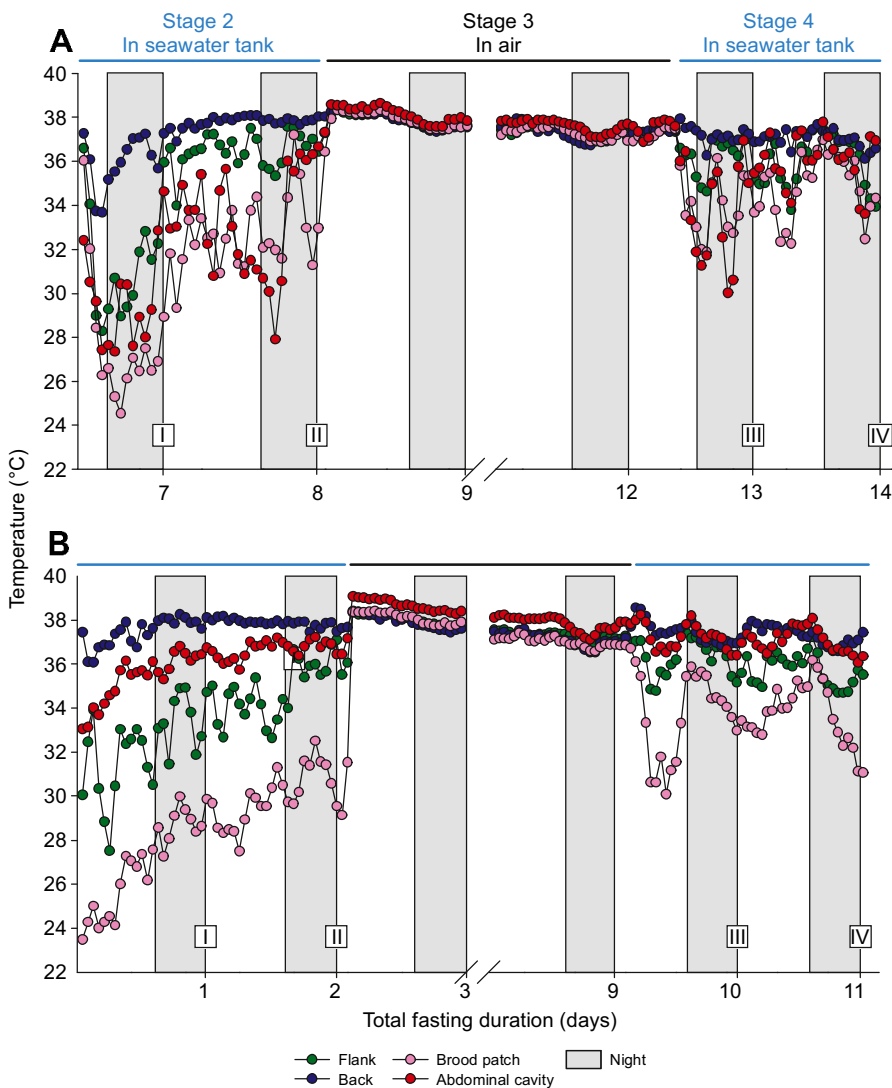


Fig. 2. Tissue temperatures recorded in four tissues of king penguins throughout experimentation. Birds fasted in a seawater tank during stages 2 and 4, while they fasted on land during stage 3. Values are hourly means shown separately for year 1 (A) and year 2 (B). $N=6$ and 7 birds for year 1 and year 2, respectively. The total fasting duration of birds (in water and air) is indicated in Arabic numbers (position of the numbers corresponds with the end of the indicated fasting day), while the fasting days in water (experimental days) are indicated by Roman numbers (I–IV). Night periods are indicated by the grey shading.

conducted throughout the fasting period, after birds had fasted between 0.58 and 3.91 days within the seawater tank (between 0.58 and 8.22 days of total fasting duration). We conducted a total of 13 trials (between two and six trials per bird) that lasted on average 1.5 h. Penguins were trained to remain and breathe inside a transparent Plexiglas dome with the shape of a diamond and a sloped ceiling (44×44×15–20 cm, long×wide×high; volume ~30 l), which served as the respirometry chamber. The remaining water surface was covered with mesh, to prevent surfacing outside the chamber, in case birds submerged. The open bottom end of the chamber was slightly submerged within the seawater tank to provide a seal. Three small holes near the bottom of the chamber allowed ambient air to enter the dome. During a trial, the primary flow control unit of the Turbofox pulled air through the chamber at a rate of 50 l min⁻¹ [automatically corrected to standard temperature and pressure (STP), 273 K and 101.3 kPa]. A subsample (200 ml min⁻¹) was passed through a humidity meter (RH-300), a CO₂ analyser and a fuel cell oxygen analyser. Oxygen and CO₂ concentrations within the chamber, main flow rate through the chamber, humidity of the gas sample and barometric pressure were recorded every 4 s onto a laptop computer using ExpeData (Sable Systems). All connections between the various components of the respirometry system were made using gas-impermeable tubing. The

gas analysers were calibrated before each trial using ambient air scrubbed of water vapour (magnesium perchlorate) and CO₂ (Ascarite and Soda lime; all chemicals from Sigma–Aldrich Chemie, Lyon, France), while the CO₂ analyser was spanned with 0.49% CO₂ (Alphagaz; Air Liquide, Paris, France). The humidity meter was calibrated weekly, according to recommendations of the manufacturer. We used wet and dried (using magnesium perchlorate) ambient air to set the span and zero water vapour pressure reading (kPa), respectively.

Data analysis and statistics

In our analysis of body temperature variation, we first calculated mean hourly values for each bird and all tissues throughout stages 2–4 (experimental days I–II, fasting in air, and experimental days III–IV), from which we calculated grand means from all birds during year 1 and year 2 (Fig. 2). For our statistical analysis, values from all birds during the first two years were then pooled ($N=13$ birds), while the temperature values from the four birds during year 3 were excluded from this part of the analysis, as the experimental protocol differed (focus on respirometry). In a second step, we calculated mean tissue temperatures for each experimental day, split into daytime (08:00 h to 22:00 h) and night-time periods (22:00 h to 08:00 h). As tissue temperatures declined strongly when birds were

first introduced to the water tank, after which they recovered (Fig. 2), we excluded the daytime part of experimental days I and III from our statistical analysis. Thirdly, to investigate temperature variations throughout the penguin body during fasting, we selected the highest (maximum; in air) and highest/lowest (maximum/minimum; in water) mean hourly temperatures recorded across all tissues (grand means from all birds) throughout the fasting period. Temperature variations were investigated separately for the fasting periods in air (stage 3) and in water (stages 2 and 4). In a further step, we focused on the flank tissue and investigated episodes when flank tissue temperatures of birds were $\geq 36^{\circ}\text{C}$ while fasting in water (stages 2 and 4), which we defined as normothermic events. For these events, we recorded the maximum temperature per event, event duration (minutes) and the total number of events per day/night period. From this, we calculated the mean maximum flank temperature during these episodes for day and night periods (experimental days I–IV) and their cumulative duration (expressed as a percentage of day/night periods spent at normothermia). Lastly, to compare tissue temperature changes in king penguins associated with fasting conditions with those of feeding (see Lewden et al., 2017), we plotted the mean hourly temperatures for all tissues from all birds (grand means from 13 birds) when fasting throughout stages 2–4 in comparison with those of seven birds that were fed throughout these stages (data from Lewden et al., 2017).

Respirometry data were analysed using ExpeData (Sable Systems). Gas analyser drift and lag time of the respirometry system were corrected for. Main flow rate was corrected to STP dry (STPD) using eqn 8.6 in Lighton (2008). Similarly, we did not scrub water vapour before gas analysis but corrected for this dilution effect during data analysis using eqn 15.3 in Lighton (2008). \dot{V}_{O_2} and CO_2 production rate (\dot{V}_{CO_2}) were calculated using eqns 11.7 and 11.8 in Lighton (2008), respectively. To investigate the link between fasting time inside the water tank and \dot{V}_{O_2} , we selected a stable 10 min segment of \dot{V}_{O_2} data from each respirometry trial, when birds floated calmly inside the respirometry chamber, to represent the metabolic rate of the bird for that trial. To investigate the link between flank temperature and metabolic rate, when birds fasted inside the water tank, we selected multiple periods throughout each trial when \dot{V}_{O_2} was stable for at least 5 min ($n=12$ observations in six trials, $N=1$ bird) and plotted \dot{V}_{O_2} against the corresponding flank temperatures for each period. As instantaneous temperatures were recorded every 11 min, we linearly interpolated between two recorded values to acquire temperature values for each minute. Unfortunately, the temperature logger inside the flank tissue failed in three out of the four birds that participated in respirometry trials. Hence, we were only able to investigate this relationship in one bird. \dot{V}_{O_2} values are presented mass specifically as $s \cdot \dot{V}_{\text{O}_2}$ ($\text{ml min}^{-1} \text{kg}^{-1}$).

All statistical analyses were conducted in JMP[®] (Version Pro 11.2.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All investigations concerning: (1) M_b changes; (2) the effects of various parameters on tissue temperatures; (3) the effect of fasting time in water/total fasting duration on \dot{V}_{O_2} ; and (4) the relationship between flank temperature and \dot{V}_{O_2} were conducted using linear mixed models (LMMs). Where appropriate, interaction terms were first included in the respective model and removed if not significant. If interactions were significant, we conducted Tukey's HSD test for *post hoc* analysis.

In our investigation of M_b changes, we included year and stage (capture, after stage 2, after stage 4) and the interaction year \times stage as fixed effects, while bird ID was included as a random effect. To test for the effects of various parameters on the temperatures of tissues throughout fasting periods in water, we ran separate LMMs

for each tissue, including experimental day (I–IV) as a non-linear factor, year, period (day/night), M_b loss and T_w as fixed effects, while bird ID was included as a random effect. Tukey's HSD test was used for *post hoc* analysis. To distinguish between the effects of total fasting duration (in air and water) and fasting duration in water only (experimental day) on tissue temperatures, we ran separate LMMs for each tissue, testing their effects on tissue temperatures during experimental days III–IV. Similarly, LMM analysis was used to test for the effect of fasting time in water/total fasting duration (fixed effect) on bird oxygen consumption and for the relationship between flank temperature and oxygen consumption (fixed effect). Significance for all statistical tests was accepted at $P < 0.05$. All mean values are presented with standard error (s.e.m.).

RESULTS

M_b of king penguins at first capture was higher during the first year (13.8 ± 0.3 kg), when compared with the second year (12.4 ± 0.3 kg, $P < 0.0001$). However, M_b development throughout experimentation did not differ between years ($P = 0.9$, *post hoc* Tukey's HSD). M_b declined significantly between first capture (13.1 ± 0.2 kg) and stages 2 (12.1 ± 0.2 kg) and 4 (11.0 ± 0.2 kg) ($P < 0.0001$; $N = 13$ birds, $n = 39$ observations).

Tissue temperature variations

When fasting in cold water, the thermal response was complex. During stage 2 (experimental days I–II), the mean hourly temperatures of all tissues increased (Fig. 2), after the initial decline associated with introduction to the water tank (Fig. 2A). During the second period inside the water tank (stage 4; experimental days III–IV), temperatures of all tissues declined again upon introduction to the water tank but to a lesser extent than during stage 2 (Fig. 2). Hereafter, tissue temperatures recovered quickly and generally stabilized at an elevated level, while frequent temperature oscillations continued to occur, especially in the brood patch and the flank tissue (Fig. 2). This general pattern of temperature development becomes even clearer when looking at the mean temperature values computed by LMM analysis for each experimental day (Fig. 3, data from both years merged). This shows that temperatures for all tissues except the back tissue increased significantly throughout stage 2, while during stage 4 they were maintained at an elevated level ($P < 0.0001$ for the flank and brood patch, $P = 0.02$ for abdominal cavity; Table 1). In the back tissue, temperature was elevated throughout experimental days I–III and declined marginally but significantly during experimental day IV (Fig. 3B; $P = 0.003$; Table 1). Our LMM analysis further showed that experimental day (i.e. fasting duration in water) had the strongest effect on tissue temperatures, while other factors considered were less consistent (year, period, M_b loss, T_w ; Table 1). A further LMM analysis showed that tissue temperatures during stage 4 (experimental days III–IV) were not affected by total fasting duration and did not differ between birds that had fasted for 11 or 14 days ($P = 0.39$ for the flank, $P = 0.28$ for the brood patch, $P = 0.11$ for abdominal cavity and $P = 0.08$ for the back). Of all the tissues investigated, the back tissue clearly contrasted with the rest, as its temperature remained fairly stable throughout fasting in water, with slightly lower mean temperatures during stage 4 (when compared with stage 2; Fig. 3B) and during the night, when compared with the day ($37.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ versus $37.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$). Plotting the maximum and minimum mean hourly temperatures observed across tissues against total fasting duration, when birds fasted in water (stages 2 and 4), shows that the maximum temperatures declined slightly with fasting

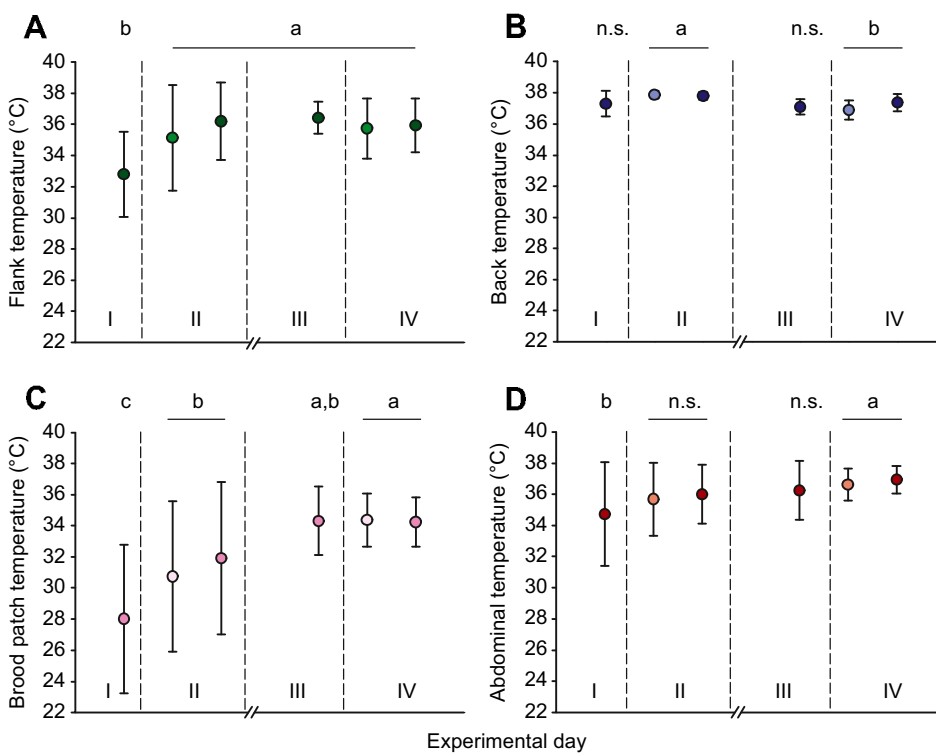


Fig. 3. Marginal means (\pm s.e.m.) of temperatures for four tissues in 13 king penguins while fasting in water. Values for the flank (A), the back (B), the brood patch (C) and the abdominal cavity (D) are shown, which were computed from separate LMMs for day-time (light colour) and night-time periods (dark colour; Table 1, see text). Values that do not share the same letter are significantly different from each other (post hoc Tukey's HSD test; $P < 0.05$). n.s., not significant.

duration ($P < 0.0001$ for year 2), while at the same time, the minimum temperatures increased ($P < 0.0001$ for both years; Fig. 4A). In the latter case, temperature increased on average by 0.56°C per day fasting (total fasting duration).

In the flank tissue, the number of normothermic events (periods with temperatures $\geq 36^{\circ}\text{C}$) increased with the number of fasting days spent in water (experimental days I–IV; Table 2). This is true for day and night periods, while, in general, a greater number of events was observed during the day, when compared with the night. The relative time spent at normothermia during the day and night also increased during stage 2 (experimental days I–II), while it levelled off or even decreased slightly during stage 4 (experimental days III–IV; Table 2). In some individuals, flank temperature was at normothermia for entire day and/or night periods. Mean maximum temperature during these normothermic events was similar throughout all fasting days in water, ranging between 37.6°C and 38.0°C (Table 2).

By contrast, when fasting in air (stage 3), temperatures of all tissues investigated declined over time (Fig. 2). Plotting the highest mean hourly temperatures observed across tissues against total

fasting duration shows that these temperatures declined significantly over time during both years (stage 3, fasting in air; Fig. 4A; $P < 0.0001$ for both years). The average temperature decline was -0.19°C per day fasting (total fasting duration).

Metabolism

We found a strong positive relationship between the \dot{V}_{O_2} of birds when floating in the tank and both total fasting duration (in air and water; $P = 0.0012$) and their fasting time in water only ($P = 0.0008$; Fig. 5A). During experimental day I, \dot{V}_{O_2} averaged $20.1 \pm 7.2 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, while during experimental day IV it averaged $45.4 \pm 0.3 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. We also observed a significant positive relationship between \dot{V}_{O_2} and flank temperature, when birds fasted inside the water tank, so that \dot{V}_{O_2} was higher when flank temperature was higher ($N = 1$ bird, $P = 0.01$; Fig. 5B). Lastly, flank temperature during these selected periods increased with fasting duration in water ($N = 1$ bird, $P < 0.0001$).

Fasting versus feeding

Comparing the tissue temperature development of birds during stages 2 and 4 (in water) when fasting (current study) and when feeding (Lewden et al., 2017) shows that temperatures of all tissues were higher in the fasting condition, when compared with the fed condition (Fig. 6). When maintained in air (stage 3), the temperature of all tissues declined slowly over time (Fig. 6). During this latter stage, birds were fasted in both investigations and, hence, no comparison with a fed condition is possible.

DISCUSSION

Our study found that deep and peripheral tissue temperatures of king penguins increased during the initial 2 day fasting period in water, and were maintained at a near-normothermic level during the second, later fasting period in water (Figs 2 and 3). Similarly, when fasting in water, minimum tissue temperature across all tissues

Table 1. Effects of various parameters on tissue temperature variations in king penguins fasting in water (LMM analysis)

	Flank $R^2 = 0.52$	Back $R^2 = 0.54$	Brood patch $R^2 = 0.70$	Abdominal cavity $R^2 = 0.59$
Experimental day	<0.0001***	0.0029**	<0.0001***	0.0235**
Year	n.s.	n.s.	n.s.	0.0139*
Period (day versus night)	n.s.	0.0230**	n.s.	n.s.
M_b loss	n.s.	n.s.	0.0125	n.s.
T_w	n.s.	0.0433*	n.s.	n.s.

The model was run separately for each tissue with bird ID as a random factor. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$. M_b , body mass; T_w , water temperature; n.s., not significant.

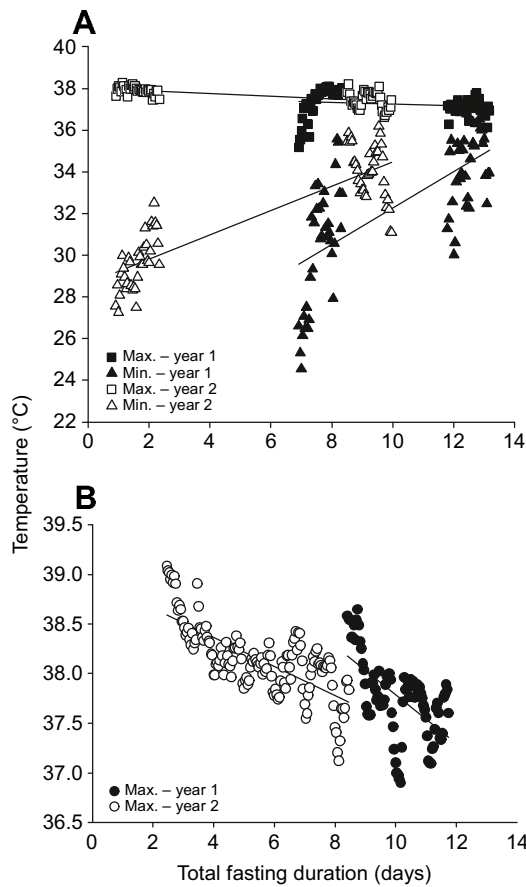


Fig. 4. Maximum and minimum tissue temperatures of king penguins when fasting in water or in air. Values are based on hourly means selected across tissues and are grand means taken from all birds plotted against total fasting duration (in air and water). (A) Temperatures when fasting in water (stages 2 and 4), whereas (B) shows the temperatures when fasting in air (stage 3). Values are shown separately for year 1 ($N=6$ birds, closed symbols) and year 2 ($N=7$ birds, open symbols). The solid lines indicate the relationships established from LMM analysis.

increased significantly throughout total fasting duration, while maximum tissue temperature declined slightly (Fig. 4A). This indicates that, contrary to our prediction, birds maintained perfusion to peripheral tissues not only during the ‘short’ fasting period (stage 2) but also during the ‘long’ fasting period in water (stage 4). Our respirometry results showed that the $s\dot{V}O_2$ increased with both total fasting duration (in air and water) and fasting duration in water only (Fig. 5A). Similarly, a higher flank tissue temperature (indicating greater perfusion) was accompanied by a greater $s\dot{V}O_2$ (Fig. 5B). Hence, fasting king penguins maintained peripheral perfusion when resting in water, despite the associated greater heat loss and, therefore, thermoregulatory costs. This is most likely explained by their need to access subcutaneous fat stores to fuel metabolism. By contrast, when fasting in air (stage 3), temperatures in all tissues slowly declined with total fasting duration, albeit from an elevated level, and overall temperature decline was small (Figs 2 and 4B).

Tissue temperature variations

When king penguins were introduced to the water tank during the day, the temperatures of all tissues monitored declined initially (experimental days I and III in Fig. 2A and experimental day III in Fig. 2B; during experimental day I in the latter figure, birds had

Table 2. Normothermic events recorded in the flank tissue of king penguins fasting in water during stages 2 and 4

Experimental Day/Night	Number of events $\geq 36^\circ\text{C}$												Mean maximum temperature during events $\geq 36^\circ\text{C}$												Relative duration (%) of events $\geq 36^\circ\text{C}$																			
	1			2			3			4			1			2			3			4			1			2			3			4										
	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N	D	D	N												
Individual ID																																												
1	2	2	2	3	1	1	37.3	38.0	37.9	37.5	38.5	38.4	22	56	41	59	97	100																										
2	3	1	1	2	2	4	37.2	37.9	38.3	37.5	38.5	37.7	36	95	100	99	84	81																										
3	1	3	2	2	2	1	37.3	37.6	38.0	37.7	37.8	37.5	21	80	96	97	44	73																										
4	0	5	3	4	3	2	37.8	37.8	38.0	37.3	37.5	36.9	0	79	88	65	28	36																										
5	2	5	1	1	4	1	37.0	37.5	37.9	38.0	38.1	38.1	46	70	90	100	86	100																										
6	1	5	1	4	6	6	37.5	37.6	37.9	37.0	37.5	36.8	17	71	100	95	65	70																										
7	1	1	2	1	1	2	38.1	38.0	37.8	38.1	38.4	37.8	69	100	89	100	100	92																										
8	3	3	2	2	3	2	37.6	37.8	38.7	38.7	38.3	38.4	28	19	24	41	20	22																										
9	2	1	1	1	6	3	38.4	38.8	38.7	38.6	37.7	38.1	84	100	100	100	79	96																										
10	1	3	2	1	3	1	37.2	37.6	37.7	37.4	37.1	37.5	13	94	76	70	70	64																										
11	1	1	1	2	2	1	38.2	38.0	38.2	37.4	37.3	37.6	100	100	100	25	22	19																										
12	0	1	2	2	4	3	37.3	37.3	38.0	37.2	36.5	36.5	0	8	91	99	86	59																										
13	2	2	3	1	5	2	38.0	38.0	38.1	38.1	37.0	37.1	26	18	64	97	83	57																										
Total	19	33	23	26	44	27	37.6±0.4	37.8±0.3	38.0±0.2	37.7±0.4	37.7±0.4	37.6±0.5	Mean	36	68	81	66	67																										

Indicated are the number of events per day/night period, the mean maximum temperature during these events and the relative time per day/night period spent in normothermia (%). Note that the initial day periods during experimental days I and III were excluded to avoid bias due to the disturbance associated with introduction to the pool.

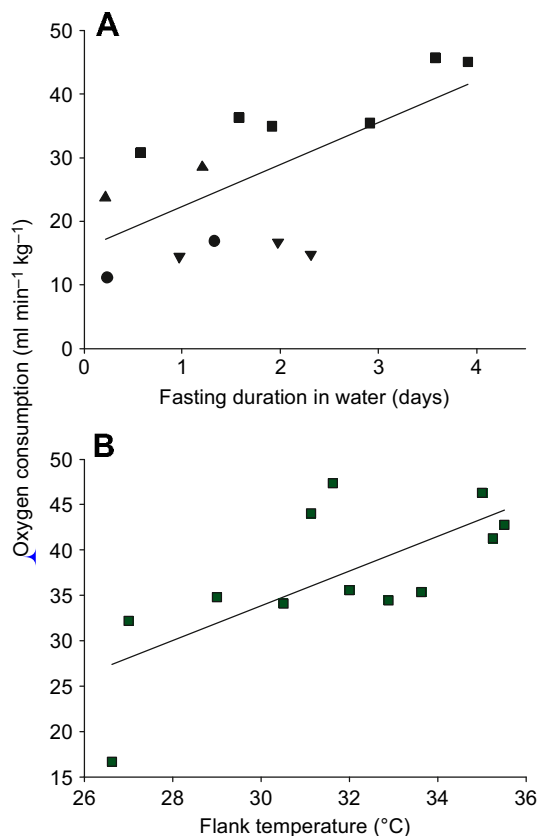


Fig. 5. Mass-specific oxygen consumption rate ($s\dot{V}_{O_2}$) of king penguins when floating inside the water tank. (A) $s\dot{V}_{O_2}$ (ml min⁻¹ kg⁻¹) versus fasting time in water (experimental days I–IV; $N=4$ birds, $n=13$ trials). (B) $s\dot{V}_{O_2}$ during selected 5 min periods, when birds floated calmly inside the water tank, and the corresponding flank temperature during the fasting period in water ($n=12$ observations in six trials, $N=1$ bird). The solid lines indicate the relationships established from LMM analysis.

already been inside the water tank for 2 days and, hence, temperatures did not decline further). However, during the following night, all tissue temperatures recovered and often approached normothermic values during experimental day II (i.e. abdomen, flank and back). During the second 2 day fast in water (stage 4), the initial temperature drop upon introduction to the water tank was smaller, and temperatures recovered quickly and were maintained at near-normothermic levels (experimental days III–IV; Figs 2 and 3). The temperature development of the back tissue during fasting in water differed from all other tissues. The temperature of the back, in general, changed little and was maintained at a high level throughout fasting in water, although it declined slightly during stage 4 (Figs 2 and 3). This is most likely explained by the observation that the back tissue was above water almost the entire period the birds spent in water, while all other tissues, in which temperature was monitored, were permanently submerged (see fig. 1 in Lewden et al., 2017). Accordingly, the heat conservation scenario must have differed substantially between the back and all other tissues. It is, therefore, not surprising that temperatures of the back tissue, when birds were inside the water tank, followed a trajectory similar to that of all other tissues during fasting in air (Fig. 2). This illustrates the different responses of birds to fasting, depending on context (air versus water) and underlines the great importance of regional heterothermia to lower energetic costs (Handrich et al., 1997; Eichhorn et al., 2011).

While temperatures in the flank, abdomen and brood patch on average increased during stage 2 and were then maintained during stage 4, when penguins fasted in water, such description ignores the frequent temperature oscillations (warming and cooling cycles) we observed in all of these tissues (but not in the back), which were especially pronounced in the flank (Fig. 2B). Such temperature oscillations might reflect complex changes in underlying neurophysiological adjustments (Tattersall et al., 2016). A study investigating the thermoregulatory responses of Muscovy ducklings to cold and fasting found that, in cold-acclimated birds, the frequency of short-term body temperature fluctuations was reduced during fasting (Tattersall et al., 2016). This was interpreted by the authors as a novel energy-saving mechanism: a reduction in short-term body temperature fluctuations was suggested to lead to a profound reduction in the estimated energetic costs of warming, independent of the metabolic savings associated with diurnal body temperature changes. While we did not investigate short-term temperature fluctuations in our penguins, we observed a significant increase in minimum tissue temperature during fasting (when birds were inside the water tank), which was accompanied by a small decrease in maximum tissue temperature (Fig. 4). Such temperature development might indicate a change in the amplitude of temperature fluctuations.

Frequent temperature oscillations, especially in the flank tissue, are also illustrated in Table 2, which indicates the number, relative duration and mean maximum temperature during events, when temperature was equal to or exceeded 36°C in the flank (normothermic events). The number of these events increased in birds throughout the fasting period in water during both day and night periods, while the relative time spent in normothermia also increased up to experimental day III, after which it declined (Table 2). Similar to what has been observed in free-ranging king penguins during their resting periods between foraging bouts at the sea surface, the normothermic periods observed in the flank tissue of our inactive captive birds often lasted for extended periods (i.e. the entire night or day in some individuals; Table 2; Schmidt et al., 2007; Enstipp et al., 2017). The mean maximum flank temperature during normothermic events was similar throughout the fasting period in water (Table 2), indicating that the higher mean hourly tissue temperatures during stage 4 ('long' fast), when compared with stage 2 ('short' fast), are not merely a consequence of differences in body condition and insulation during these two stages (see Enstipp et al., 2017).

A number of studies has investigated the physiological mechanisms underlying the great fasting capacity of penguins in air (Dewasmes et al., 1980; Le Maho et al., 1976; Chérel et al., 1988, 1994; Eichhorn et al., 2011). When fasting in air, the deep temperature of king penguins is typically maintained or decreases only to a small extent (Fahlman et al., 2005; Viblanc et al., 2014; but see Eichhorn et al., 2011 for fasting chicks), while a reduction in metabolism is mostly achieved through a decline in thermal conductance (e.g. regional heterothermia) and a general decline in activity (Eichhorn et al., 2011; Viblanc et al., 2014). In our study, we also observed a small but persistent decline in all tissue temperatures when birds fasted in air (stage 3, Fig. 2), so that the maximum temperature recorded in any of the tissues monitored declined by $\sim 1^\circ\text{C}$ over the course of 12 days (Fig. 4B). By contrast, few studies have investigated the physiological responses of fasting penguins when floating on water (Fahlman et al., 2004, 2005). When king penguins were introduced to a shallow water channel, abdominal and subcutaneous temperatures declined immediately (Fahlman et al., 2005). That temperature decline was more pronounced in fasted than in fed or re-fed birds, and the higher

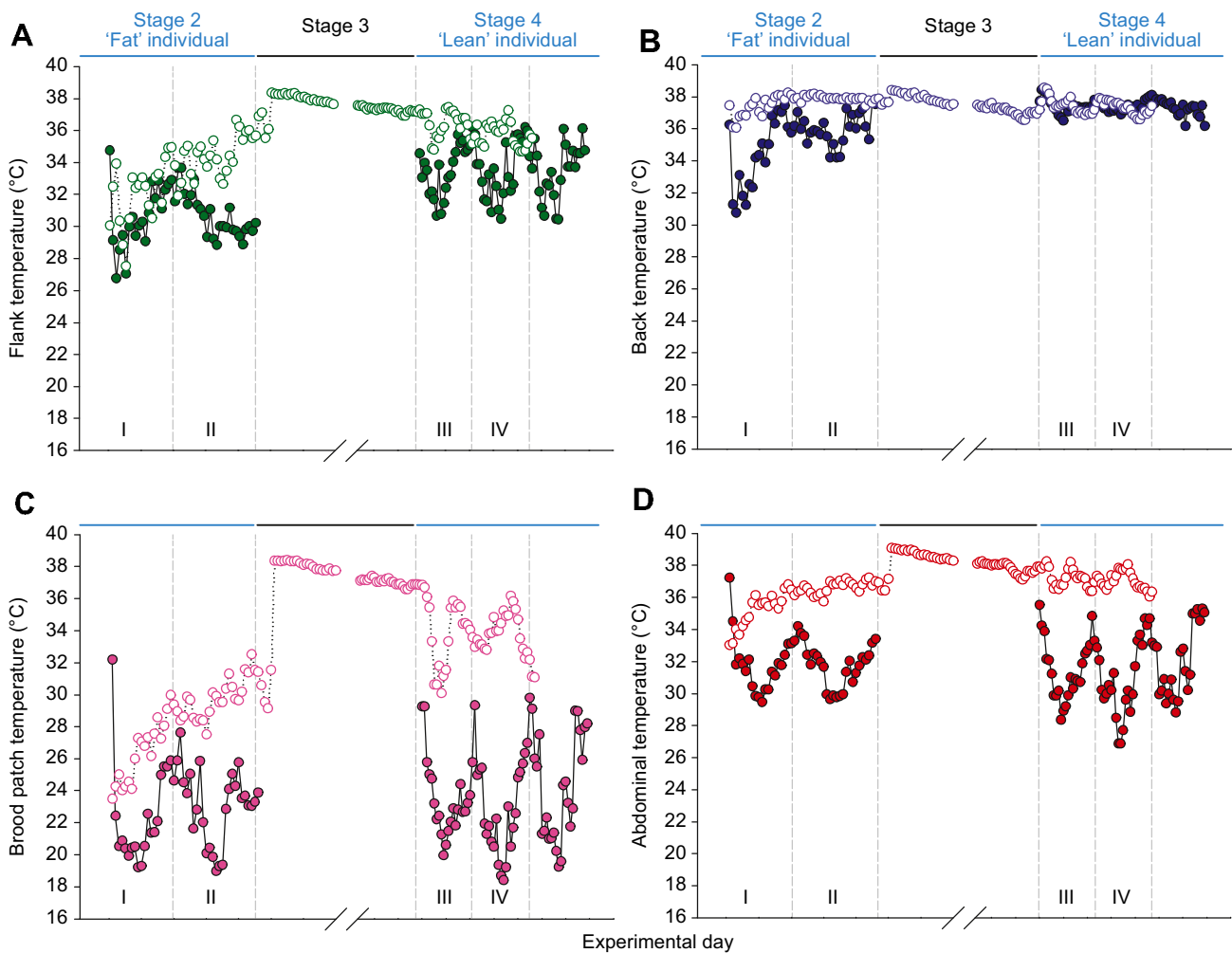


Fig. 6. Tissue temperatures of king penguins during fasting and feeding trials. Values are hourly means and show temperatures from the four tissues when birds either fasted (open symbols; $N=13$ birds) or were being fed (closed symbols; $N=7$ birds). Values for the fed condition are from Lewden et al. (2017). 'Fat' and 'lean' individuals during stages 2 and 4 (in water) refer to birds with a higher and lower body mass, respectively, which corresponds to a short and long fasting duration before treatment (fasting/fed), respectively. Note that during stage 3 (in air) birds were fasted in both investigations and only values for the present investigation are shown.

\dot{V}_{O_2} of fasted birds under these conditions, when compared with the others, were attributed to their lower body condition/body insulation (Fahlman et al., 2005). However, birds were only maintained inside the water channel for ~ 3 h, so that no tissue rewarming could be observed (Fahlman et al., 2005). Furthermore, total fasting duration of penguins (in air) had little effect on their RMR in water (Fahlman et al., 2004). Our results are in general agreement with the findings of these latter two studies. For example, our study also showed that the effect of total fasting duration (in air and water) on penguin temperature development was negligible, when compared with fasting duration in water only. However, because we maintained king penguins inside a water tank for a prolonged period (4 days in total), we were able to investigate the thermal responses of king penguins to fasting in water in greater detail than previous studies.

Our study found a significant increase in deep and peripheral tissue temperatures of king penguins when fasting in water over time, indicating the maintenance of peripheral perfusion. The increase in deep tissue temperature (abdominal cavity) is likely to be a consequence of the increase in metabolic rate with fasting duration and not linked with changes in perfusion. The higher tissue temperatures during experimental days II–IV, when compared with

experimental day I, suggest that birds were in a greater need to access subcutaneous fat stores to fuel metabolism during the later part of their fasting period in water. We predicted that birds will maintain peripheral perfusion during the short fast (first 2 day fasting period in water), while we expected that birds might reduce peripheral perfusion during the long fast (second 2 day fasting period) to reduce heat loss. Hence, our results are in agreement with our first prediction, whereas we did not observe a reduction in peripheral perfusion (as indicated by tissue temperatures) during the later fasting period. The latter might be explained by an overall too short fasting duration in our experiment, so that the body condition/insulation of birds (crucial fat layer thickness; Øritsland et al., 1985) was still sufficient to balance the heat loss associated with peripheral perfusion. This is supported by the M_b of our birds at the end of experimentation (11.0 ± 0.2 kg), which was still above the crucial M_b of ~ 10 kg. At this latter point, birds enter into phase III of fasting, which is associated with a switch from a predominant lipid metabolism to protein catabolism (Cherel et al., 1988). The decline in the relative duration of normothermic events observed in the flank tissue during experimental day IV (on average 67%), when compared with experimental day III (on average 81%), might

indicate the beginning of a switch in thermal strategy (i.e. peripheral vasoconstriction to avoid excessive heat loss).

Metabolism

Our respirometry trials showed two important points: (1) the \dot{V}_{O_2} of birds when floating in the water tank increased with the time they spent fasting in water (Fig. 5A); and (2) when fasting in water, higher flank temperatures of birds were associated with a greater \dot{V}_{O_2} (Fig. 5B). The increase in peripheral temperatures we observed during stage 2 (experimental days I–II) and their maintenance at an elevated level during stage 4 (experimental days III–IV) clearly suggest that birds maintained peripheral perfusion during these periods. Accordingly, heat loss must have been increased during this time, so that thermoregulatory costs must have also been elevated. This is illustrated by the positive relationship between flank temperature and $s\dot{V}_{O_2}$; a higher flank temperature (reflecting a greater perfusion level) was associated with a greater $s\dot{V}_{O_2}$ (Fig. 5B). Hence, the increase in $s\dot{V}_{O_2}$ with fasting duration in water is most likely explained by the increase/maintenance of peripheral perfusion but also by a decline in body condition and, therefore, body insulation, as birds presumably reduced their subcutaneous fat layer to fuel metabolism (Cherel et al., 1994; Fahlman et al., 2005; Enstipp et al., 2017).

\dot{V}_{O_2} of king penguins measured in our study during their first hours of fasting in water ($17.5 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$; mean $T_w \sim 8^\circ\text{C}$) was similar to previously reported measurements under comparable conditions (Culik et al., 1996a; Fahlman et al., 2004, 2005). However, while we observed a significant increase in $s\dot{V}_{O_2}$ throughout the fasting period, when birds floated on water, this was not the case in previous studies. For example, Fahlman et al. (2004) reported an $s\dot{V}_{O_2}$ of $14.0 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ in king penguins floating inside a water channel ($T_w 4^\circ\text{C}$; $M_b 12.1 \text{ kg}$) for $\sim 3 \text{ h}$, after they had fasted for 5–12 days in air. After a total fasting duration of 11–25 days (in air), the M_b of penguins in that study was reduced to 10.4 kg but $s\dot{V}_{O_2}$ was little elevated at $16.9 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ during a further 3 h respirometry trial in the water channel (Fahlman et al., 2004). This difference in response found in our study, when compared with previous studies, might be related to differences in the experimental set-up. While previous studies recorded \dot{V}_{O_2} in trials when birds remained on water for relatively short periods (i.e. a few hours), our birds were maintained in the seawater tank for two consecutive days during each introduction to the tank (stages 2 and 4). For example, the \dot{V}_{O_2} recorded by Fahlman et al. (2005) coincided with a strong temperature decline in abdominal and peripheral tissues of birds, similar to the temperature declines observed upon first introduction to the seawater tank in our study (Fig. 2A, experimental day I). In our study, birds recovered from this initial temperature decline and maintained elevated temperatures in all tissues throughout their fasting periods in water (Figs 2 and 3). However, this was clearly not the case in previous studies and might explain the relatively low $s\dot{V}_{O_2}$ values of birds in water after extensive fasting in air (Fahlman et al., 2004, 2005). A direct comparison between studies is further complicated by the fact that resting measurements within the water channel in Fahlman et al. (2004, 2005) were taken opportunistically, when birds rested at the water surface between dives for periods of at least 20 min. As birds will generate substantial amounts of heat during swimming, some of this heat might have been available even during resting periods, delaying the need for heat production and, therefore, reducing thermoregulatory costs and \dot{V}_{O_2} (Kaselloo and Lovvorn, 2005, 2006; Lovvorn, 2007).

In our study, the $s\dot{V}_{O_2}$ of penguins after fasting for 4 days within the water tank was substantially higher than at the start of their fasting

period in water, reaching values in excess of $40 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ (Fig. 5A). To put this into perspective, Froget et al. (2004) estimated the \dot{V}_{O_2} of king penguins during their foraging trips based on the recording of heart rate. They found that $s\dot{V}_{O_2}$ reached its highest level during the first hour after the end of a foraging bout, when birds floated at the surface, re-perfusing peripheral tissues and digesting food (Handrich et al., 1997; Schmidt et al., 2006). \dot{V}_{O_2} during this period was estimated to average $25.8 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ in birds with a mean M_b of 12.8 kg (Froget et al., 2004). The higher $s\dot{V}_{O_2}$ recorded in our study, after 4 days of fasting, might be accounted for by differences in body insulation (i.e. a M_b of 11.1 kg in our study versus 12.8 kg in Froget et al., 2004), increasing heat loss (Enstipp et al., 2017) and, therefore, thermoregulatory costs in our birds. Furthermore, as the \dot{V}_{O_2} –heart rate relationship used to estimate \dot{V}_{O_2} from the recording of heart rate in free-ranging king penguins (Froget et al., 2004) was derived from treadmill exercise in air (Fahlman et al., 2004), it might also be possible that the \dot{V}_{O_2} estimate for the first hour after foraging is underestimating the true costs. Halsey et al. (2008) determined the costs associated with recovery from hypothermia in king penguins after they had been swimming inside a shallow water channel for 2 h. During these trials in water, the abdominal temperature of fasted birds ($M_b 10.6 \text{ kg}$) declined by $1\text{--}6^\circ\text{C}$ (maximum; depending on thermistor position within the abdomen). When recovering in air, the $s\dot{V}_{O_2}$ of fasted birds reached values $\sim 32 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ (Halsey et al., 2008; their fig. 1A).

Fasting versus feeding

Comparing our investigation into the physiological responses of king penguins to prolonged fasting in water with that of feeding in water, we found that in both cases tissue temperatures increased during their periods in water (Fig. 6). During feeding conditions, temperature increases occurred mostly during the night, when birds were left undisturbed (Lewden et al., 2017), while during fasting temperature increases (or the maintenance at an elevated level) occurred during the day and night. Similarly, normothermic periods in the flank tissue (temperatures $\geq 36^\circ\text{C}$) occurred predominately during the night in the fed condition, while they extended throughout 24 h periods in the fasted condition (Table 2). These periods also occurred much more frequently during fasting and their duration was considerably longer than during feeding. For example, in fed birds ('lean' condition), the flank temperature was $\geq 36^\circ\text{C}$ for 52% of the night period, while in fasted birds this was the case for 81% and 67% during the last two nights in the water tank (Lewden et al., 2017; Table 2). In general, when in water, tissue temperatures, reflecting perfusion, were considerably higher during the fasting condition, when compared with the fed condition (Fig. 6). The higher tissue temperatures of king penguins observed in the fasting condition in water (reflecting perfusion level) when compared with the feeding condition, might be explained by a greater need to access subcutaneous fat stores during the former to fuel metabolism. When fed inside the water tank, following digestion, birds will need to deposit any surplus free fatty acids (FFAs) in the abdomen and/or subcutaneous tissue, requiring perfusion of these tissues. However, the required extent of tissue perfusion will depend on the surplus of FFAs. It might be possible that the amount of fish fed to penguins in our feeding investigation (Lewden et al., 2017) did not require a tissue perfusion comparable to that of the current study, when birds were fasting.

In the wild, the temperature of deep and peripheral tissues declines during foraging bouts of king penguins, following a reduction in tissue perfusion (vasoconstriction; Culik et al., 1996b; Handrich et al., 1997; Schmidt et al., 2006; Enstipp et al., 2017).

Upon completion of their daily foraging activity, when birds typically rest at the surface, the temperature of deep and peripheral tissues increases to normothermic values. This enlarges the **body volume** of penguins, which is maintained at a normothermic level and increases the temperature gradient between the penguin body and the surrounding cold water, elevating heat loss. While such a response might seem paradoxical at first, it might be required for a number of reasons. Firstly, peripheral tissue perfusion might be required for the supply of oxygen and nutrients to these tissues, while it will also allow the removal of metabolic by-products (Kooyman, 1989). Importantly though, peripheral perfusion will also be required to allow deposition of FFAs in subcutaneous tissues after profitable foraging (Lewden et al., 2017), while after less profitable foraging, when foraging success is insufficient to cover energy expenditure, this will allow **fat stores to be accessed** to fuel metabolism, as suggested by Fahlman et al. (2005). The findings of the current study lend support to such a scenario. The strategy chosen by king penguins to manage the apparent conflict between nutritional requirements and thermoregulatory demands might seem non adaptive at first. However, delaying metabolic processes that require peripheral tissue perfusion until after the end of a foraging bout has two major advantages: (1) it keeps the metabolic rate during diving low, increasing apnea duration; and (2) it keeps heat loss at bay, which is considerably smaller at the surface than at depth.

Acknowledgements

We thank Thibaut Hestin and Tessa van Walsum for their valuable help in the field and Mathieu Brucker for his technical expertise and support with the construction of the seawater tank. Baptiste Picard is thanked for his help with preliminary data analysis and we also thank Ronan Rousseau for copy-editing the figures.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: A.L., Y.H.; Methodology: A.L., Y.H.; Formal analysis: A.L., M.R.E.; Investigation: A.L., B.B., C.B., Y.H.; Resources: J.-Y.G.; Writing - original draft: A.L., M.R.E.; Writing - review & editing: A.L., M.R.E., Y.H.; Supervision: M.R.E., Y.H.

Funding

Research project No. 394 was supported by the Institut Polaire Français Paul Emile Victor and by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-INEE). Logistic support in the field was provided by the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF). A.L. was the recipient of a scholarship from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de la recherche et de la technologie.

References

- Bost, C.-A., Zorn, T., Le Maho, Y. and Duhamel, G. (2002). Feeding of diving predators and diel vertical migration of prey: king penguins' diet versus trawl sampling at Kerguelen Islands. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **227**, 51-61.
- Bost, C. A., Cotté, C., Terray, P., Barbraud, C., Bon, C., Delord, K., Gimenez, O., Hanrich, Y., Naito, Y., Guinet, C. et al. (2015). Large-scale climatic anomalies affect marine predator foraging behaviour and demography. *Nat. Commun.* **6**, 8220.
- Butler, P. J., Woakes, A. J. (2001). Seasonal hypothermia in a large migrating bird: saving energy for fat deposition? *J. Exp. Biol.* **204**, 1361-1367.
- Charrassin, J.-B. and Bost, C.-A. (2001). Utilization of the oceanic habitat by king penguins over the annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **221**, 285-297.
- Charrassin, J.-B., Le Maho, Y. and Bost, C.-A. (2002). Seasonal changes in the diving parameters of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Mar. Biol.* **141**, 581-589.
- Cherel, Y. and Ridoux, V. (1992). Prey species and nutritive value of food fed during summer to king penguin *Aptenodytes patagonica* chicks at Possession Island, Crozet Archipelago. *Ibis* **134**, 118-127.
- Cherel, Y., Robin, J.-P. and Le Maho, Y. (1988). Physiology and biochemistry of long-term fasting in birds. *Can. J. Zool.* **66**, 159-166.
- Cherel, Y., Gilles, J., Handrich, Y. and Le Maho, Y. (1994). Nutrient reserve dynamics and energetics during long-term fasting in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Zool. Lond.* **234**, 1-12.
- Chossat, C. (1843). *Recherches Expérimentales Sur l'inanition*. Paris, France: Imprimerie Royale.
- Culik, B. M., Pütz, K., Wilson, R. P., Allers, D., Lage, J., Bost, C.-A. and Le Maho, Y. (1996a). Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **199**, 973-983.
- Culik, B. M., Pütz, K., Wilson, R. P., Bost, C.-A., Le Maho, Y. and Verselin, J.-L. (1996b). Core temperature variability in diving king penguins (*Aptenodytes patagonicus*): a preliminary analysis. *Polar Biol.* **16**, 371-378.
- Dejours, P. (1987). Water and air physical characteristics and their physiological consequences. In *Comparative Physiology: Life in Water and on Land* (ed. P. Dejours, L. Bolis, C. R. Taylor and E. R. Weibel), pp. 3-11. Berlin: Springer Verlag.
- Delord, K., Barbraud, C. and Weimerskirch, H. (2004). Long-term trends in the population size of king penguins at Crozet archipelago: environmental variability and density dependence? *Polar Biol.* **27**, 793-800.
- Dewasmes, G., Le Maho, Y., Cornet, A. and Groscolas, R. (1980). Resting metabolic rate and cost of locomotion in long-term fasting emperor penguins. *J. Appl. Physiol.* **49**, 888-896.
- Drent, R. H. and Daan, S. (1980). The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. *Ardea* **68**, 225-252.
- Eichhorn, G., Groscolas, R., Le Glaunec, G., Parisel, C., Arnold, L., Medina, P. and Handrich, Y. (2011). Heterothermy in growing king penguins. *Nat. Commun.* **2**, 435.
- Enstipp, M. R., Bost, C.-A., Le Bohec, C., Bost, C., Le Maho, Y., Weimerskirch, H. and Handrich, Y. (2017). Apparent changes in body insulation of juvenile king penguins suggest an energetic challenge during their early life at sea. *J. Exp. Biol.* **220**, 2666-2678.
- Fahlman, A., Handrich, Y., Woakes, A. J., Bost, C.-A., Holder, R., Duchamp, C. and Butler, P. J. (2004). Effect of fasting on the VO₂-fh relationship in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, 870-877.
- Fahlman, A., Schmidt, A., Handrich, Y., Woakes, A. J. and Butler, P. J. (2005). Metabolism and thermoregulation during fasting in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*, in air and water. *Am. J. Physiol.* **289**, R670-R679.
- Froget, G., Butler, P. J., Woakes, A. J., Fahlman, A., Kuntz, G., Le Maho, Y. and Handrich, Y. (2004). Heart rate and energetics of free-ranging king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **207**, 3917-3926.
- Gilbert, C., Blanc, S., Le Maho, Y. and Ancel, A. (2008). Energy saving processes in huddling emperor penguins: from experiments to theory. *J. Exp. Biol.* **211**, 1-8.
- Groscolas, R. (1986). Changes in body mass, body temperature and plasma fuel levels during the natural breeding fast in male and female emperor penguins *Aptenodytes forsteri*. *J. Comp. Physiol. B* **156**, 521-527.
- Halsey, L. G., Handrich, Y., Rey, B., Fahlman, A., Woakes, A. J. and Butler, P. J. (2008). Recovery from swimming-induced hypothermia in king penguins: effects of nutritional condition. *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 434-441.
- Handrich, Y., Bevan, R. M., Charrassin, J.-B., Butler, P. J., Putz, K., Woakes, A. J., Lage, J. and Le Maho, Y. (1997). Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* **388**, 64-67.
- Hohtola, E. (2012). Thermoregulatory adaptations to starvation in birds. In *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation* (ed. M. D. McCue), pp. 155-170. Berlin, Germany: Springer Verlag.
- Jouventin, P. (1982). *Visual and Vocal Signals in Penguins, their Evolution and Adaptive Characters*. Berlin: Verlag Paul Parey.
- Kaseloo, P. A. and Lovvorn, J. R. (2005). Effects of surface activity patterns and dive depth on thermal substitution in fasted and fed lesser scaup (*Aythya affinis*) ducks. *Can. J. Zool.* **83**, 301-311.
- Kaseloo, P. A. and Lovvorn, J. R. (2006). Substitution of heat from exercise and digestion by ducks diving for mussels at varying depths and temperatures. *J. Comp. Physiol. B* **176**, 265-275.
- Kooyman, G. L. (1989). *Diverse Divers*. Berlin: Springer Verlag.
- Kooyman, G. L., Gentry, R. L., Bergman, W. P. and Hammel, H. T. (1976). Heat loss in penguins during immersion and compression. *Comp. Biochem. Physiol.* **54A**, 75-80.
- Kozlov, A. N., Shust, K. V. and Zemsky, A. V. (1991). Seasonal and interannual variability in the distribution of *Electrona carlsbergi* in the southern polar front area. Selected Scientific Papers, Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources (CCAMLR); SC-CAMLR-SSP/7, pp. 337-367.
- Le Maho, Y., Delclitte, P. and Chatonnet, J. (1976). Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *Am. J. Physiol.* **231**, 913-922.
- Le Maho, Y., Vu Van Kha, H., Koubi, H., Dewasmes, G., Girard, J., Ferre, P. and Cagnard, M. (1981). Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am. J. Physiol.* **241**, E342-E354.
- Lewden, A., Enstipp, M. R., Picard, B., van Walsum, T. and Handrich, Y. (2017). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea: thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Biol.* **220**, 3084-3094 (in press).
- Lighton, J. R. B. (2008). *Measuring Metabolic Rates—a Manual for Scientists*. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Lovvorn, J. R. (2007). Thermal substitution and aerobic efficiency: measuring and predicting effects of heat balance on endotherm diving energetics. *Phil. Trans. R. Soc. B* **362**, 2079-2093.

- McCue, M. D.** (2010). Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp. Biochem. Physiol. -A Mol. Integr. Physiol.* **156**, 1-18.
- McKechnie, A. E. and Lovegrove, B. G.** (2002). Avian facultative hypothermic responses: a review. *Condor* **104**, 705-724.
- Orgeret, F., Weimerskirch, H. and Bost, C.-A.** (2016). Early diving behaviour in juvenile penguins: improvement or selection process. *Biol. Lett.* **12**, 20160490.
- Øritsland, N. A., Päsche, A. J., Markussen, N. H. and Ronald, K.** (1985). Weight loss and catabolic adaptations to starvation in grey seal pups. *Comp. Biochem. Physiol. A* **82**, 931-933.
- Raclot, T., Groscolas, R. and Cherel, Y.** (1998). Fatty acid evidence for the importance of myctophid fishes in the diet of king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Mar. Biol.* **132**, 523-533.
- Schmidt, A., Alard, F. and Handrich, Y.** (2006). Changes in body temperature in king penguins at sea: the result of fine adjustments in peripheral heat loss? *Am. J. Physiol.* **291**, R608-R618.
- Stonehouse, B.** (1953). *The Emperor Penguin. I. Breeding behaviour and development. Falkland Islands Dependencies Survey Scientific Reports* **6**, 1. London: HMSO.
- Tattersall, G. J., Roussel, D., Voituron, Y. and Teulier, L.** (2016). Novel energy-saving strategies to multiple stressors in birds: the ultradian regulation of body temperature. *Proc. R. Soc. B* **283**, 20161551.
- Viblanc, V. A., Saraux, C., Malosse, N. and Groscolas, R.** (2014). Energetic adjustments in freely breeding-fasting king penguins: does colony density matter? *Funct. Ecol.* **28**, 621-631.

Summary: Maintenance of near-normothermic temperatures in peripheral tissues of king penguins when fasting in cold water suggests maintained perfusion, presumably to mobilize **free fatty acids** from subcutaneous adipose tissue.

Funding details

S.No.	Funder name	Funder ID	Grant ID
1	Institut Polaire Français Paul Emile Victor	http://dx.doi.org/10.13039/501100004796	
2	Centre National de la Recherche Scientifique	http://dx.doi.org/10.13039/501100004794	
3	Terres Australes et Antarctiques Françaises		
4	Ministere de l'Education National, de la recherche et de la technologie		

V

Etude complémentaire



Impact des conditions expérimentales sur les individus de manchots royaux maintenus en piscine

Contexte de l'étude

Le maintien de manchots royaux en captivité a permis d'étudier la thermorégulation chez des individus équipés d'enregistreurs de températures. Ces individus étaient maintenus dans une piscine d'eau de mer à deux états nutritionnels : 'nourris' (**Chapitre 1** ; Lewden et al. 2017b) et 'à jeun' (**Chapitre 2** ; Lewden et al. *soumis*). Ces études avaient pour but de recréer artificiellement les conditions naturelles nocturnes (i.e. individus à la surface de l'eau) rencontrées après une journée de plongées lors d'un voyage alimentaire (Handrich et al. 1997; Fahlman et al. 2004). Cependant, afin de mener à bien les protocoles, nous avons dû manipuler les individus, notamment lors des phases d'alimentation et de pesée de ces derniers. Or, plusieurs études ont montré un impact du stress induit par la manipulation humaine sur l'organisme des espèces animales (e.g. Cockrem 2007; Herborn 2015). Ainsi, cette réponse émotionnelle a été décrite pour la première fois par Cannon 1927, traduite par des modifications physiologiques (notamment endocrines) et comportementales des individus.

Ainsi, en réponse au stress, la concentration plasmatique de **corticostérone** augmente chez les oiseaux (Day et al. 1999; Cockrem 2007). La variation des niveaux plasmatiques de cette hormone reflète alors le degré de réponse au stress des individus dans différentes situations (Romero 2002 ; Cockrem et al. 2004). Cette réponse au stress a, par ailleurs, été décrite chez plusieurs espèces de manchots, telles que le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) (Holberton et al. 1996), Papou (*Pygoscelis papua*) (Holberton et al. 1996), Adélie (*Pygoscelis adeliae*) (Cockrem et al. 2006) et de Magellan (*Spheniscus magellanicus*) (Hood et al. 1998; Walker et al. 2004; Walker et al. 2006).

Le comportement de 'fight-or-flight' a été également décrit comme un comportement d'évitement au stress produit à la suite d'un événement stressant (Jansen et al. 1995). En effet, sous l'influence de signaux nerveux induits par le système sympathique, le corps se prépare à l'évitement et/ou la fuite au travers de différents processus physiologiques. Ainsi, l'augmentation de la **fréquence cardiaque**, ou tachycardie, et l'augmentation de la ventilation ont été mises en évidence chez plusieurs espèces d'oiseaux (Cabanac et Guillemette 2001; Cabanac et Aizawa 2000; Carere et Van Oers 2004; Van Oers et Carere 2007). Cet effet a notamment été décrit lors de la présence et/ou de la manipulation humaine chez le manchot royal (Viblanç et al. 2012), mais également chez d'autres espèces de manchots (Giese 1998; Holmes et al. 2005; Ellenberg et al. 2006, 2013). De plus, une redistribution de la circulation sanguine périphérique dans le cas d'un comportement de 'fight or flight' a été suggérée au profit de l'oxygénation des organes de réponses (e.g. muscle et cerveaux) (Siegel 1980; Koolhaas et al. 1999; Busnardo et al. 2010). En outre, un phénomène d'hyperthermie a également été décrit chez plusieurs espèces d'oiseaux en réponse au stress. Il se traduit par une augmentation de la température corporelle

interne (Groenink et al. 1994; Veening et al. 2004) face à la diminution simultanée de la température périphérique sous l'effet de la vasoconstriction (Cabanac et Aizawa 2000; Edgar et al. 2011, 2013; Herborn et al. 2015; Jerem et al. 2015 mais voir Ikkatai et Watanabe 2015; Lewden et al. 2017a).

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'effet du stress induit par la présence/manipulation humaine à différents niveaux, *i.e.* physiologique et comportemental, chez des manchots royaux maintenus en piscine. Bien que les hormones de stress n'aient pas été mesurées au cours de l'expérimentation, le budget temps a été évalué chez les individus 'à jeun' et 'nourris'. Ainsi, l'agitation globale de ces derniers nous a permis d'estimer la proportion de comportement "*fight and flight*" observée en piscine. Puis, l'effet du stress sur la fréquence cardiaque des oiseaux a également été mesuré en fonction de trois types de stress: le bruit, la présence humaine et l'évènement de capture. Enfin, les variations de températures ont été analysées pour comparaison sur deux groupes d'individus : des individus manipulés et des individus non manipulés durant leur séjour en piscine.

Matériel & Méthodes

L'étude du comportement des manchots royaux a été réalisée en condition expérimentale sur l'île de la possession, au sein de l'archipel de Crozet (46°25' S, 51°45' E). Les données collectées correspondent à deux années d'expérimentation, la première entre Novembre 2013 et Février 2014 et la deuxième entre Novembre 2014 et Février 2015. Le jour de leur capture sur la colonie, les individus mâles (sélectionnés par le chant (Jouventin 1982)) ont été équipés de 4 enregistreurs de températures : 3 ont été placés en périphérie (flanc, dos et plaque incubatrice) et le dernier dans la cavité abdominale. L'équipement des individus s'est déroulé sous anesthésie générale selon la procédure décrite dans Lewden et al. 2017b. Après une période de récupération de la chirurgie, durant laquelle les individus sont restés à terre sans dérangement, ces derniers ont été placés dans une piscine d'eau de mer (à renouvellement d'eau constant, et ce afin de maintenir la qualité et la température de celle-ci constantes). Les individus ont été maintenus en piscine seuls, ou en binôme, durant toute la durée de l'expérimentation (Table 1).

Table 1 : Résumé des conditions expérimentales appliquées en piscine pour l'étude du comportement, de la fréquence cardiaque et des températures au cours de la première et la deuxième année de terrain

		Année	Seul / En binôme	Etat nutritionnel	Stressor	N
Variables Mesurées	Comportement	1	Seul	A jeun et nourris	Non	12
	Fréquence cardiaque	2	Binôme	A jeun et nourris	Capture - Présence Son	8
	Températures	1	Seul	A jeun	Non	2
	2	Binôme	Capture		2	

Analyse de l'agitation/comportement












Les individus ont été filmés 24h/24 durant toute la durée de l'expérimentation en piscine. L'analyse de l'agitation/comportement sans dérangement humain concerne 12 individus maintenus individuellement en piscine pour une durée moyenne de 43:11 heures (de 41:55 heures à 45:38 heures). La moitié de ces

individus (N=6) a été maintenue en piscine à jeun, tandis que l'autre moitié des individus (N=6) a été nourrie d'un repas de poisson (masse moyenne = 601 ± 76 g), et ce, une seule fois avant la mise en piscine. Les individus ont été filmés à l'aide d'une caméra extérieure (Reconyx HC600 HyperFire models) permettant de visualiser l'intégralité de la surface de la piscine par tous les temps. Un premier visionnage de plusieurs vidéos sélectionnées aléatoirement a été effectué par le même observateur afin de se familiariser avec le comportement des individus. Puis, suite à ce visionnage, un total de 6 comportements a été défini allant du plus calme au plus agité : 'Immobile', 'en sommeil' (Matériel supplémentaire 1), 'calme', comportement de 'confort', d'exploration' et de 'fuite' (Table 2).

Le comportement spécifique de 'sommeil' a été étudié chez les 12 individus tandis que les autres comportements ont été étudiés uniquement sur 8 individus (6 'à jeun' et 2 'nourris'). Cependant, bien que de nombreux éléments convergent vers l'identification d'un comportement de 'sommeil' en piscine (matériel supplémentaire 1), ce dernier ne peut pas être identifié comme tel de façon catégorique en l'absence d'un électroencéphalogramme. De plus, la qualité des vidéos ne permet pas de statuer sur l'ouverture ou non de l'œil, un élément supplémentaire permettant de confirmer un réel comportement de sommeil (Rattenborg et al. 2000).

Le comportement dominant a été déterminé par séquence de 10 minutes sur toute la durée du jour, soit plus de 14h par journée. En effet, les films nocturnes n'étaient pas d'assez bonne qualité pour déterminer le comportement des individus avec des confusions possibles, par exemple, entre le comportement 'calme' et en 'sommeil'. Cependant, les vidéos nocturnes ont néanmoins été visionnées afin vérifier qu'il n'y avait pas de différence majeure dans l'agitation des individus entre le jour et la nuit.

Table 2 : Descriptif des six comportements identifiables en piscine à partir des enregistrements vidéo organisé en fonction du degré d'agitation

Degré d'agitation	Liste des comportements	Description	Exemple Seul	Exemple en binôme	Autres exemples
0	Immobile	Aucun mouvement détectable de l'individu			
1	En sommeil	Pas de tonus musculaire ni au niveau de la nuque ni au niveau de la queue. Bec et narine sous l'eau avec des productions de bulles à intervalle régulier. La tête se relève hors de l'eau de temps en temps mais sans aucun autre mouvement du corps.			
2	Calme	L'individu flotte à la surface de l'eau, la tête est hors de l'eau en regardant autour de lui sans mouvement du corps			
3	Confort	Activité de toilettage du dos ou du ventre. La position penchée d'un côté ou l'autre avec des retours à l'horizontal fréquent			
4	Exploration	Mouvement des pattes, déplacement calme d'un bout à l'autre de la piscine. La tête est relevée ou l'oiseau regarde sous l'eau et montre un comportement alerte			
5	Fuite	Mouvement des pattes et des ailerons. Immersion sous l'eau avec des tentatives de sortie de la piscine. Nage d'un bout à l'autre de la piscine			

Analyse de la fréquence cardiaque

La deuxième année de mesure, l'effet de 3 types d'événements stressants, ci-après appelés '*stressor*', a été étudié sur 6 individus maintenus en binômes durant l'expérimentation, *i.e.* deux individus simultanément dans la piscine. Ces trois binômes ont été maintenus dans l'eau à l'état 'nourris' et à l'état 'à jeun' consécutivement. Les individus 'nourris' ont reçu 3 repas de sardines (sardines, *Sardina pilchardus*, stored at 5°C; Armement des Mascareignes, Le Port, France) par jour d'en moyenne 0.3 ± 0.1 kg chacun. La fréquence cardiaque a pu être étudiée grâce à des électrodes cardiaques placées en sous-cutanée durant la chirurgie d'équipement et reliées à un moniteur traduisant le signal reçu et l'enregistrant sur une mémoire interne. Durant l'expérimentation en piscine, les 3 *stressors* ont été appliqués en notant l'heure d'initiation et de fin de l'évènement. Les trois *stressors* étaient (de l'évènement le moins stressant au plus stressant) : un bruit à proximité, la présence d'une personne visible par les individus ou la manipulation des individus par l'expérimentateur. Se basant sur la délimitation théorique de l'évènement (heure d'initiation et heure de fin), la durée réelle de chaque *stressor* a pu être déterminée. Cette durée réelle est généralement plus longue que la durée théorique. En effet, la vision de l'expérimentateur déclenche l'augmentation de la fréquence cardiaque avant la capture de l'oiseau tandis que le retour à la normale s'effectue plusieurs secondes après la fin du *stressor* (Figure 1).

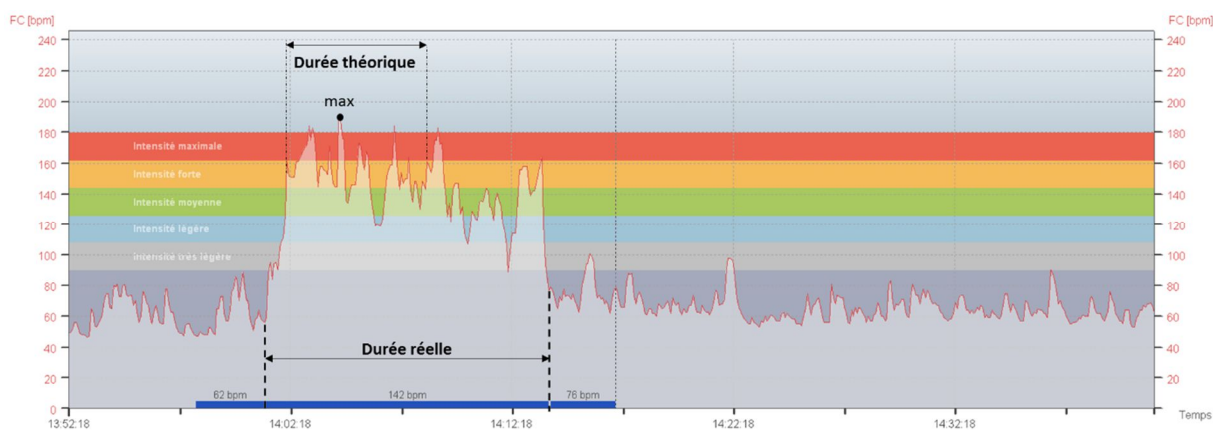


Figure 1 : Exemple de l'augmentation de la fréquence cardiaque en réponse au stress induit par la capture de l'individu. Cette augmentation commence et se prolonge au-delà de la durée théorique de l'évènement, correspondant à la durée réelle de la réaction au stress

L'analyse de la fréquence cardiaque a été réalisée selon la méthode décrite dans Viblanc et al. 2012. Brièvement, l'excès de la fréquence cardiaque 'excess.HR' a été calculée selon l'équation (1) suivante :

$$excess.HR = \frac{(\frac{\sum HR.eve}{N.eve} - \frac{\sum HR.be}{N.be})}{T.eve} \quad (1)$$

Avec $HR.eve$ qui correspond à la moyenne des fréquences cardiaques au cours de l'événement ($N.eve$: durée réelle de l'événement) ; $HR.be$ la moyenne des fréquences cardiaques au cours des trois minutes précédant l'événement et $T.eve$: durée théorique de l'événement. L'excès de la fréquence cardiaque a ainsi été analysé chez les 3 binômes en fonction du *stressor* et de leur état nutritionnel.

Analyse des températures

Les températures périphériques du flanc et du dos ont été analysées chez des individus maintenus individuellement en piscine entre 48 et 56 heures. Ces quatre individus ont suivi le même protocole d'équipement chirurgical que décrit précédemment mais ont été équipés uniquement de deux enregistreurs de températures. Les 4 individus étudiés ici ont tous été maintenus 'à jeun' en piscine ; tandis que les deux premiers individus n'ont été ni dérangés ni manipulés durant l'expérimentation, les deux autres individus ont été sortis de la piscine entre 2 et 4 fois par jour et laissés sans dérangement durant la nuit.

Analyses statistiques

Les résultats présentés dans cette étude n'ont pas encore fait l'objet d'analyses statistiques et seront présentés ici à titre descriptif.

Résultats préliminaires

Analyse de l'agitation/comportement

Les résultats obtenus montrent qu'indépendamment de l'état nutritionnel, les manchots étudiés passent en moyenne 50.4 ± 21.3 % de leur budget-temps en comportement de 'sommeil' (Figure 2). Le cumul des pourcentages de comportements de non-agitation (catégories 'immobile', 'sommeil', 'calme' et 'confort') conduit à un total de 74.6 ± 17.0 % contre 25.4 ± 4.3 % du temps passé en comportements d'agitations (catégories 'exploration' et 'fuite').

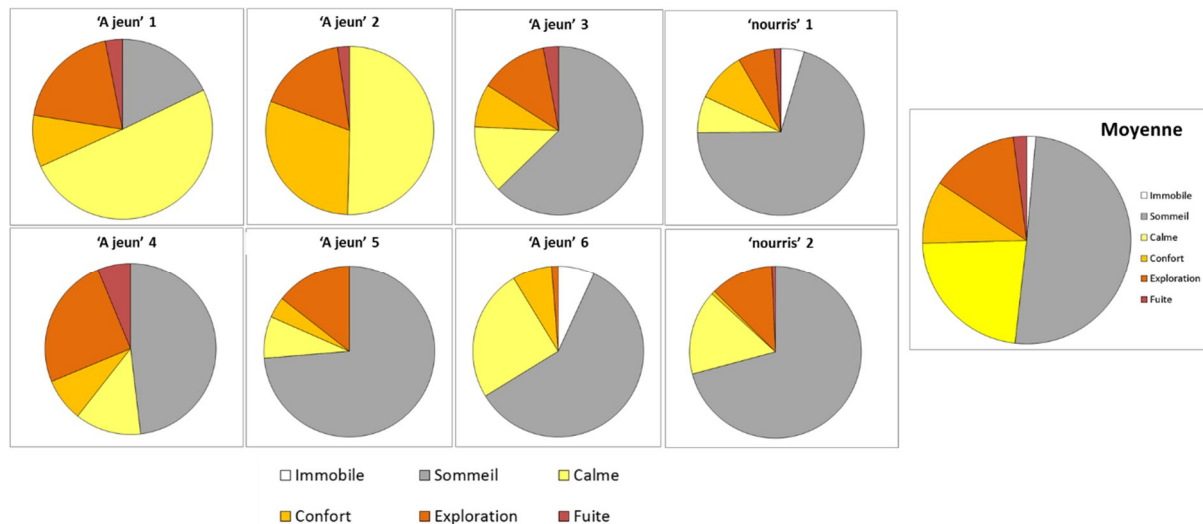


Figure 2 : Budget temps de 8 individus maintenus individuellement en piscine en condition à jeun (N=6) ou nourris (N=2) et budget temps moyen réparti entre en 6 comportements : Immobile, Sommeil, Calme, Confort, Exploration et Fuite

On note également une répartition du budget-temps variée entre les individus. En effet, tandis que l'individu 2 ne montre pas de comportement de 'sommeil', 5/8 individus expriment plus de 50% du budget-temps 'en sommeil'. Le pourcentage du temps en exploration des individus semble quant à lui plutôt stable entre les individus à l'exception de l'individu 6. En effet, les individus passent en moyenne 13.6 % du temps en exploration avec, en excluant l'individu 6, une gamme restreinte d'exploration allant de 7.1 à 25% du temps. Finalement, le comportement de fuite reste ponctuel chez tous les individus avec un maximum de 6.3% du temps pour l'individu 4 face à une moyenne de 1.5% pour les 7 autres individus.

Sans observer de différence majeure du pourcentage total du comportement de 'sommeil', on note cependant une tendance de durée des comportements de 'sommeil' plus longue chez les individus 'à jeun' comparativement aux individus nourris (Figure 3A). De façon spécifique, la durée des événements de 'sommeil', caractéristique de la non-agitation des individus, augmente significativement entre le premier et le dernier matin en piscine (Figure 3B) avec une durée moyenne de 01 :53 minutes le premier jour, de 03 :44 minutes le deuxième jour et de 04:51 le troisième jour.

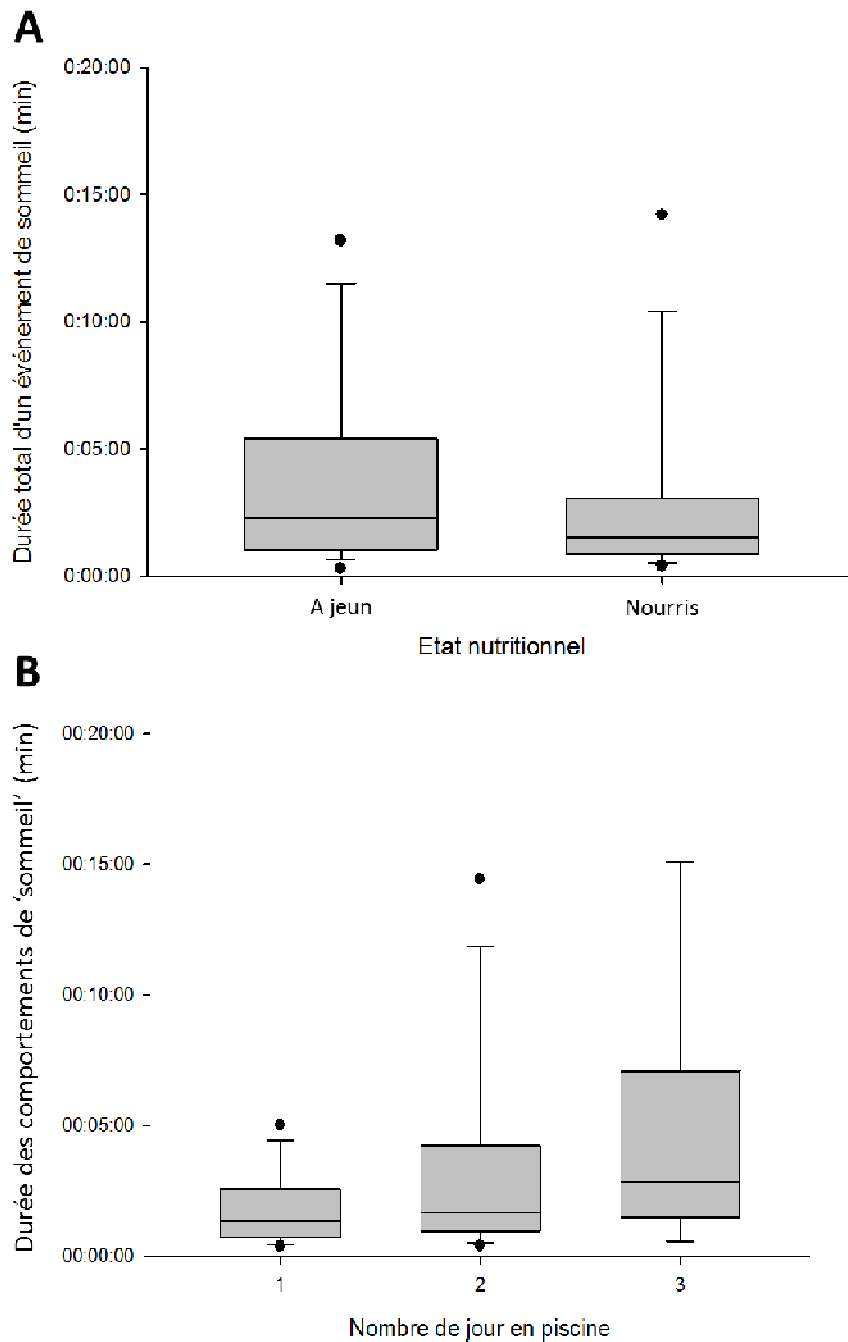


Figure 3 : Durée totale des évènements de 'sommeil' entre les individus en condition de jeûne ou nourris (A) et en fonction du nombre de jours passés en piscine

Analyse de la fréquence cardiaque

La capture des individus semble induire une plus forte augmentation de la fréquence cardiaque que lors d'un stress induit par la présence humaine à proximité des oiseaux, tandis que le stress d'un bruit anthropique conduit à une augmentation de la fréquence cardiaque la plus faible (Figure 4).

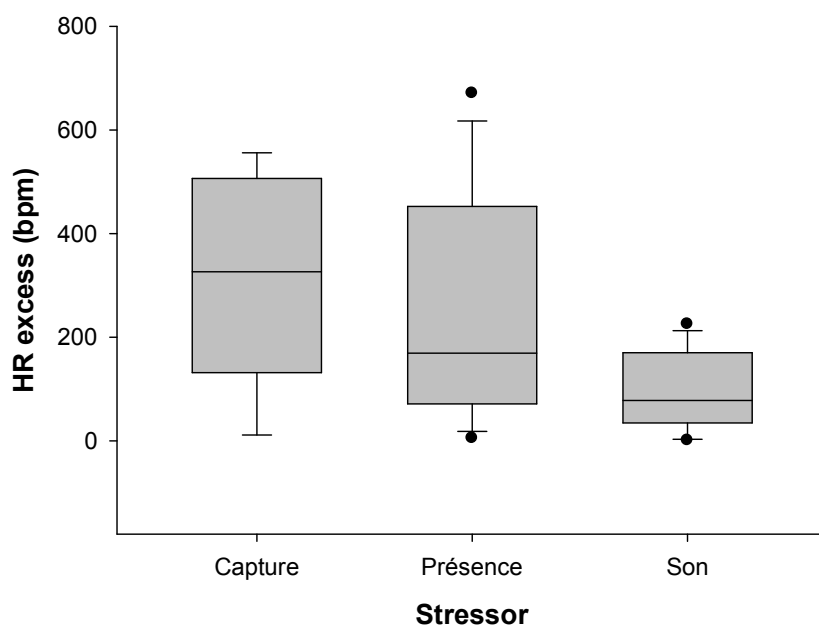


Figure 4 : Excès de la fréquence cardiaque (bpm pour battements par minute) en fonction de 3 types de stress : La capture, la présence humaine à proximité des individus et un bruit anthropique entendu par les individus

De plus, on note une tendance à ce que les individus maintenus 'à jeun' expriment un excès de la fréquence cardiaque plus important que les individus 'nourris' (Figure 5). En effet, avec un excès de fréquence cardiaque de 205.48 ± 34.0 battements par minute, il semble que les individus 'à jeun' aient une réponse légèrement moins forte que les individus 'nourris' avec un excès de fréquence cardiaque de 284.42 ± 47.8 battements par minute.

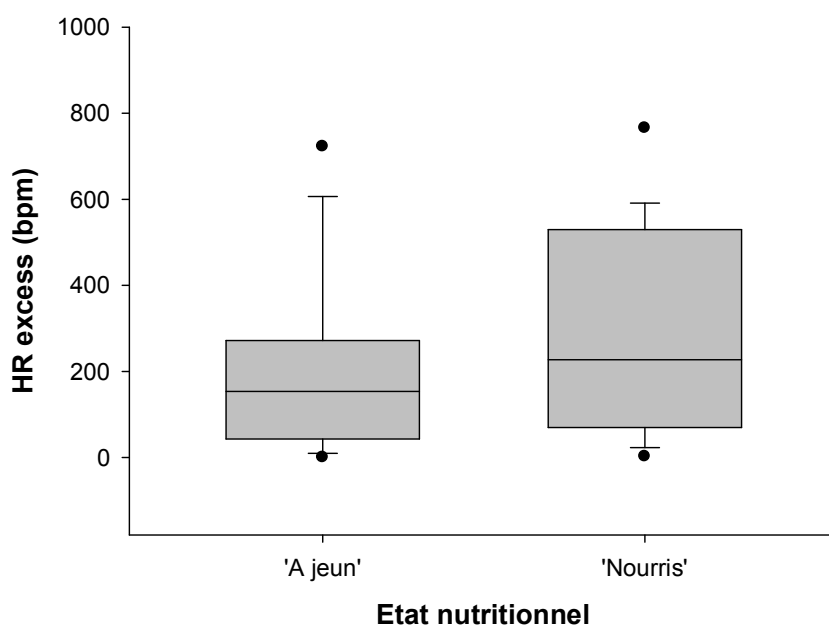


Figure 5 : Excès de la fréquence cardiaque en fonction de l'état nutritionnel des individus : A jeun ou nourris

Analyse des données de températures corporelles

Les températures périphériques, du flanc et du dos, semblent toutes les deux être affectées par la manipulation humaine (Figure 6). Tout d'abord, la première immersion dans l'eau induit une diminution drastique des températures périphériques chez tous les individus. Indépendamment des fluctuations à court-terme, on note que le schéma global de réaugmentation des températures périphériques avec le jeûne (**Chapitre 2** ; Lewden et al. *soumis*) est présent chez tous les individus. Cependant, à court-terme, les températures périphériques semblent affectées par la manipulation humaine avec un nombre plus important de fluctuations chez les individus manipulés (Figure 6B) comparativement aux individus maintenus en piscine sans dérangement (Figure 6A). En effet, chaque événement de manipulation induit une diminution brève des deux températures enregistrées suivie d'une réaugmentation quasi-instantanée de ces dernières. De plus, bien que la réaugmentation de la température du dos après un événement de manipulation semble ramener le tissu à la température initiale, la température du flanc remonte quant à elle à des températures supérieures à la température initiale même si ces températures élevées ne sont pas maintenues et re-diminuent rapidement.

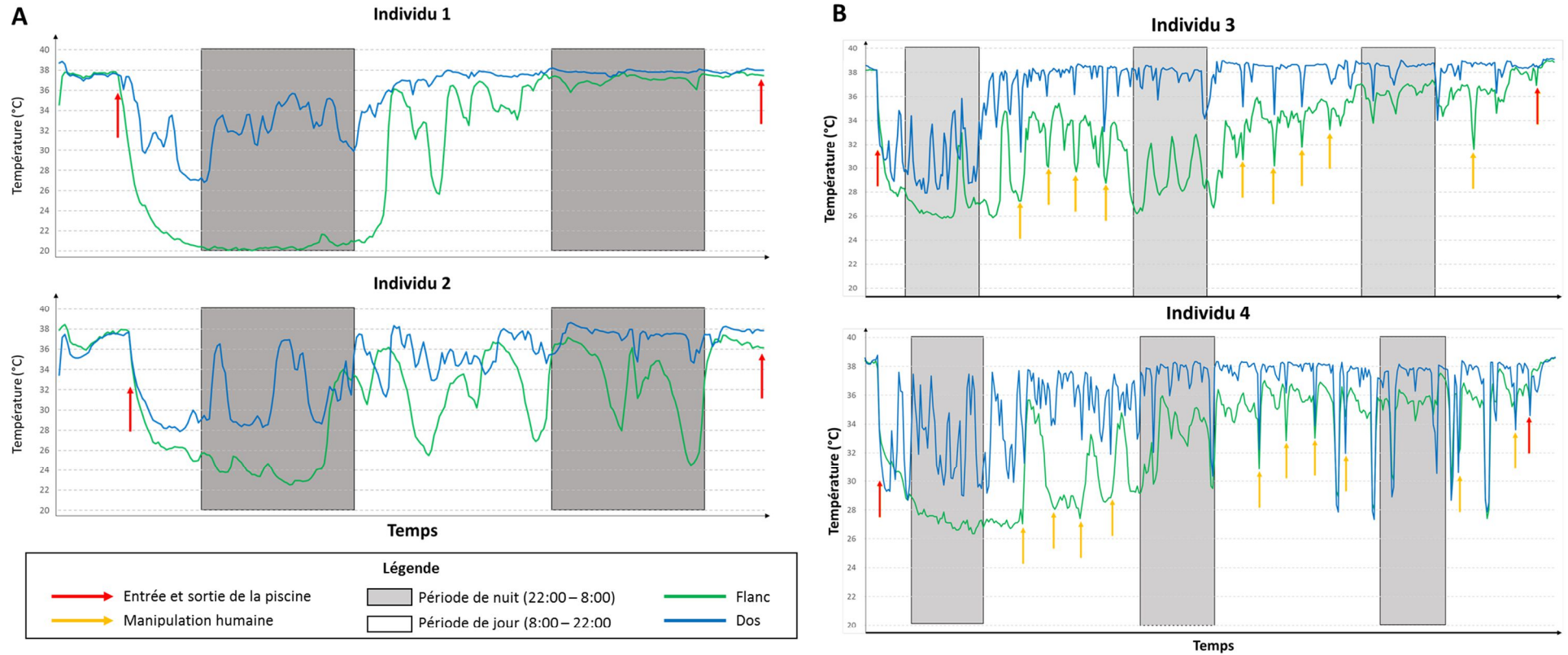


Figure 6: Températures du dos et du flanc mesurées sur 4 individus maintenus à jeun en piscine sans dérangement (A) ou avec plusieurs évènements de manipulations humaines (Flèches oranges)(B). La première flèche rouge indique l’immersion des individus dans l’eau tandis que la deuxième signale la sortie de l’eau des oiseaux. Bien qu’à fine échelle les températures entre les deux groupes varient on note que le patron général de réaugmentation des températures avec la durée du jeun en piscine est présent chez les 4 individus.

Discussion préliminaire

La mise en place de deux conditions expérimentales aux cours des études menées en piscine (**Chapitres 1 et 2** de ce manuscrit ; Lewden et al. 2017b; Lewden et al. *soumis*) a nécessité un dérangement plus ou moins important des oiseaux selon l'état nutritionnel souhaité pour chaque groupe. Ainsi, l'alimentation des individus a conduit à la prise de repas 4 fois par jour induisant 4 captures individuelles quotidiennes tandis que la condition 'à jeun' n'a nécessité aucun dérangement journalier. Conscientes des effets de cette manipulation sur les individus, et afin de pallier à un biais potentiel que cela aurait pu engendrer, les précédentes études réalisées à partir de ces données ont basé toutes leurs analyses sur des périodes de non-dérangement des oiseaux. Ainsi, 'à jeun' comme 'nourris', les températures corporelles ont été étudiées dans les mêmes conditions pour chaque groupe, c'est-à-dire durant les 10 heures de non-dérangement des manchots (Lewden et al. 2017b; Lewden et al. *soumis*). De plus, bien que le niveau de corticostérone n'ait pas été mesuré durant ces études, chaque manipulation des oiseaux s'est faite avec l'utilisation d'une cagoule, démontrée comme réduisant le niveau de stress chez les manchots adélie (Cockrem et al. 2008).

Les résultats de la présente étude montrent un effet du dérangement et de la manipulation humaine sur les individus maintenus en piscine (Figures 4 et 6B). Cependant, malgré le dérangement des oiseaux (nécessaire au déroulement de l'expérimentation, i.e. alimentation des individus 'nourris'), on note un bon niveau d'acclimatation à la piscine (Figures 2 et 3) avec des oiseaux montrant même des indices de comportement de 'sommeil' (matériel supplémentaire 1) et un schéma global des variations de températures similaire chez tous les individus (Figure 6).

L'agitation des individus reste limitée au cours du séjour en piscine (Figure 2) et se concentre principalement durant les premières heures d'immersion (Figure 3B). Bien que l'acclimatation des individus à la piscine se mette en place rapidement après le début de l'expérimentation (et se maintienne sur la durée), il est à noter qu'un faible pourcentage des individus (*i.e.* 2/50 des individus mis en piscine) a démontré une activité bien supérieure à la moyenne avec de nombreuses tentatives de sortie de la piscine (observation personnelle).

Il est intéressant de noter que l'état nutritionnel semble impacter à la fois le comportement de 'sommeil' mais également la réponse au stress des individus. En effet, on observe que les individus 'à jeun' montrent des événements de 'sommeil' plus long que les individus nourris même en ayant subi le même nombre de dérangements (Figure 3). De plus, en condition 'à jeun', les oiseaux expriment une augmentation de la fréquence cardiaque moins importante face à un événement stressant que les individus 'nourris' (Figure 5). Ces résultats pourraient suggérer une stratégie d'économie d'énergie chez les individus 'à jeun' déjà observée au niveau de la fréquence cardiaque des manchots lors de la saison de reproduction à terre (Viblanç et al. 2014).

La diminution des températures périphériques mesurées lors de la manipulation des individus est en accord avec les réponses au stress observées chez d'autres espèces d'oiseaux (Cabanac et Aizawa, 2000; Edgar et al. 2011, 2013; Herborn et al. 2015; Jerem et al. 2015). De plus, restant presque exclusivement à flotter à la surface de l'eau, les individus ont le plumage du dos sec la plupart du temps avec un gain de chaleur possible par radiation solaire. En revanche, lors de la manipulation, les individus (qui tentent d'éviter le contact) se retrouvent fréquemment mouillés par l'agitation. Le changement d'état du plumage, de sec à mouillé, pourrait induire une diminution des températures périphériques. Enfin on remarque que ces brèves diminutions sont suivies par une réaugmentation rapide des températures. Cette réaugmentation des températures pourrait être liée à une dissipation de la chaleur produite lors de l'hyperthermie induite par le stress (Groenink et al. 1994; Veening et al. 2004) ou de la chaleur produite par l'activité d'évitement lors de la capture.

En donnant la position précise de l'animal ainsi que le détail de ses mouvements, l'accélérométrie serait une technique efficace pour répondre précisément aux hypothèses émises dans cette étude. Dans un premier temps, l'immobilité des individus pourrait être constatée grâce à cette technique permettant de délimiter, de jour comme de nuit, un comportement qui se rapprocherait le plus du comportement de 'sommeil'. De plus, de par l'étude des mouvements, le facteur refroidissant de l'immersion du plumage au niveau du dos ou de la production de chaleur par l'agitation/activité pourrait être identifié et contrôlé en établissant un seuil de tangage et d'agitation (VEDBA) correspondant à une position d'immersion des tissus et du mouvement.

Bien que la manipulation des individus induise un stress chez ces derniers et impacte ponctuellement la température des tissus périphériques, elle reste primordiale lors à la mise en place de conditions expérimentales. De plus, ces expériences permettent une meilleure compréhension des phénomènes physiologiques impliqués dans les variations de température en testant l'effet d'un facteur ciblé (e.g état nutritionnel) en l'absence de facteurs confondants (e.g activité de plongée, de nage, taux de capture de proies).

Références

- Buchet, C., Dewasmes, G. and Le Maho, Y.** (1986). An electrophysiological and behavioral study of sleep in emperor penguins under natural ambient conditions. *Physiol. Behav.* **38**, 1-335.
- Busnardo, C., Tavares, R.F., Resstel, L.B.M., Elias, L.L.K., and Correa, F.M.A.** (2010). Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton. Neurosci.* **158**, 51-7.
- Cabanac, M. and Aizawa, S.** (2000). Fever and tachycardia in a bird (*Gallus domesticus*) after simple 400 handling. *Physiol. Behav.* **69**, 541-545.
- Cabanac, A.J. and Guillemette, M.** (2001). Temperature and heart rate as stress indicators of handled 398 common eider. *Physiol. Behav.* **74**, 475-479.
- Cannon, W.B.** (1927). The James–Lange theory of emotions: a critical examination and an alternation. *Am. J. Psychol.* **39**, 106-24.
- Carere, C. and van Oers, K.** (2004). Shy and bold great tits (*Parus major*): Body temperature and breath rate in response to handling stress. *Physiol. Behav.* **82**, 905-912.
- Challet, E., Bost, C-A., Handric, Y., Gendner, J-P. and Le Maho, Y.** (1994). Behavioural time budget of breeding king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Zool. Lond.* **233**, 669-681.
- Cockrem, J.F., Adams, D.C., Bennett, E.J., Candy, E.J., Henare, S.J., Hawke, E.J. and Potter, M.A.** (2004). Endocrinology and the conservation of New Zealand birds. In “Experimental Approaches to Conservation Biology” Ed by MS Gordon, SM Bartol, University of California
- Cockrem, J.F., Potter, M.A. and Candy, E.J.** (2006). Corticosterone in relation to body mass in Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) affected by unusual sea ice conditions at Ross Island, Antarctica. *Gen Comp. Endocrinol.* **149**, 244-252.
- Cockrem, J.F.** (2007). Corticosterone stress responses and avian personalities. *J. Ornithol. (Suppl 2)*: 147.
- Cockrem, J. F., Potter, M. A., Barrett, D. P. and Candy, E. J.** (2008). Corticosterone Responses to Capture and Restraint in Emperor and Adelie Penguins in Antarctica. *Zoolog. Sci.* **25**, 291-298.
- Day, T.A., Buller, K.M., Xu, Y., Dayas, C.V. and Crane, J.W.** (1999). Separation of neural pathways mediating HPA axis responses to emotional and physical stressors. In “Control Mechanisms of Stress and Emotion: Neuroendocrine-Based Studies” Ed by H Yamashita, JW Funder, JG Verbalis, Y Ueta, Elsevier, Amsterdam. pp 213-221.
- Edgar, J.L., Lowe, J.C., Paul, E.S. and Nicol, C.J.** (2011). Avian maternal response to chick distress. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **278**, 3129-3134.
- Edgar, J.L., Nicol, C.J., Pugh, C.A. and Paul, E.S.** (2013). Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. *Physiol. Behav.* **119**, 195-200.
- Ellenberg, U., Mattern, T., Seddon, P. J. and Jorquera, G. L.** (2006). Physiological and reproductive consequences of human disturbance in Humboldt penguins: the need for species-specific visitor management. *Biol. Conserv.* **133**, 95-106.
- Giese, M.** (1998). Guidelines for people approaching breeding groups of Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*). *Polar Rec.* **34**, 287-292.
- Groenink, L., van der Gugten, J., Zethof, T., van der Heyden, J. and Olivier, B.** (1994). Stress-induced hyperthermia in mice: hormonal correlates. *Physiol. Behav.* **56**, 747-9.

- Handrich, Y., Bevan, R. M., Charrassin, J.-B., Butler, P. J., Putz, K., Woakes, A. J., Lage, J. and Le Maho, Y.** (1997). Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* **388**, 64-67.
- Herborn, K.A., Graves, J.L., Jerem, P., Evans, N.P., Nager, R., McCafferty, D.J. and McKeegan, D.E.F.** (2015). Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiol. Behav.* **152**, 225-230.
- Holberton, R.L., Helmuth, B. and Wingfield, J.C.** (1996). The corticosterone stress response in gentoo and king penguins during the non- fasting period. *Condor* **98**, 850-854.
- Holmes, N., Giese, M. and Kriwoken, L. K.** (2005). Testing the minimum approach distance guidelines for incubating Royal penguins *Eudyptes schlegeli*. *Biol. Conserv.* **126**, 339-350.
- Hood, L.C., Boersma, P.D. and Wingfield, J.C.** (1998) The adrenocortical response to stress in incubating Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Auk* **115**, 76-84.
- Ikkatai, Y. and Watanabe, S.** (2015). Eye surface temperature detects stress response in budgerigars 437 (*Melopsittacus undulatus*). *Neuroreport* **26**, 642-646.
- Jansen, A. S. P., van Nguyen, X., Karpitskiy, V., Mettenleiter, T. C. and Loewy, A. D.** (1995). Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. *Science* **270**, 644-646.
- Jerem, P., Herborn, K., McCafferty, D., McKeegan, D. and Nager, R.** (2015). Thermal Imaging to Study Stress Non-invasively in Unrestrained Birds. *J. Vis. Exp.* 4023.
- Jouventin, P.** (1982). *Visual and Vocal Signals in Penguins, Their Evolution and Adaptive Characters*. Berlin: Verlag Paul Parey.
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M. and W., Blokhuis, H.J.** (1999). Coping styles in animals: current in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**, 925-935.
- Lewden, A., Enstipp, M. R., Picard, B., van Walsum, T. and Handrich, Y.** (2017). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea: thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Biol.* **220**, 3084-3094.
- Lewden, A., Enstipp, M.R., Bonnet, B., Bost, C., Georges, J.Y., Handrich, Y.** (2017). Thermal strategies of king penguins during prolonged fasting in water. *Under review J. Exp. Biol.*
- van Oers, K. and Carere, C.** (2007). Long-term effects of repeated handling and bleeding in wild caught 470 great tits *Parus major*. *J. Ornithol.* **148**, 185-190.
- Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J. and Lima, S. L.** (2000). Behavioral, neurophysiological and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**, 817-842.
- Romero, L.M.** (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **128**, 1-24.
- Siegel, H. S.** 1980. Physiological stress in birds. *BioScience* **30**, 529-534.
- Veening, J.G., Bouwknecht, J.A., Joosten, H.J.J., Dederen, P.J., Zethof, T.J.J., Groenink, L., van der Gugten, J., Olivier, B.** (2004). Stress-induced hyperthermia in the mouse: c-fos expression, corticosterone and temperature changes. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **28**, 707.
- Viblanc, V. A., Smith, A. D., Gineste, B. and Groscolas, R.** (2012). Coping with continuous human disturbance in the wild: insights from penguin heart rate response to various stressors. *BMC Ecol.* **12**, 10.

Viblanç, V. A., Saraux, C., Malosse, N. and Groscolas, R. (2014). Energetic adjustments in freely breeding-fasting king penguins: Does colony density matter? *Funct. Ecol.* **28**, 621-631.

Walker, B.G., Boersma, P.D. and Wingfield, J.C. (2004) Physiological condition in Magellanic penguins: does it matter if you have to walk a long way to your nest? *Condor* **106**, 696-701.

Matériel supplémentaire 1

D'un point de vue comportemental, le sommeil se définit par un comportement calme et se caractérise par (i) la fermeture des yeux, (ii) une diminution du seuil d'éveil à la stimulation, (iii) un retour rapide à un état éveillé avec une stimulation suffisante et (iv) une augmentation de la durée ou de l'intensité du sommeil après un manque de sommeil (voir Lima 2006 pour revue). Les oiseaux présentent majoritairement des phases de sommeil lentes, caractérisées par des ondes lentes lors de l'enregistrement de l'activité cérébrale faite par électroencéphalogramme (EEG). En revanche, ils expriment des phases de sommeil paradoxal très brèves (10 à 20 secondes), ayant un EEG similaire à celui d'un état éveillé ainsi que des mouvements oculaires rapides et une diminution du tonus musculaire (Rattenbord et al. 2000). Le sommeil paradoxal est toujours précédé par une phase de sommeil lent. C'est aussi durant ce sommeil lent que les oiseaux peuvent dormir de façon unihémisphérique.

A terre, le sommeil du manchot est caractérisé par une posture debout avec le bec sous l'aile (Buchet et al. 1986 ; Figure 1). Ce comportement est toutefois peu fréquent (inférieur à 10%) lors de la saison de reproduction ou les individus sont aux prises à la défense du territoire, de l'œuf et par la suite du petit poussin (Challet et al. 1994). L'augmentation de la durée du jeûne avec la saison de reproduction suggère une contribution du sommeil à l'économie d'énergie (Challet et al. 1994).

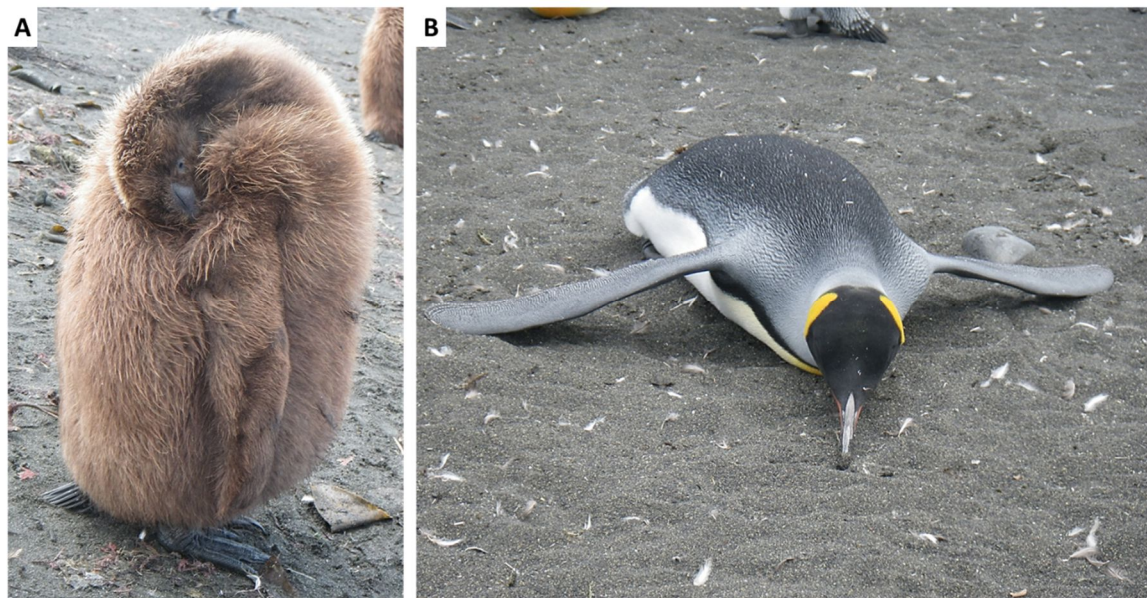


Figure 1 : Posture conventionnelle décrite pour un comportement de sommeil chez le manchot (A) et posture moins conventionnelle illustrant également un comportement de sommeil confirmé par un temps de réaction de l'individu long ainsi que la fermeture des yeux (B)

Le sommeil chez le manchot royal en mer n'a, à notre connaissance, jamais été décrit auparavant. En effet, ces événements de sommeil se produisant, pour la plupart, à des centaines de kilomètres de la colonie, ils restent difficiles à observer ou à mesurer. Le maintien d'individu en condition captive a permis pour la première fois de mettre en évidence des éléments pouvant participer à la description de ce comportement énigmatique en mer.

Ainsi, l'immobilité des individus, l'absence de tonus musculaire au niveau du cou et de la queue, accompagnée d'épisodes d'expirations sous l'eau, ayant le bec et les narines intégralement immergés, caractériserait bien un comportement de sommeil (Figure 2).

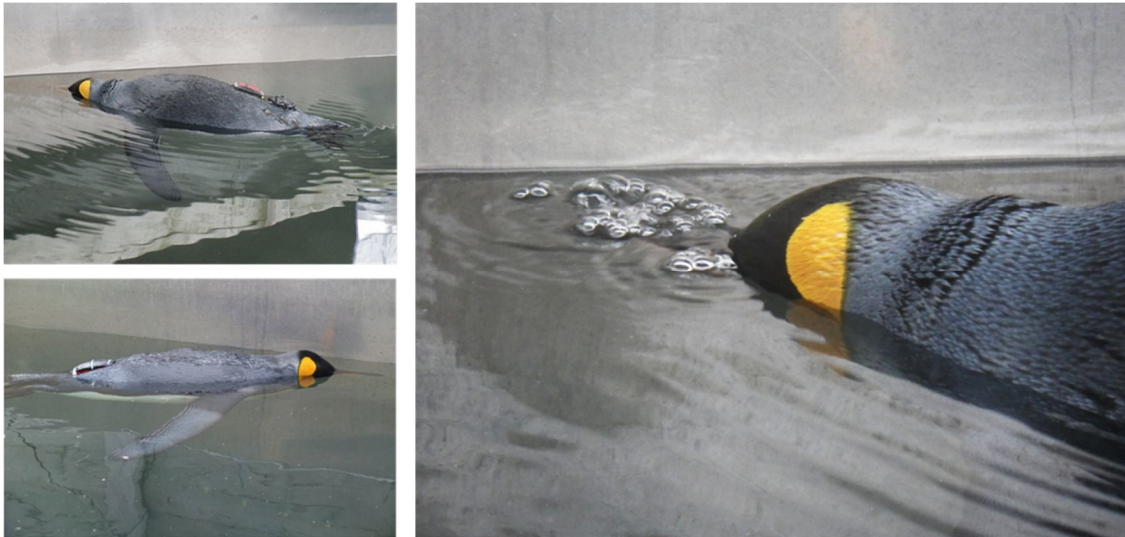


Figure 2 : Comportement de sommeil observé en condition de captivité et entrecoupé de période d'expirations

En effet, durant ces périodes qualifiées de 'sommeil' dans l'étude précédente, pouvant durer plusieurs minutes, on observe une répartition du temps d'apnée de 84% contre 16% du temps où les narines et le bec se trouvent au-dessus de la surface de l'eau (Figure 3). Ainsi, les durées d'apnée durent en moyenne 11 secondes, mais peuvent s'étendre jusqu'à 41 secondes.

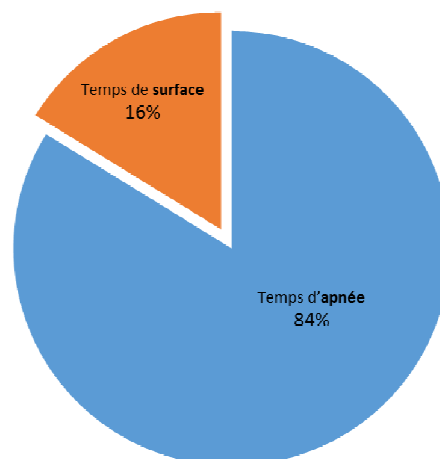


Figure 3 : Moyenne de la répartition de la durée d'apnée et de la durée avec les voies respiratoires au-dessus de la surface durant plusieurs épisodes de 'sommeil'

Les événements d'expiration sous l'eau sont facilement identifiables grâce au nombre de fois où des bulles sont observées à la surface de l'eau (Figure 2, photo de droite). De façon standardisée, nous avons assumé que lorsque l'animal relève la tête hors de l'eau, ce dernier inspirait au moins une fois. C'est ainsi que nous avons comptabilisé une inspiration à chaque relève de tête. Ainsi, en parallèle d'une durée d'apnée plus longue, on observe également un nombre d'expirations, *i.e.* sous l'eau, supérieur à celui du nombre d'inspirations (Figure 4A). De plus, le nombre d'expirations augmente avec la durée d'apnée (Figure 4B).

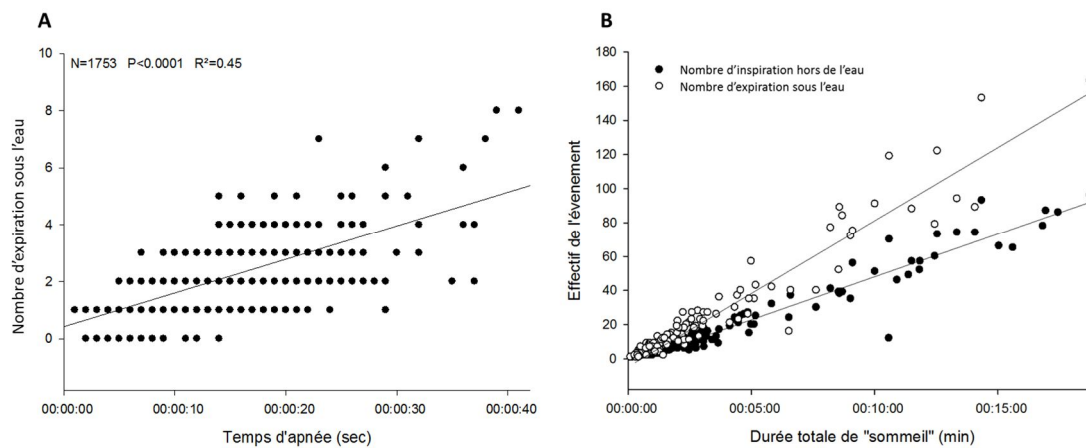


Figure 4 : Nombre d'expiration sous l'eau en fonction du temps d'apnée (A) et nombres d'expiration sous l'eau et d'inspiration caractérisés par une position de la tête hors de l'eau en fonction de la durée totale du 'sommeil'

Enfin, on note que ces événements de 'sommeil' ont également été observés lorsque les individus étaient maintenus deux par deux (*i.e.* binôme) en piscine. Ainsi, nous avons noté des événements de 'sommeil' synchronisés (Figure 5A) avec au moins un individu présentant une posture caractéristique de 'sommeil' (*i.e.* bec sous l'eau). Lors de ces épisodes, nous avons constaté, à de très nombreuses reprises, l'un des manchots prenant appui sur le deuxième (Figure 5A). La position du bec sous l'eau et la production de bulles ont pu être confirmées chez le premier oiseau tandis que ces indices de 'sommeil' n'ont pas pu être identifiés chez le deuxième individu n'ayant pas la tête dans l'eau dans cette position. Des périodes de 'sommeil' désynchronisées ont également été observées lors de cette cohabitation dans l'eau (Figure 5B).

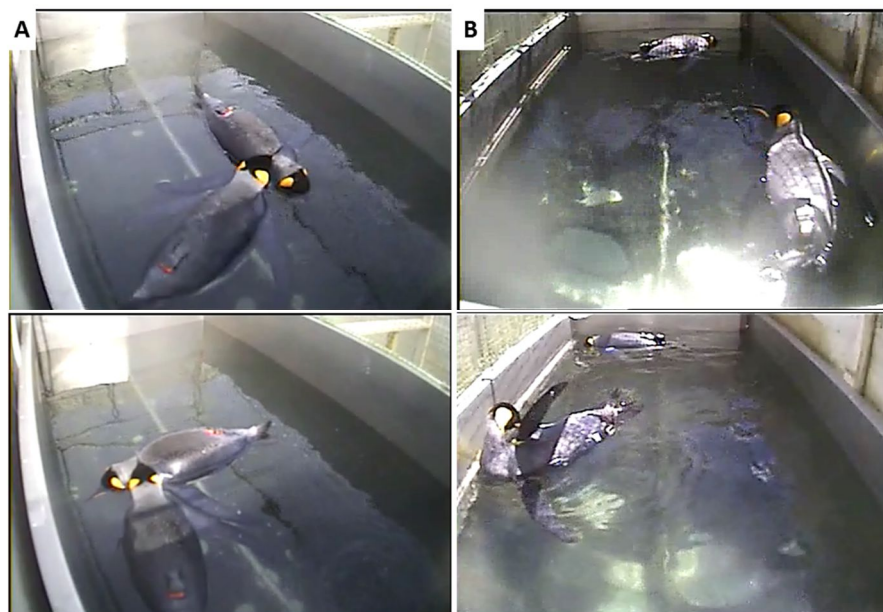
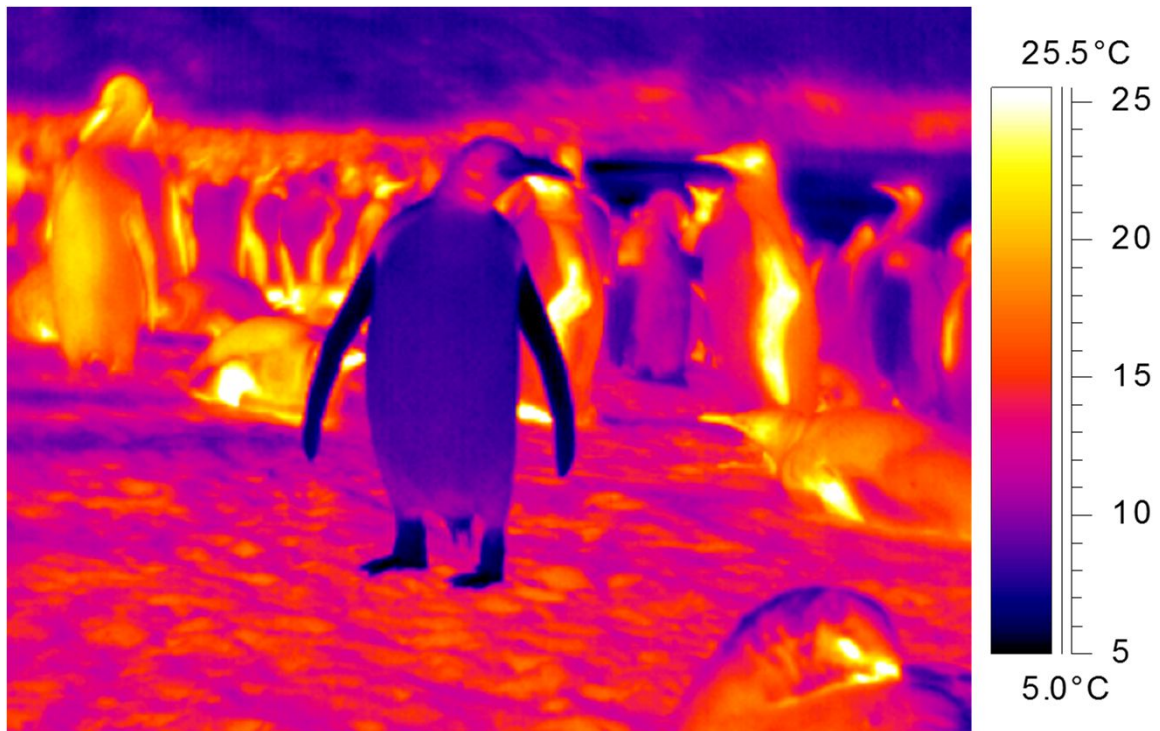


Figure 5 : Identification du comportement de 'sommeil' chez deux individus simultanément (A) maintenus en piscine. Ce même comportement de 'sommeil' a également été observé chez un seul des deux individus (individu à l'arrière-plan) de façon désynchronisée (B)

Bien qu'il semble que le comportement de 'sommeil' soit exprimé chez les manchots royaux maintenus en condition expérimentale dans une piscine, l'absence d'un enregistrement encéphalogramme ne nous permet pas de confirmer de façon catégorique que nous sommes en présence d'un comportement de sommeil tel que décrit dans la littérature.

Partie 2

Stratégies de thermorégulation liées au contraintes environnementales – Eau vs Air



- ❖ **Chapitre 3** : Lewden, A., Nord, A., Bonnet, B. and Handrich, Y. (2017). Récupération des températures du manchot royal après une longue immersion dans l'eau froide : Une stratégie inattendue. *En préparation*.
- ❖ **Chapitre 4** : Lewden, A., Bonnet, B., Chauvet, F., McCafferty, D. and Handrich, Y. (2017). Dynamique de la réaugmentation des températures corporelles chez le manchot royal. *En préparation pour Journal of Thermal Biology*

VI

Chapitre 3

Lewden, A., Nord, A., Bonnet, B. and Handrich, Y. (2017). Récupération des températures du manchot royal après une longue immersion dans l'eau froide : Une stratégie inattendue. *En préparation.*



Récupération des températures du manchot royal après une longue immersion dans l'eau froide : Une stratégie inattendue

En préparation

Agnès Lewden^{1,*}

Andreas Nord^{2,+}

Batshéva Bonnet¹

Yves Handrich¹

¹ Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France.

² Department of Biology, Section for Evolutionary Ecology, Lund University, Lund, Sweden

+ Present address of AN: Department of Arctic and Marine Biology, Arctic Animal Physiology, University of Tromsø, Tromsø, Norway

*Author correspondence: agneslewden@gmail.fr

Résumé

Le manchot royal est une espèce capable d'utiliser l'hétérothermie régionale afin d'augmenter la durée en apnée de ses plongées. En revanche, de retour à la surface de l'eau, la réaugmentation de tous les tissus, y compris des tissus périphériques, conduit à une augmentation importante du métabolisme. Plusieurs études suggèrent que le coût de récupération de la normothermie dépend de la température des tissus périphériques induisant des pertes de chaleur plus ou moins importantes. Ainsi les individus nourris, réduisant la perfusion sanguine aux organes digestifs au détriment de la périphérie, montreraient des coûts de récupération plus faibles liés à une meilleure isolation thermique.

L'objectif de notre étude est de mesurer, chez des manchots royaux équipés de *loggers* internes, le coût de récupération d'individus nourris et à jeun, lors de leur retour à terre, en fonction des variations de températures internes et périphériques.

Les résultats montrent une récupération plus rapide des températures des individus nourris comparativement aux individus à jeun en accord avec les précédentes études. De plus, les individus nourris montrent un métabolisme de récupération supérieur aux individus à jeun. En revanche, on observe une récupération quasi-instantanée des températures périphériques indépendamment de l'état nutritionnel. Enfin, le métabolisme de récupération, *i.e.* augmentation des températures, est supérieur au métabolisme de maintien des tissus à normothermie, *i.e.* températures stables.

La récupération de la normothermie à terre intervient simultanément au niveau des tissus internes et des tissus périphériques. Avec une augmentation des tissus périphériques plus rapide que celle des tissus internes, cette récupération conduit même à l'instauration d'un gradient inverse. L'activité de digestion semble non pas se substituer au coût de thermorégulation mais s'ajouter au taux métabolique en l'absence de conditions environnementales contraignantes. En effet, ayant été mesurées au sein de la zone de thermoneutralité des individus, les coûts de récupération semblent être limités à la thermogénèse sans être influencés par les pertes de chaleur. Nos résultats suggèrent que l'utilisation de fenêtres thermiques au niveau du tronc pourrait être un moyen d'ajuster plus finement la température interne bien que la présence de tissu adipeux à cet endroit suggère également la mobilisation de l'énergie en réponse au coût de thermorégulation.

Mots clés : Thermorégulation – Métabolisme – Normothermie - Dissipation de chaleur

Introduction

Il est acquis que les espèces marines endothermes, telles que les oiseaux plongeurs, sont soumises à des pertes de chaleur plus élevées dans l'eau que dans l'air notamment en raison de la forte conductivité du milieu aquatique (Bullard et Rapp 1970; Gagge et Nishi 1977; Dejours 1987). Ainsi, les coûts énergétiques de thermorégulation sont plus élevés (Scholander 1940; Kooyman et al. 1976; Stahel et Nicol 1982) et le métabolisme d'un individu submergé est environ deux fois supérieur à celui d'un individu dans l'air (Ponganis 2015). Les pertes de chaleur peuvent être limitées par l'isolation des individus (Kooyman et al. 1976) et par la réduction du flux sanguin (*i.e.* vasoconstriction) dans les tissus périphériques et les membres (Bullard et Rapp 1970). Ces ajustements vont permettre de diminuer les coûts de thermorégulation. De même, il a été démontré que la production de chaleur par d'autres activités telles que la digestion (*i.e. specific dynamic action, SDA*) pouvait, par substitution, réduire les coûts de thermogénèse au repos dans l'eau (Culik et al. 1991; Charrassin et al. 1998; Ponganis et al 2001).

Le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) exprime une consommation d'oxygène 83% plus élevée dans l'eau que dans l'air (Froget et al. 2004). De plus, une étude révèle que dans l'eau froide, les individus à jeun (*i.e.* sans SDA) ont une consommation d'oxygène au repos supérieure à celle mesurée chez des individus nourris (Fahlman et al. 2005). Cette différence pourrait venir du fait que les individus nourris présentaient un tissu adipeux plus épais que les individus à jeun, diminuant la conductance thermique de ces derniers (Fahlman et al. 2005). Cependant, la même relation a été établie entre des individus à jeun et re-nourris, avec un repas de poissons après plusieurs jours de jeûne, ayant la même condition corporelle (*i.e.* épaisseur du tissu adipeux) (Halsey et al. 2008). De plus, la réaugmentation de la température de l'abdomen, après une période d'immersion dans l'eau froide, a également été étudiée et montre que l'abdomen d'individus re-nourris atteint plus rapidement la normothermie (*i.e.* récupération) que celui d'individus à jeun (Halsey et al. 2008).

Ces études suggèrent que la différence de métabolisme mesurée en fonction de l'état nutritionnel des individus dans l'eau froide pourrait être le résultat d'un ajustement de l'isolation. En effet, les oiseaux nourris en activité de digestion pourraient favoriser la perfusion sanguine de la région splanchnique au détriment des tissus périphériques qui, dans le cas d'une vasoconstriction, pourrait réduire les pertes de chaleur (Fahlman et al. 2005; Halsey et al. 2008). De plus, une récente étude suggère que les individus à jeun dans l'eau maintiennent une plus longue perfusion du tissu adipeux (*i.e.* température plus élevée) que les individus nourris (Lewden et al. *soumis*) supportant l'hypothèse précédente. Cependant, aucune mesure de températures périphériques en période de réchauffement, *i.e.* récupération après une période d'hypothermie, n'a été à ce jour effectuée chez cette espèce.

L'objectif de notre étude est d'étendre les mesures menées par les deux études précédemment citées en mesurant l'évolution des températures périphériques chez des individus à jeun et nourris. En effet, il apparaît que l'état nutritionnel des individus (*i.e.* à jeun vs nourris) influence la durée de vasodilatation

périphérique du tissu adipeux chez le manchot royal (Lewden et al. 2017 *soumis*). De plus, la mobilisation et/ou le stockage des réserves lipidiques en région sous-cutanée peut influencer les pertes de chaleur via la vasoconstriction/dilatation des tissus périphériques. Ainsi, Lewden et al. a mesuré une augmentation de la consommation d'oxygène corrélée à l'augmentation de la température périphérique du flanc.

Dans un premier temps nous allons déterminer l'évolution des températures internes et périphériques en période de réaugmentation après une hypothermie induite par une immersion dans l'eau froide. D'après la littérature, nous supposons que les individus nourris, en activité de digestion, maintiendront une vasoconstriction périphérique (*i.e.* température basse) prolongée durant la réaugmentation des températures internes. De plus, nous nous attendons à ce qu'indépendamment de l'état nutritionnel, lors d'une récupération des températures après une période d'hypothermie, les températures internes augmentent en priorité suivies des températures périphériques. En effet, cette stratégie de réchauffement permettrait de maintenir un gradient de température progressif entre le milieu interne et le milieu ambiant limitant les pertes de chaleur en période de récupération.

Par la suite, nous allons étudier le métabolisme durant cette phase de récupération des températures à normothermie en fonction de la température interne et de la température périphérique du flanc. Par l'augmentation des pertes de chaleur, nous supposons que la réaugmentation des températures du tissu périphérique en période de retour à normothermie sera plus coûteuse que la récupération des températures de l'abdomen.

Pour se faire plusieurs manchots royaux, équipés de quatre enregistreurs de températures à différents endroits du corps, ont été maintenus nourris ou à jeun dans une piscine d'eau de mer froide induisant des températures corporelles basses. La température des tissus ainsi que le métabolisme ont été mesurés à la sortie de la piscine durant la période de réaugmentation des températures à terre.

Matériel & Méthodes

Les manchots royaux ont été capturés paradant en colonie de la "Baie du marin" sur l'île de Possession, dans l'archipel Crozet située au Sud de l'Océan Indien (46°4' S, 51°8' E). Les expériences ont été menées durant trois étés austraux (de Novembre à Février 2013/2014; 2014/2015; 2015/2016). Les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité d'éthique français (APAFIS, permit No 02015041411414001) et le comité environnemental polaire français (permit No 2013-76, 2014-121).

Le jour de leur capture, les individus ont été mesurés et pesés. Le même jour, ils ont été équipés suivant une procédure chirurgicale précédemment décrite dans Lewden et al. 2017b avec 4 enregistreurs de température (iButton MXMDS1922L-F5; AVNET-MEMEC; résolution: $\pm 0.0625^\circ\text{C}$; gamme : 0-50°C). Ces loggers ont été implantés au niveau du flanc, du dos et de la plaque incubatrice à égal distance entre la peau et le muscle dans le tissu adipeux sous-cutané et au niveau de la cavité abdominale plus en

profondeur. Après la chirurgie, les individus ont été maintenus deux par deux, dans un enclos en bois (3 x 3 m, sans toit) sans dérangement (à part pour le nourrissage) durant 6.0 ± 0.1 jours. Cette période à terre est nécessaire chez le manchot royal pour que les individus retrouvent un comportement naturel après la chirurgie (Froget et al. 2004).

A la suite de cette période de récupération, les manchots ont été placés dans une piscine d'eau de mer (2.5m de long x 1.3m de haut x 1.2m de profondeur et un volume d'eau de 2.5m^3) équipée d'un système de pompes assurant un renouvellement de l'eau constant afin de maintenir la qualité et la température de l'eau stable.

Etat nutritionnel

Durant les 3 années, un total de 18 individus a été maintenu à jeun dans la piscine d'eau de mer. Suite à ce jeûne d'une durée moyenne de 55.12 ± 9.5 heures, les individus ont été mesurés à terre, soit à thermoneutralité (Froget et al. 2002). La masse moyenne des individus à jeun lors de leurs sorties de piscine était de 11.65 ± 0.1 Kg. La deuxième et la troisième année d'expérimentation, les mêmes individus (N=12) ont été maintenus, lors d'une seconde expérience, nourris en piscine. En effet, ces derniers ont reçu une moyenne de 0.3 ± 0.1 kg de poissons par repas répartie en 4 repas durant la phase diurne de la journée. Leurs masses le jour de la sortie de la piscine, et donc de leurs mesures, était de 11.94 ± 0.2 Kg. La masse entre le groupe des individus à jeun et nourris n'est pas significativement différente (Student's t-tests, $P > 0.05$).

Températures corporelles

Les températures du flanc (T_{flc}), du dos (T_{dos}), de la plaque incubatrice (T_{inc}) et de l'abdomen (T_{abd}) ont été mesurées à une fréquence de 11 minutes. L'analyse de l'évolution de ces températures a été faite sur les 121 minutes succédant la sortie de l'eau pour les deux premières années de mesure (N= 13 ; n=26 ; Figure 1). En revanche, la troisième année (N=7 ; n=38), l'évolution des températures en période de récupération a été étudiée sur une durée variable de 33 à 121 minutes selon les individus, pour une moyenne de 70 minutes de temps de récupération. La dernière température mesurée en piscine a été incluse dans les figures (-11 minutes) mais n'a pas été considérée dans les analyses statistiques. Ainsi, les températures de récupération correspondent à la première température mesurée à terre (0 minutes) jusqu'à la fin du temps de récupération. La récupération est considérée comme complètement atteinte ou terminée lorsque les températures sont stabilisées ou supérieures à 36°C soit la température de normothermie à 1°C près.

Respirométrie

Durant la troisième année de mesure, nous avons mesuré la consommation d'oxygène de 7 individus à plusieurs reprises ($n=38$), avec une moyenne de 6 mesures par individu durant $01 :06 \pm 00 :20$ minutes à terre après chaque sortie de la piscine. Pour se faire, nous avons utilisé un système de respirométrie en circuit ouvert ('Turbofox' ; Sable Systems, Henderson, NV, USA) composé d'une chambre métabolique cylindrique (volume de 60 L) suspendue au-dessus de l'animal restant calme dans le noir durant la mesure (Figure 1).

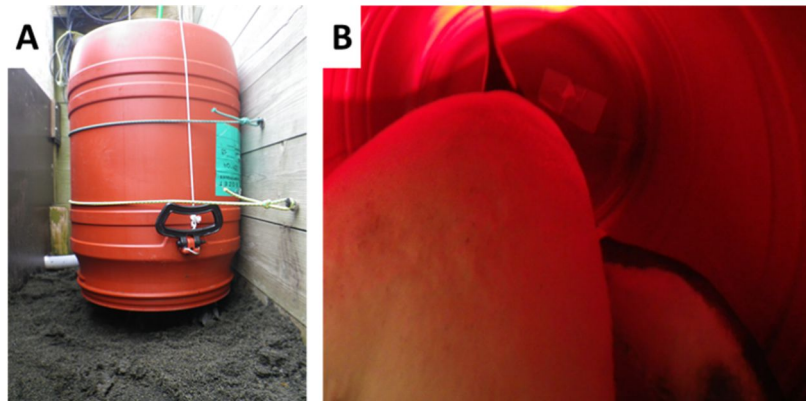


Figure 1 : Vue extérieure (A) et intérieure (B) de la chambre métabolique terrestre pour mesurer le métabolisme de récupération des températures après une période d'immersion dans l'eau froide

La chambre métabolique est ouverte à hauteur des pieds de l'individu permettant une entrée d'air dans la chambre. Le flux d'air principal est pompé à travers la chambre métabolique et contrôlé par le Turbofox à $40 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (corrigé automatiquement de STP, 273 K et 101.3 kPa). Un sous-échantillon de l'air pompé ($200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) passe alors à travers une cellule d'analyse d'humidité (RH-300), de CO_2 et d'oxygène. La concentration d'oxygène et de CO_2 dans la chambre, le flux d'air principal, l'humidité et la pression barométrique ont été enregistrés toutes les 4 secondes à l'aide du logiciel Expedata (Sable Systems). Toutes les connexions entre les composants du système de respirométrie ont été montées avec des tuyaux imperméables aux échanges de gaz. L'analyseur de gaz et d'humidité a été calibré avant chaque mesure utilisant de l'air sec et sans CO_2 après être passé successivement dans une combinaison de colonnes composées de magnésium perchlorate, d'Ascarite et de Soda lime (Sigma-Aldrich Chemie, Lyon, France). De même, la calibration de l'analyseur du CO_2 s'est faite avec une bouteille de gaz de concentration en CO_2 de 0.49% (Alphagaz; Air Liquide, Paris, France).

Analyses des données

Dans un premier temps, la moyenne des températures de tous les individus a été calculée toutes les 11 minutes pour chaque tissu et pour les deux états nutritionnels. Pour chaque tissu, la température moyenne a été étudiée en fonction du temps de récupération, de l'état nutritionnel (à jeun ou nourris) ainsi que de l'interaction entre ces deux facteurs par un modèle linéaire (LM). Puis le gradient de température entre les températures internes et périphériques a été décrit.

Par la suite, les analyses statistiques ont été réalisées uniquement sur la T_{flc} et la T_{abd} . En effet, de par la position des individus dans la piscine, l'enregistreur de température du dos se trouve sous une partie de peau non-immersée en continu pouvant venir impacter la T_{dos} (Lewden et al. 2017b). De plus, la plaque incubatrice étant une zone de peau déplumée fortement vascularisée, les variations de températures de cette zone ne sont pas représentatives des températures périphériques du tronc, une zone particulièrement bien isolée par les phanères. L'étude de l'augmentation de la T_{abd} a été faite à l'aide d'un modèle linéaire mixed (LMM) à partir de la différence de température entre la première et la troisième mesure du temps de récupération, soit durant 22 minutes après la sortie de l'eau. En effet, cette période correspond à la durée moyenne de récupération complète de la T_{flc} . Ainsi l'augmentation de la T_{abd} (DT_{abd}) a été étudiée en fonction de la T_{abd} initiale, de la T_{flc} initiale, de la masse corporelle, de l'état nutritionnel et de l'interaction masse corporelle et état nutritionnel en incluant l'identifiant des individus en facteur aléatoire.

L'étude du métabolisme de récupération débute par une comparaison multiple des moyennes (test de Kruskal-Wallis) de mesures faites sur des individus à normothermie collectées dans littérature et les mesures faites lors de notre étude sur des individus soit à normothermie soit montrant une augmentation de la T_{abd} inférieure ou supérieure à 2°C sur toute la période de récupération (*i.e.* 121 minutes).

L'analyse de la consommation d'oxygène s'est faite à l'aide du logiciel Expedata (Sable System). Cette analyse suit les étapes précédemment décrites dans Lewden et al. *soumis* à quelques exceptions près. Les segments délimités lors de l'analyse ont été sélectionnés à partir de la température de normothermie atteint par le tissu étudié. Ainsi, pour chaque enregistrement, le profil de consommation d'oxygène a été divisé en deux périodes en fonction de la durée de récupération du tissu. La première partie du profil correspond alors à la consommation d'oxygène pendant la période de récupération (*recovery*) tandis que la deuxième partie correspond à la consommation d'oxygène pendant le maintien à normothermie du tissu (*normothermie*). La valeur moyenne de consommation d'oxygène a été calculée pour les deux segments et par la suite les valeurs du taux de consommation d'oxygène ont été transformées en taux métabolique spécifique (W.Kg^{-1}) considérant un RQ moyen de 0.74 calculé sur les individus mesurés.

Les différences de métabolismes entre la période de récupération et de maintien à normothermie des températures ont été étudiées séparément pour les températures du flanc et de l'abdomen. La durée de chacune de ces périodes a été incluse dans l'analyse statistique qui suit afin de discriminer les individus ayant eu une récupération rapide (durée courte) de ceux n'ayant pas récupéré (durée totale de l'enregistrement). L'étude du métabolisme spécifique (MR pour "*metabolic rate*"; W.Kg^{-1}) a été faite à l'aide de deux LMM, une pour les T_{abd} et une pour les T_{flc} , incluant chacune les individus comme facteurs aléatoires et la période (*recovery* ou *normothermie*), la durée de mesure, la température initiale du tissu, l'état nutritionnel et la durée depuis le dernier repas comme facteurs indépendants. La durée depuis le dernier repas a été incluse car ce facteur peut être un indice de l'état physiologique (*e.g.* à jeun, en

digestion ou post-digestif) mais également de la condition corporelle avec les individus ayant été nourris récemment plus lourds que les individus à jeun. La masse ne variant pas en fonction de la période considérée (*recovery* ou *normothermie*) tandis que le taux métabolique lui évolue et étant colinéaire à la durée depuis le dernier repas, cette dernière n'a pas été considérée dans les LMM. Enfin, une LMM sera faite afin d'étudier le MR en fonction de la période, du tissu (flanc et abdomen) et de l'interaction entre ces deux facteurs incluant les individus comme facteur aléatoire. Les analyses statistiques ont été effectuées sous JMP® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Résultats

La réaugmentation des 4 tissus est visible dès la première mesure après la sortie de l'eau (11 minutes ; Figure 2). La température moyenne du flanc ($P < 0.0001$), du dos ($P = 0.0004$), de la plaque incubatrice ($P < 0.0001$) et de l'abdomen ($P < 0.0001$) sont significativement corrélés au temps de récupération (Figure 2). Chacun de ces tissus augmentent à mesure que le temps de récupération passe. L'état nutritionnel n'a pas d'effet sur la récupération de T_{flc} et de T_{dos} ($P > 0.05$), et nous pouvons noter, qu'après 22 minutes de temps de récupération, les deux tissus sont de retour à normothermie. Cependant, l'état nutritionnel et l'interaction entre l'état nutritionnel et le temps de récupération ont un effet significatif sur les températures de la plaque incubatrice et de l'abdomen. En effet, la plaque incubatrice augmente plus rapidement chez les individus nourris que chez les individus à jeun (Temps de récupération x état nutritionnel : $P = 0.01$; $R^2 = 0.81$), avec une augmentation moyenne de 8.72°C pour les individus nourris comparée à une augmentation moyenne de 4.29°C chez les individus à jeun pour le même temps de récupération (*i.e.* 121 minutes). De même pour la cavité abdominale, les individus nourris augmentent la température abdominale de 5.94°C contre 0.35°C pour les individus à jeun pour la même durée de mesure (Temps de récupération x état nutritionnel : $P < 0.0001$; $R^2 = 0.88$).

Nous observons également qu'un gradient inverse de température se met en place chez les individus à jeun (Figure 3A) tandis que ce dernier s'accroît avec la durée de récupération pour les individus nourris (Figure 3B). En effet, de part une augmentation plus rapide du flanc par rapport à l'abdomen chez les individus à jeun, la température de périphérie est supérieure à la température interne dès la minute 11 de récupération (Figure 3A). Chez les individus nourris, bien que le gradient inverse soit déjà présent dans l'eau, on observe une accentuation forte de ce phénomène aux minutes 11 et 22 de récupération (Figure 3B).

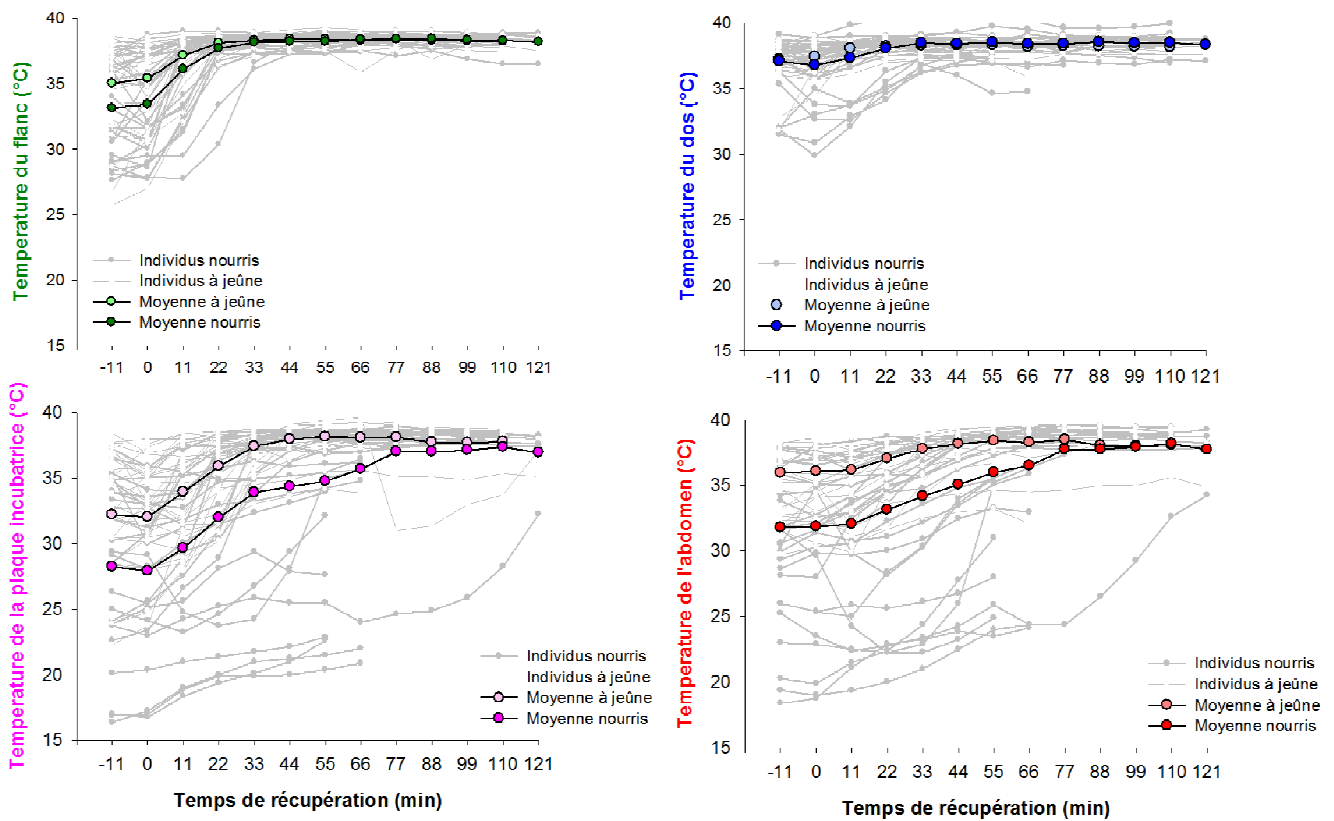


Figure 2 : Evolution des températures des 3 tissus périphériques, le flanc (vert), le dos (bleu), la plaque incubatrice et du tissu interne, l'abdomen (rouge). Les températures de chaque individus nourris (en gris) et à jeun (en blanc) ont permis de calculer la moyenne des températures toutes les 11 minutes pour les individus à jeun (couleurs claires) et les individus nourris (couleurs foncées) en période de récupération après une période prolongée en immersion dans l'eau froide

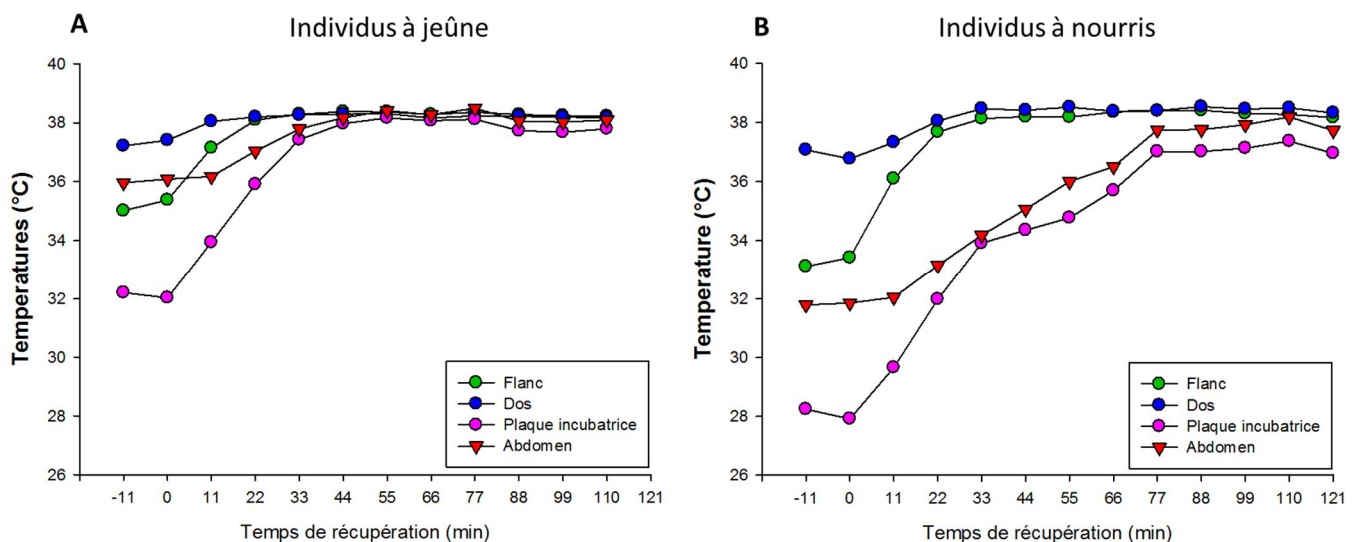


Figure 3 : Evolution des températures par groupe d'individus à jeun (A) et nourris (B) pour les quatre tissus durant la période de récupération de la normothermie à terre succédant la sortie de l'eau froide

Nous observons également qu'un gradient inverse de température se met en place chez les individus à jeun (Figure 3A) tandis que ce dernier s'accroît avec la durée de récupération pour les individus nourris (Figure 3B). En effet, de part une augmentation plus rapide du flanc par rapport à l'abdomen chez les individus à jeun, la température de périphérie est supérieure à la température interne dès la minute 11 de récupération (Figure 3A). Chez les individus nourris, bien que le gradient inverse soit déjà présent dans l'eau, on observe une accentuation forte de ce phénomène à la minute 11 et 22 de récupération (Figure 3B).

L'augmentation de la T_{abd} (DT_{abd}) durant les 22 premières minutes de récupération, retour à normothermie du flanc, n'est influencée ni par la masse ($P=0.18$), ni par l'état nutritionnel des individus ($P=0.72$). La DT_{abd} est significativement corrélée à la T_{abd} initiale ($P=0.01$; estimé : -0.22 ± 0.1). Ainsi plus la T_{abd} initiale sera faible plus la DT_{abd} sera importante. En revanche, on observe la relation inverse entre la DT_{abd} et la T_{flc} initiale ($P=0.002$; estimé : 0.29 ± 0.1). En effet, plus la T_{flc} initiale sera élevée plus la DT_{abd} sera importante (LMM ; $R^2=61$ N=50).

Le taux métabolique mesuré durant la durée de récupération dans la chambre métabolique ne varie pas en fonction de la réaugmentation de la T_{abd} ($P>0.05$) même si l'on constate une tendance plus élevée chez les individus ayant exprimé une augmentation de T_{abd} supérieure à 2°C (Figure 4). De plus, on remarque que les taux métaboliques obtenus sont similaires à ceux déjà mesurés dans la littérature (Figure 4).

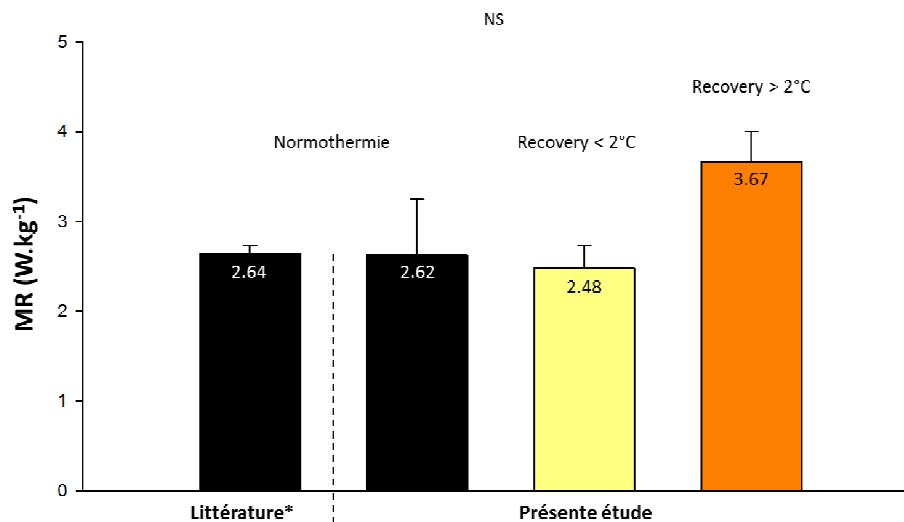


Figure 4 : Moyenne du métabolisme pour des individus de manchots royaux à normothermie mesurée dans la littérature (2.64 ± 0.10 ; N= 6 études), dans cette étude (2.62 ± 0.63 ; N=5 individus) et avec des individus montrant une récupération de la T_{abd} inférieure à 2°C ($2.48.67\pm 0.34$; N=9 individus) et supérieure à 2°C (3.67 ± 0.34 ; N=28 individus). Moyenne \pm s.e

* Le Maho et Despin 1976; Barré 1980; Froget et al. 2002; 2004; Fahlman et al. 2004; 2005

Le taux métabolique durant la récupération de la T_{flc} (moyenne marginale \pm s.e 4.31 ± 0.47 W.Kg⁻¹) est significativement supérieur à celui mesuré lorsque le flanc est maintenu à normothermie (moyenne marginale \pm s.e 2.94 ± 0.47 W.Kg⁻¹) ($P< 0.0075$; Table 1 ; Figure 5). De plus, il est à noter un effet

significatif de l'état nutritionnel avec un métabolisme plus élevé chez les individus nourris que à jeun (4.47 ± 0.47 et 2.78 ± 0.47 W.Kg⁻¹ respectivement ; moyenne marginale \pm s.e) et un effet de la durée depuis le dernier repas ainsi que de la température initiale du flanc (Table 1). En revanche, il n'y pas de relation entre le MR et la durée des périodes de récupération et de normothermie.

Le MR durant les périodes de récupération et de normothermie de la T_{abd} montre des résultats similaires à ceux obtenus avec le flanc. En effet, on observe un MR de récupération significativement supérieur à celui mesuré en normothermie (4.27 ± 0.57 et 3.16 ± 0.58 W.Kg⁻¹ respectivement ; moyenne marginale \pm s.e) ($P = 0.0072$; Table 1 ; Figure 5). On observe également un effet significatif de l'état nutritionnel avec les individus nourris montrant un métabolisme supérieur (4.27 ± 0.62 ; moyenne marginale \pm s.e) aux individus à jeun (2.70 ± 0.62 ; moyenne marginale \pm s.e) et un effet de la durée depuis le dernier repas (Table 1). De même, il n'y a pas d'effet significatif de la durée de mesure ni d'effet de la T_{abdo} initial sur le MR.

Tableau 1 : Estimé du modèle et du test statistique pour le modèle complet décrivant le taux métabolique spécifique en fonction de la période de récupération (*recovery*) ou de normothermie de la température du flanc (vert) et de l'abdomen (rouge) de manchots royaux mesurés à terre

	Taux métabolique			
	Température du flanc		Températures de la cavité abdominale	
	Estimate \pm s.e	P	Estimate \pm s.e	P
		R² = 61		R² = 0.30
Périodes (<i>Recovery</i> ou <i>Normothermie</i>)	-0.69 ± 0.24	0.008	-0.55 ± 0.2	0.007
Durée des périodes	-	NS	-	NS
Température initiale	-0.36 ± 0.1	<0.0001	-	NS
Etat nutritionnel (A jeûne ou Nourris)	-0.085 ± 0.3	0.005	-1.01 ± 0.3	0.003
Durée depuis de le dernier repas	0.88 ± 0.2	<0.0001	0.48 ± 0.2	0.019

Enfin, indépendamment du tissu considéré (LMM ; Tissu $P=0.40$), le MR de récupération est significativement supérieur que le MR de normothermie (Période $P=0.0003$; LMM $R^2=0.30$ $N=134$; Figure 5).

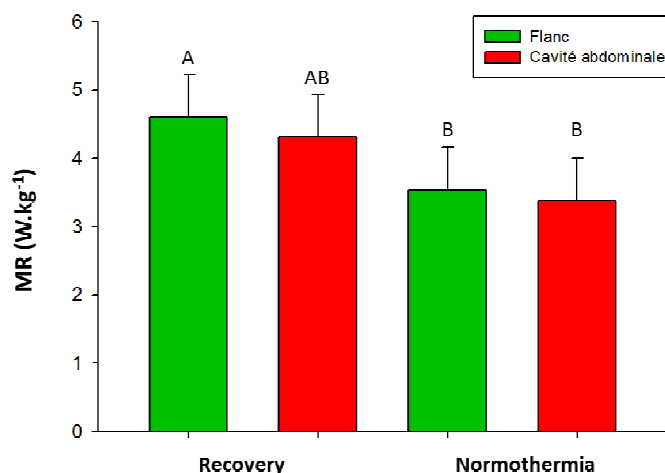


Figure 5 : Métabolisme spécifique en fonction de la température du flanc (vert) ou de l'abdomen (rouge) utilisé pour déterminer la durée de la période de récupération ou de maintien du tissu à normothermie. *Post-hoc* HSD Tukey de l'interaction significative Période x Tissu. Une différence de lettre indique une différence significative entre deux taux métaboliques spécifiques

Discussion

Les résultats de cette étude s'accordent aux résultats obtenus lors des précédentes études (Fahlman et al. 2005; Halsey et al. 2008). En revanche, les investigations plus poussées de notre étude ne soutiennent pas les hypothèses précédemment énoncées et permettent d'aller plus loin dans la compréhension de l'évolution des températures au cours du réchauffement après une période d'hypothermie.

Températures corporelles

Tout d'abord, comme déjà observé dans la littérature (Halsey et al. 2008), nous notons un effet de l'état nutritionnel sur la vitesse de récupération. Quelle que soit l'analyse statistique effectuée (*e.g.* Figure 2), la récupération de la normothermie est plus rapide chez les individus nourris comparativement aux individus à jeun. En revanche, cet effet est visible uniquement au niveau de l'abdomen et de la plaque incubatrice et il ne semble pas y avoir d'effet sur les températures du flanc et du dos (Figure 2). Bien que ces résultats semblent s'enligner avec les hypothèses précédemment énoncées, la mesure des températures périphériques de cette étude ne soutiennent pas ces hypothèses. En effet, on observe, indifféremment de l'état nutritionnel, une réaugmentation de toutes les températures y compris des températures périphériques qui réaugmentent même plus rapidement que les températures de l'abdomen (Figure 3). Ces premières données vont à l'encontre de notre hypothèse basée sur une vasoconstriction périphérique des individus nourris comparativement aux individus à jeun. De plus, l'établissement d'un gradient inverse dès la minute 11 de récupération, avec des températures périphériques supérieures à la température de l'abdomen, semble de prime abord contre-intuitif. Selon le principe de thermorégulation, un gradient naturel de températures allant de la température interne la plus chaude vers des températures périphériques (*e.g.* la peau, les membres) plus faibles est établie chez les espèces endothermes afin de limiter les pertes de chaleur. Cependant, il est à noter que la récupération des températures dans cette étude s'effectue au sein de la zone de thermoneutralité du manchot royal (Froget et al. 2002). Ainsi, nous pouvons supposer que l'augmentation des températures périphériques à terre dans ces conditions, n'induit pas de pertes de chaleur conséquentes pour les individus.

Il semble que l'évolution de la température de l'abdomen dépende de la température périphérique du flanc. En effet, alors que plus la T_{abd} initiale est faible plus la DT_{abd} est importante, on remarque la relation inverse avec la T_{flc} initiale. Ainsi, une faible température initiale de l'abdomen et une haute température initiale du flanc induisent une augmentation de l'abdomen plus importante. Il a été suggéré que l'utilisation de fenêtres thermiques au niveau de la périphérie du tronc chez les phoques pouvait permettre de faciliter la thermorégulation des individus au sortir de l'eau (Mauck et al. 2007). Cette suggestion pourrait également s'appliquer chez le manchot royal avec l'utilisation du tissu sous-cutané du flanc comme fenêtre thermique. En effet, la perfusion sanguine de ces zones périphériques permet une dissipation de la chaleur et donc pourrait permettre d'éviter une surélévation des températures internes lors de la production de chaleur. De plus, de façon surprenante, la masse des individus n'a pas

d'effet sur la réaugmentation des températures de l'abdomen durant les 22 minutes de récupération. Or, les individus plus lourds, possiblement plus gras et donc mieux isolés, auraient pu présenter une augmentation plus rapide des températures de l'abdomen. Cette absence d'effet de la masse pourrait provenir d'une condition corporelle similaire chez les individus mesurés avec notamment aucune différence significative entre la masse des individus à jeun et nourris. Ainsi, la récupération des températures au sein de la zone de thermoneutralité ne semble pas être affectée par les mêmes facteurs qu'en présence d'un environnement induisant des pertes de chaleur conséquentes.

Métabolisme de récupération

Quel que soit le tissu considéré pour délimiter la durée de récupération et la durée de normothermie, on observe un taux métabolique plus élevé durant la récupération des températures que durant leur maintien à normothermie (Figure 5). Ce résultat supporte l'idée d'une production de chaleur active et couteuse lors de la réaugmentation des températures tandis qu'au sein de leur zone de thermoneutralité, les individus n'assument pas de coûts de thermorégulation à maintenir leur température corporelle à normothermie.

Le métabolisme de récupération supérieur chez les individus nourris comparativement aux individus à jeun est en accord avec les mesures de métabolismes précédemment effectués à terre chez cette espèce (Halsey et al. 2008). Cependant des relations inverses ont également été mises en évidence chez le manchot royal (Fahlman et al. 2005). De plus, bien que le métabolisme varie en fonction de l'état nutritionnel, on observe une relation positive entre le métabolisme et la durée du jeûne qui va à l'opposé de l'effet de l'état nutritionnel (Table 1). L'augmentation du métabolisme avec la durée du jeûne pourrait venir d'un effet de la diminution de la masse corporelle des individus qui n'a pas été incluse dans cette analyse pour des raisons statistiques. En effet, la réduction du tissu adipeux allant de pair avec une perte de masse et donc de l'isolation pourrait conduire à des pertes de chaleur plus importantes et donc à un métabolisme plus élevé. Cet effet pourrait subvenir au sein des individus à jeun alors que les individus nourris ont un métabolisme en moyenne plus élevé.

La substitution de la production de chaleur au coût de thermorégulation intervient dans des conditions précises telles qu'un environnement contraignant induisant de forte perte de chaleur (*e.g.* eau froide) (Humphries et Carreau 2011). Or, nous n'observons pas de substitution de chaleur par digestion (*i.e.* SDA) chez les individus nourris qui présentent un métabolisme de récupération supérieure aux individus à jeun. Ainsi il est possible qu'en condition de thermoneutralité, les coûts de thermorégulation ne soient pas assez importants pour constater de la SDA et que le métabolisme supérieur des individus nourris soit dû à l'activité de digestion. Une autre hypothèse est que les températures initiales inférieures des individus nourris comparées aux individus à jeun (Figure 2 et 3) induisent des coûts de récupération plus élevés. De plus, de par la capacité de cette espèce à pouvoir ralentir son activité de digestion en période

de reproduction (Gauthier-clerc et. 2000), les phases digestives et post-digestives restent difficiles à délimiter avec précision.

Enfin, bien que la dynamique de réaugmentation des tissus durant la récupération des températures après une période d'hypothermie induise un gradient inverse, la mesure des individus au sein de leur zone de thermoneutralité crée des conditions environnementales neutres aux pertes de chaleur. Ainsi, on constate que malgré l'augmentation rapide des températures périphériques, la température de l'abdomen augmente également simultanément jusqu'à atteindre la normothermie. L'intérêt de la reperfusion du tissu périphérique chez le manchot royal a fait l'objet de plusieurs études récentes (Lewden et al. 2017b, *soumis*) suggérant la mobilisation des ressources énergétiques durant les périodes de jeûne et la reconstitution des réserves durant les périodes post-absorptives. La réaugmentation rapide du tissu adipeux sous-cutané observée dans cette étude soutient ces suggestions avec des individus nourris stockant le produit de la digestion alors que le coût de la récupération des températures à normothermie (*i.e.* métabolisme de récupération) suggère une mobilisation des réserves énergétiques chez les individus à jeun. De plus, il a également été suggéré chez d'autres espèces marines, l'utilisation de la perfusion périphérique afin de mieux réguler les échanges de flux thermiques en période de réaugmentation des températures (Mauck et al. 2003). Ainsi, afin de mieux comprendre les enjeux thermiques de la réaugmentation des tissus périphériques, sans les processus physiologiques de mobilisations et/ou de stockages des réserves énergétiques, il serait pertinent d'étudier la récupération de tissus ne contenant pas de réserves lipidiques tels que les ailerons et les pattes.

Références:

- Bullard, R. W. and Rapp, G. M.** (1970). Problems of body heat loss in water immersion. *Aerosp. Med.* **41**, 1269-1277.
- Charrassin, J.-B., Bost, C. A., Pütz, K., Lage, J., Dahier, T., Zorn, T. and Le Maho, Y.** (1998). Foraging strategies of incubating and brooding king penguins *Aptenodytes patagonicus*. *Oecologia* **114**, 194-201.
- Culik, B. and Wilson, R. P.** (1991). Energetics of under-water swimming in Adelie Penguins (*Pygoscelis Adeliae*). *J. Comp. Physiol. B-Biochemical Syst. Environ. Physiol.* **161**, 285-291.
- Dejours, P.** (1987). Water and air physical characteristics and their physiological consequences. In *Comparative Physiology: Life in Water and on Land* (ed. P. Dejours, L. Bolis, C. R. Taylor and E. R. Weibel), pp. 3-11. Berlin: Springer Verlag.
- Gagge, A.P. and Nishi, Y.** (1977). Heat exchange between human skin surface and thermal environment. In: *Handbook of Physiology: Reactions to Environmental Agents*, edited by Lee DHK, Falk HL, and Murphy SD. Bethesda: American Physiological Society. pp. 69-92.
- Gauthier-clerc, M., Le Maho, Y., Clerquin, Y., Drault, S., Griffin, T. M. and Kram, R.** (2000). Penguin fathers preserve food for their chicks. *Nature* **408**, 928-929.
- Fahlman, A., Schmidt, A., Handrich, Y., Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (2005). Metabolism and thermoregulation during fasting in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*, in air and water. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, 670-679.
- Froget, G., Butler, P. J., Woakes, A.J., Fahlman, A., Kuntz, G., Le Maho, Y. and Handrich, Y.** (2004). Heart rate and energetics of free-ranging king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **207**, 3917-3926.
- Halsey, L. G., Handrich, Y., Rey, B., Fahlman, A., Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (2008). Recovery from swimming-induced hypothermia in king penguins: effects of nutritional condition. *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 434-41.
- Humphries, M. M. and Careau, V.** (2011). Heat for nothing or activity for free? Evidence and implications of activity-thermoregulatory heat substitution. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 419-31.
- Kooyman, G. L., Gentry, R. L., Bergman, W. P. and Hammel, H. T.** (1976). Heat loss in penguins during immersion and compression. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **54**, 75-80.
- Lewden, A., Enstipp, M.R., Picard, B., van Walssum, T. and Handrich, Y.** (2017b). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea: thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Physiol.* **220**, 3084-3094.
- Lewden, A., Enstipp, M.R., Bonnet, B., Bost, C., Georges, J.Y. and Handrich, Y.** Thermal strategies of king penguins during prolonged fasting in water. *Under review in J. Exp. Biol.*
- Mauck, B., Bilgmann, K., Jones, D. D., Eysel, U., Dehnhardt, G., Zoologie, A., Bochum, R., Bochum, D., Tierphysiologie, I., Köln, U. and al.** (2003). Thermal windows on the trunk of hauled-out seals : hot spots for thermoregulatory evaporation ? *J. Exp. Biol.* **206**, 1727-1738.
- Ponganis, P. J., Van Dam, R. P., Knower, T. and Levenson, D. H.** (2001). Temperature regulation in emperor penguins foraging under sea ice. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **129**, 811-820.

- Ponganis, P.J.** (2015). Diving physiology in marine mammals and seabirds. Cambridge university press.
- Scholander, P.F.** (1940). Experimental investigations on the respiratory function in diving mammals and birds. Hvalrad- ets Skrifter **22**, 1-131.
- Stahel, C. D. and Nicol, S. C.** (1982). Temperature regulation in the little penguin, *Eudyptula minor*, in air and water. J. Comp. Physiol. B **148**, 93-100.

VII

Chapitre 4

Lewden, A., Bonnet, B., Chauvet, F., McCafferty, D. and Handrich, Y. (2017).
Dynamique de la réaugmentation des températures corporelles chez le manchot royal. *En préparation pour Journal of Thermal Biology*



Dynamique de la réaugmentation des températures corporelles chez le manchot royal

En préparation

Agnès Lewden¹

Batshéva Bonnet¹

Florent Chauvet¹

Dominic J. McCafferty^{2*}

Yves Handrich^{1*}

¹ Université de Strasbourg, CNRS, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France.

² The Scottish Centre for Ecology and the Natural Environment, Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Rowardennan, Glasgow, G63 0AW, Scotland, UK.

Author correspondence: agneslewden@gmail.fr

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à cette étude

Résumé

Les espèces marines des régions subantarctiques passent la majeure partie de leur vie d'adulte dans les eaux froides de ces régions polaires. L'isolation des individus est primordiale pour réduire les pertes de chaleur et ainsi limiter les coûts de thermorégulation. Cependant les membres, tels que les nageoires et les ailerons, demeurent des zones faiblement isolées qui contribuent aux pertes de chaleur de l'organisme dans l'eau. D'un autre côté, lors du retour à terre, plusieurs espèces de mammifères marins utilisent ces larges surfaces, qualifiées de "fenêtres thermiques", à des fins de thermorégulation dans le but d'éviter des épisodes d'hyperthermie.

L'objectif premier de notre étude est d'étudier l'utilisation des fenêtres thermiques, en l'occurrence les ailerons et les pieds, lors du retour à terre des manchots royaux à l'aide d'une caméra thermique. Cette étude sera réalisée à la fois sur des oiseaux en liberté dans la colonie et sur des oiseaux captifs. En effet, en condition expérimentale, la réaugmentation de la température des membres sera étudiée en fonction de la température interne avec d'une part des individus ayant une température interne basse (expérience A) et d'autre part des individus ayant une température interne à normothermie (expérience B).

Les résultats montrent une plus forte augmentation de la température des fenêtres thermiques (*i.e.* aileron) lors de l'expérience A que lors de l'expérience B. On note, également, que plus la température initiale de l'aileron est faible plus cette température va augmenter alors que l'on observe la relation inverse pour le pied. En condition naturelle, l'œil est le premier tissu à ré-atteindre la normothermie tandis que la température des fenêtres thermiques augmente durant toute la durée de l'enregistrement (environ 30 minutes). Enfin, bien que nous ayons mesuré des schémas similaires d'augmentation des températures en condition naturelle et expérimentale, on observe une récupération plus rapide en condition expérimentale qu'en colonie.

L'utilisation des fenêtres thermiques, indépendantes de la température interne, semble indiquer un recours systématique de ces dernières au moment de la sortie de l'eau. De plus, l'augmentation désynchronisée des températures de l'aileron et du pied suggère des rôles différents dans la récupération de la normothermie. Cette réaugmentation des températures, s'opérant dans des tissus ne contenant pas de réserves lipidiques, soutient l'hypothèse de l'utilisation de ces zones faiblement isolées à des fins de thermorégulation.

Mots clés : Thermorégulation – Vasodilatation périphérique – Normothermie – Fenêtres thermique – Imagerie thermique

Introduction

Les espèces marines endothermes doivent faire face à des pertes de chaleurs considérables dues à la forte conductivité thermique et capacité calorifique du milieu marin comparé au milieu aérien (Dejours 1987 ; Nadel 1984). Ainsi les endothermes dans l'eau, maintenant un gradient de température élevé entre la surface du corps et leur environnement, font face à des coûts de thermorégulation importants afin de maintenir leur balance énergétique stable (Culik et al. 1994; Luna-Jorquera et Culik 2000). Une autre stratégie de maintien des températures est la limitation des pertes de chaleur par une isolation efficace réduisant ces dernières. Ainsi, l'isolation fournie par l'épaisseur de graisse sous-cutanée réduit les pertes de chaleur par conductance tandis que les systèmes de contre-courants vasculaires aux niveaux des membres vont permettre de prévenir des pertes excessives par convection du centre du corps vers la périphérie (Pabst et al. 1999; Williams et Worthy 2002). Les différentes espèces de manchots conservent leur chaleur grâce à des adaptations morphologiques et physiologiques leur permettant d'affronter des conditions froides aussi bien dans l'eau que dans l'air (Kooyman et al. 1976). En effet, ces espèces sont recouvertes d'un plumage de faible conductivité (Dawson et al. 1999) composé de plusieurs types de plumes (Williams et al. 2015) imbriquées les unes aux autres constituant une couverture imperméable hautement qualifiée à son environnement aquatique qui est l'eau froide (Pap et al. 2016). De plus, la présence de systèmes d'échangeurs de chaleur à contre-courant à travers un réseau artério-veineux au niveau du cou, des pattes mais également des ailerons a également été identifiée chez ces espèces (Thomas et Fordyce 2007; 2012; McCafferty et al. 2013).

Les membres des espèces marines sont les zones les moins bien isolées du corps. Elles peuvent représenter des pertes de chaleur totale de 8 à 28% d'après un modèle réalisé sur des espèces de phoques et de baleines (Ryg et al. 1993). Ainsi, il a été montré chez des jeunes phoques que les pertes de chaleur en vasoconstriction au niveau des nageoires représentent entre 2 et 6% des pertes totales du corps dans une eau 0°C tandis que dans une eau à 24°C, sans vasoconstriction, ces pertes de chaleur augmentent entre 19 et 48% (Kvadsheim et Folkow 1997). Cette étude illustre l'importance de la régulation des flux sanguins selon les conditions environnementales.

D'un autre côté, il a également été suggéré que ces pertes de chaleur peuvent permettre d'éviter des épisodes d'hyperthermies, parfois rencontrés lors du retour à terre des espèces (Watts 1992). Les zones nues ou faiblement isolées telles que les membres, ont alors été qualifiées de "fenêtres thermiques" utiles pour maintenir des échanges de flux thermiques avec l'environnement par l'augmentation des flux sanguins au niveau de ces tissus périphériques (e.g. Klir et Heath 1992; Williams, 1990). L'utilisation de ce terme a ainsi largement été faite pour les espèces de mammifères marins (Noren et al. 1999; Meagher et al. 2002) et sera utilisée dans cette étude pour la première fois pour le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*).

Les ailerons des manchots représentent une large surface disponible aux échanges de chaleur (Boyd et Croxall 1996). Ne contenant pas de tissus adipeux sous cutanés, ces derniers ne sont que faiblement isolés tandis qu'un système de contre-courant permet de réguler les échanges de chaleur par flux sanguin (Thomas et Fordyce 2012). Il semble d'ailleurs que ce système de contre-courant soit à l'origine de la colonisation des eaux froides subantarctiques par les manchots (Thomas et Fordyce 2007). Ce système peut en effet instaurer un gradient de températures pouvant aller jusqu'à 30°C de différence entre l'épaule et l'extrémité de l'aileron (Prevost et Sapin-Jaloustr 1964; Ponganis et al. 2003). De plus, il a récemment été mesuré qu'au retour à terre après un séjour dans l'eau froide, et indépendamment des températures internes, les individus de manchots royaux augmentaient en deçà de 10 minutes la température du tissu adipeux sous-cutané du tronc (Lewden et al. *in prep.*). Bien que cette observation puisse suggérer, comme précédemment observé chez trois espèces de phoques (Mauck et al. 2003), l'utilisation de fenêtres thermiques lors du retour à terre, l'hypothèse de processus physiologique a également été mise en avant chez cette espèce. En effet, en tant que lieu principal de stockage des réserves énergétiques (Cherel et al. 1993), la perfusion du tissu adipeux a donné lieu à l'hypothèse du remaniement des réserves énergétiques (*i.e.* mobilisation ou stockage) pour expliquer la réaugmentation des températures périphériques (Lewden et al. 2017b, *soumis et in prep.*)

L'objectif de cette recherche est d'étudier l'évolution des températures des fenêtres thermiques du manchot royal lors de son retour à terre. Les membres des manchots étant dépourvus de tissu adipeux, le rétablissement du flux sanguin aux niveaux des ailerons et des pattes, s'il a lieu, serait indépendant de la présence de réserves lipidiques. De plus, possédant des échangeurs de chaleur vasculaires, les températures de ces extrémités sont flexibles et peuvent être maintenues à basses températures durant de longues périodes lors des séjours en mer (Fahlman 2004). Enfin, la présence du système vasculaire sous-cutané influence fortement la température de surface et reflète donc les ajustements de la circulation sanguine sous-jacente (Tattersall et al. 2009; Weissenbock et al. 2010; McCafferty et al. 2011). Ainsi l'imagerie thermique, une méthode non-invasive de mesure des températures, va permettre d'étudier, d'une part, l'utilisation des fenêtres thermiques sur des individus non soumis au stress de la manipulation. En effet, des études ont montré la variation de flux sanguins périphériques en réponse à différents stress dont celui de la capture et de la manipulation humaine (*e.g.* Herborn et al. 2015; Jerem et al. 2015). D'autre part, les températures des fenêtres thermiques seront également étudiées en environnement standardisé et en fonction de la température interne chez des individus en conditions expérimentales.

Matériel & Méthodes

Les manchots royaux ont été étudiés dans leur environnement naturel sur l'île de Possession de l'archipel de Crozet (46°25' S, 51°45' E) de Novembre à Janvier durant deux années consécutives (Année 1 : 2015/16 et 2016/17) en Baie du Marin. Les expériences ont été conduites à proximité de la colonie

d'approximativement 16 000 couples (Delord et al. 2004) et avec l'approbation du comité éthique APAFIS (N°0201504XX) et du comité d'environnement polaire (N° 2013-76, 2014-121). Les individus ont été capturés durant la phase d'appariement de leur cycle de reproduction et maintenus en captivité pour une durée maximale de deux heures (Année 1 = 01:04 ± 00:01 heure, Année 2= 02:01 ± 00:13 heures ; moyenne ±s.d).

Protocole expérimentale

La sortie de l'eau des individus correspond au lancement du chronomètre et donc au temps $t=0$ de l'expérience. Une première photo thermique est prise à la sortie des individus afin de s'assurer préliminairement d'une vasoconstriction périphérique visible au niveau des membres des individus (Figure 1).

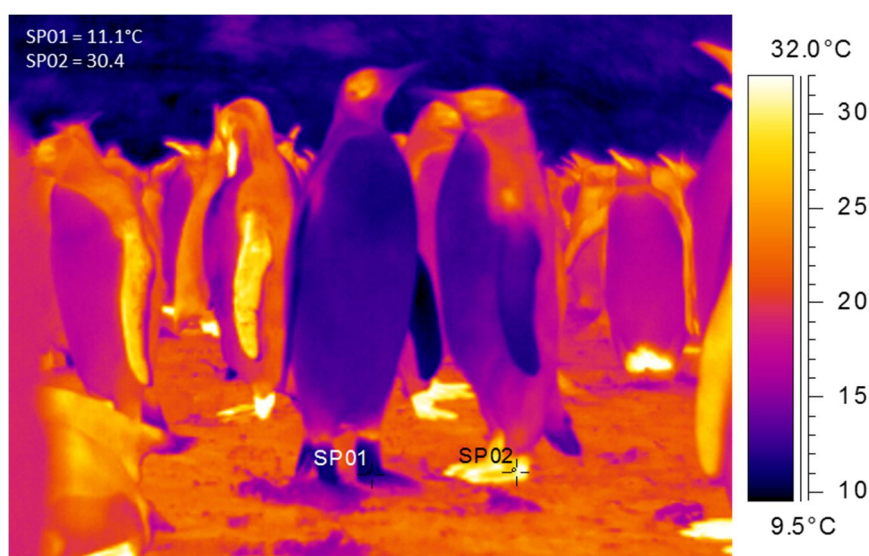


Figure 1 : Image thermique de deux manchots royaux se tenant dans la colonie montrant la différence d'état de perfusion périphérique du pied. L'oiseau avec une faible température du pied est récemment sorti de l'eau (à gauche) tandis que le second oiseau (à droite) déjà présent sur la colonie présente une température du pied relativement élevée

Suite à cette sortie, les individus ont été capturés et immédiatement transférés dans le studio photographique à proximité en moins de 2 minutes (Année 1: 02:04 ± 00:26 minutes et Année 2: 02:32 ± 00:18 minutes). Le studio photographique a permis la prise de photo thermique en conditions standardisées en excluant les radiations solaires et procurant un angle et une distance de prise de vue uniforme. Lors de la capture, les manchots ont été équipés d'une cagoule afin de réduire le stress induit par la captivité (Cockrem et al. 2008). Les images thermiques des pieds et des ailerons ont été prises manuellement tout au long de l'expérience à l'aide d'une caméra thermique (ThermaCAM™ P25, gamme de mesure : 0.08°C à 30°C ; FLIR SYSTEMS). Le niveau d'activité moyen durant toute la durée de l'expérience a été évalué à l'aide d'un indice de comportement allant de 1 (correspondant à un individu calme) à 5 (correspondant à un individu très agité, essayant continuellement de s'échapper). En raison de la cagoule, la température des yeux et du bec, des températures fréquemment utilisées chez les oiseaux (e.g. Jerem et al. 2015; van de Ven et al. 2016), n'ont pas pu être mesurées. En revanche la

corrélation entre ces deux températures et la température des ailerons a été établie préalablement chez un individu mesuré durant 5 jours consécutifs en récupération après une période dans l'eau froide en condition expérimentale (voir résultats et matériel supplémentaire 1). Les photos thermiques ont été systématiquement prises sur l'aileron et le pied droit de tous les individus. Les ailerons droits ont été écartés du corps pour chaque prise de vue, afin de visualiser la vascularisation de la face interne, sans appliquer de pression sur la peau.

Expérience A : Effet de la variation de la température interne sur la température périphérique

La première année, un total de 24 individus a été ramené en studio photographique et les photos thermiques du pied droit et de l'aileron droit ont été prises à intervalle de temps régulier sur une durée de récupération de $06:25 \pm 01:13$ minutes. La seconde année, un total de 16 individus a été ramené en studio photographique, dans les mêmes conditions que la première année. Cependant, après la première photo thermique, les individus ont été équipés d'un thermomètre inséré dans le cloaque. Ainsi, la température cloacale a été notée simultanément à la prise des photos thermiques sur un temps de récupération totale de $21:15 \pm 02:43$ minutes

Expérience B : Récupération des températures périphériques sans variation de la température interne

La deuxième année, 14 des 16 individus ramenés en studio photographique ont été maintenus en captivité dans un enclos extérieur (à thermoneutralité; Froget et al. 2002; Fahlman et al. 2004) pour une durée de $01:08 \pm 00:09$ heures sans dérangement humain. Les individus ont ensuite été brièvement immergés dans un bac d'eau froide durant $04:03 \pm 00:43$ minutes afin d'induire une diminution des températures périphériques sans impacter les températures internes. Ainsi, la température cloacale n'est pas significativement différente avant et après cette l'immersion ($37.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$ versus $37.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$, respectivement Student's t-test; $p=0.800$), de même que la température du pied ($15.80 \pm 6.4^\circ\text{C}$ et $10.65 \pm 2.1^\circ\text{C}$; Student's t-test; $p=0.315$), tandis que nous observons une diminution significative de la température de l'aileron de $16.2 \pm 3.9^\circ\text{C}$ avant l'immersion et de $11.0 \pm 2.5^\circ\text{C}$ après l'immersion (Student's t-test; $p=0.002$). Suite à la sortie de l'eau, les individus ont été immédiatement transférés au studio photographique pour la prise de photos thermiques du pied et de l'aileron et la mesure de la température cloacale (comme pour l'expérience A) durant une période totale de $20:59 \pm 01.31$ minutes de récupération. Pour finir, à la fin de l'expérience tous les individus ont été pesés et relâchés à l'endroit de leur capture dans la colonie.

Mesures en condition naturelle

Le suivi de l'évolution des températures périphériques en condition naturelle a été réalisé par la prise d'images thermiques d'oiseaux dès leur sortie de l'eau et durant une période moyenne (\pm s.d) de $14:32 \pm 08:16$ minutes (entre $02:46$ et $38:56$ minutes) de récupération à terre dans la colonie. Les images thermiques ont été prises le plus fréquemment possible quand les oiseaux étaient entièrement visibles

pour une moyenne de 22 ± 11 images thermiques par oiseaux (environ $1.6 \text{ images} \cdot \text{min}^{-1}$). Pour chaque individu, les conditions environnementales ont été mesurées durant toute la durée de leur suivi. Ainsi, la température ambiante et la température du sable ont été mesurées à l'aide de deux Ibuttons (iButton MXMDS1922L-F5; AVNET-MEMEC; résolution: $\pm 0.0625^\circ\text{C}$; gamme : $0\text{-}50^\circ\text{C}$; diamètre et épaisseur $17.35 \times 5.89 \text{ mm}$, mass 2.9 g, précision of $\pm 0.1^\circ\text{C}$) placés dans l'air et sous la surface du sable (fréquence d'enregistrement toutes les 2 minutes). L'humidité a été mesurée et le couvert nuageux a été estimé par le même observateur pour chaque suivi à l'aide d'une échelle préalablement définie.

Analyse des images thermiques

Les images thermiques ont été analysées à l'aide du logiciel ThermaCAMTM Researcher Pro 2.10 .En condition expérimentale, et donc dans le studio photographique procurant des conditions standardisées, les surfaces de l'aile et du pied ont été délimitées afin d'en extraire la valeur moyenne de température pour chaque image. En condition naturelle, la distance entre l'individu et l'observateur a été estimée par la taille de l'individu représenté par le nombre de pixels entre la tête et le bas du pied. Ainsi, plus le nombre de pixels était faible, plus l'individu était loin. De plus, la température maximale de la région oculaire, la température moyenne de l'aile et du pied ont été relevées pour chaque image thermique. Enfin, la température moyenne d'une aire constante au niveau du dos et du poitrail a également été relevée.

Analyses statistiques

La température et le changement de température (*i.e.* Température finale- température initiale) du cloaque, de l'aile et du pied ont été étudiées en fonction de l'expérience (expérience A ou B) par un modèle linéaire mixte (LMM) incluant l'identifiant de l'individu comme facteur aléatoire pour contrôler l'effet des mesures répétées. La température de l'aile et du pied a été étudiée séparément en conditions expérimentales à l'aide de deux LMM incluant toutes les deux le temps de récupération, la température initiale du tissu, l'expérience, la température cloacale nichée dans l'expérience et la température ambiante (T_a) comme facteurs indépendants ainsi que l'identifiant des individus comme facteur aléatoire. Enfin, le taux de récupération ($^\circ\text{C}/\text{min}$), correspondant aux changements de température divisé par le temps de récupération, a été analysé séparément pour l'aile et le pied par une LMM comportant l'identifiant des individus en facteur aléatoire, l'expérience, la T_a et le comportement (*i.e.* 1 à 5) comme facteurs indépendants.

Les mesures en condition naturelle des différentes parties du corps ont été étudiées selon la courbe d'ajustement moyenne de tous les individus ($N=24$) ajustée par une régression de Loess (Lissage=0.5 ; degré=2) pour chaque aire séparément. Nous avons étudié la variation des températures corporelles en fonction des conditions environnementales en utilisant une analyse en composante principale (PCA) pour ces deux facteurs. Ainsi, pour les températures corporelles la première composante de la PCA (PCA_c) a été extraite représentant les températures de l'œil, de l'aile et du pied tandis que la première

composante de la PCA des conditions environnementales (PCA_e) représente les variations de la T_a , de la température du sable, de l'humidité et de couvert nuageux. Par la suite, l'étude des variations des températures corporelles (PCA_c) en fonction des conditions environnementales (PCA_e), de la distance de l'individu et du temps de récupération a été faite par une LMM incluant l'identifiant des individus. Pour finir, les vitesses d'augmentations du pied et de l'aileon ont été analysées séparément par deux modèles identifiant l'effet des conditions de mesures (*i.e.* expérimentales ou naturelles) sur la réaugmentation des températures. En effet, les températures mesurées en conditions expérimentales durant l'expérience A seront comparées à celles prises en condition naturelle afin de comparer des individus ayant théoriquement une température interne similaire (*i.e.* sortie de l'eau froide).

La sélection de modèle s'est faite par "backward stepwise" c'est-à-dire débutant par le modèle complet, puis enlevant les facteurs non-significatifs du modèle les uns après les autres en commençant par les interactions. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel JMP® (SAS Institute Inc.). Les résultats sont présentés par la moyenne ou l'estimé \pm s.e sauf indication contraire.

Résultats

L'analyse préliminaire des températures de l'œil et du bec confirme une forte corrélation positive avec les températures de l'aileon (matériel supplémentaire 1). De plus, comme précédemment suggéré (Tattersall et al. 2009; Weissenbock et al. 2010; McCafferty et al. 2011), nous démontrons également une corrélation positive entre les températures mesurées au niveau des ailerons par thermographie infrarouge et sous la surface de la peau au niveau du tronc par un enregistreur de température (*i.e.* Ibutton ; matériel supplémentaire 1).

Les images thermiques prises en studio de photographie révèlent une vasodilatation périphérique évidente au niveau de l'aileon dans les 10 premières minutes après la sortie de l'eau (Figure 2A). Ce phénomène se confirme avec l'augmentation des températures en fonction du temps de récupération ($R^2=0.93$, $N=39$, $n=146$, $P<0.0001$) mais montre également une variation entre les individus (Figure 2B).

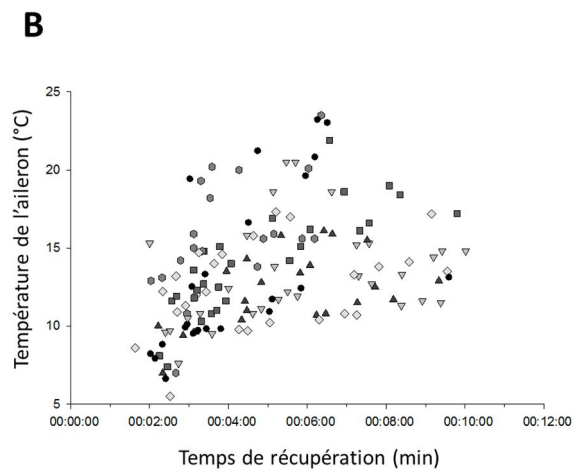
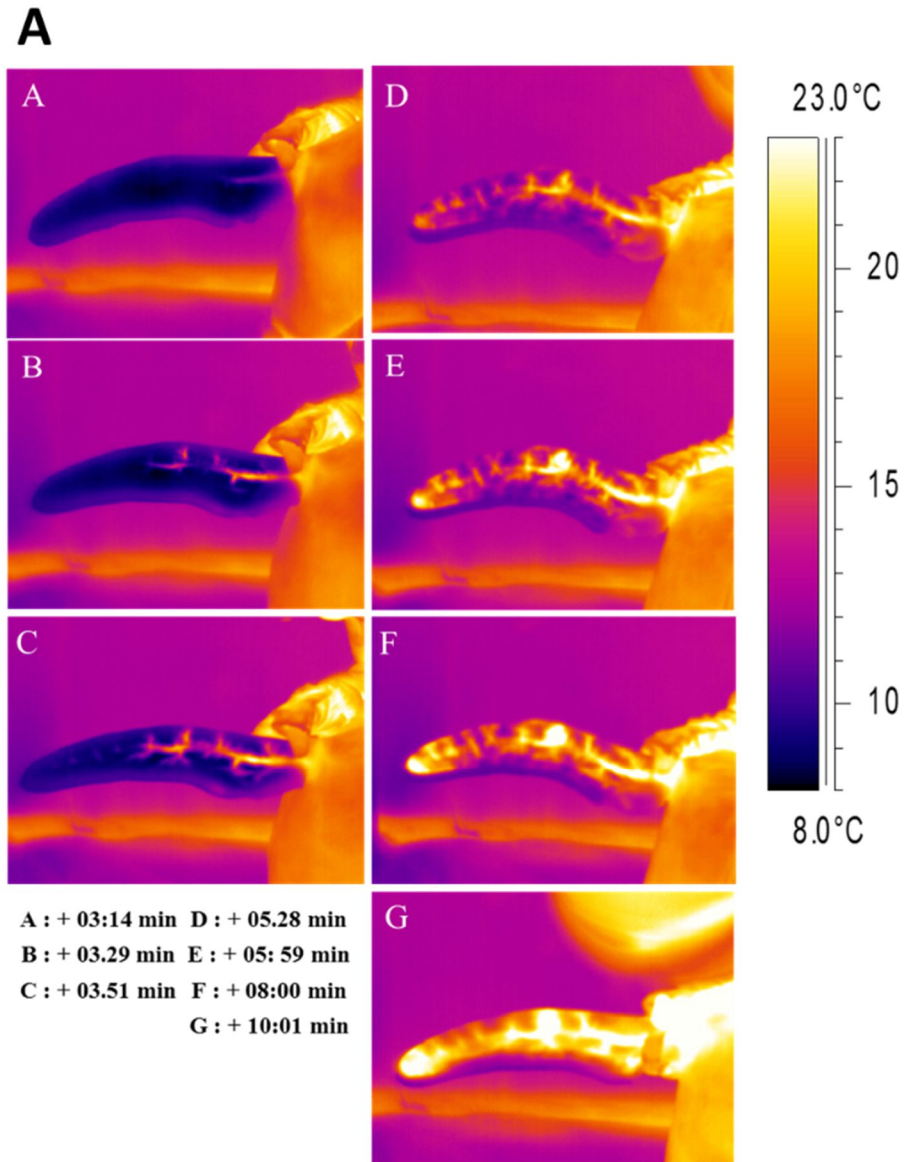


Figure 2 : Changement de température de l'aïlèron avec le temps de récupération depuis la sortie de l'eau observé par imagerie thermique (A) et exprimé par la température moyenne de l'aïlèron (B)

Les individus capturés immédiatement après la sortie de l'eau (expérience A) ont une température cloacale initiale plus basse (34.8 ± 0.50 °C) que les individus ayant été immergés peu de temps dans l'eau froide (37.2 ± 0.52 °C; expérience B) (LMM *Post-hoc* Student's t-test; $P=0.007$) (Figure 3A). La température initiale de l'aile est également plus basse durant l'expérience A (8.97 ± 0.9 °C) que durant l'expérience B (12.24 ± 0.92 °C) (LMM : $P=0.012$; Figure 3B), mais il n'y a pas de différence significative au niveau du pied entre les deux expériences (*Post-hoc* Student's t-test; $P=0.063$; Figure 3C). La température cloacale augmente durant l'expérience A (2.12 ± 0.37 °C) tandis qu'elle demeure stable durant l'expérience B (0.50 ± 0.38 °C) (LMM : $P=0.0042$; Figure 3D). La température augmente également au niveau de l'aile avec le temps durant les deux expériences mais augmente significativement plus durant l'expérience A (8.10 ± 1.1 °C) que durant l'expérience B (2.44 ± 1.1 °C) (LMM : $P=0.0018$; Figure 3E). Enfin, la température du pied augmente durant les deux expériences de façon similaire (5.51 ± 1.54 °C et 1.11 ± 1.5 °C respectivement durant l'expérience A et B) (LMM : $P=0.0667$; Figure 3F).

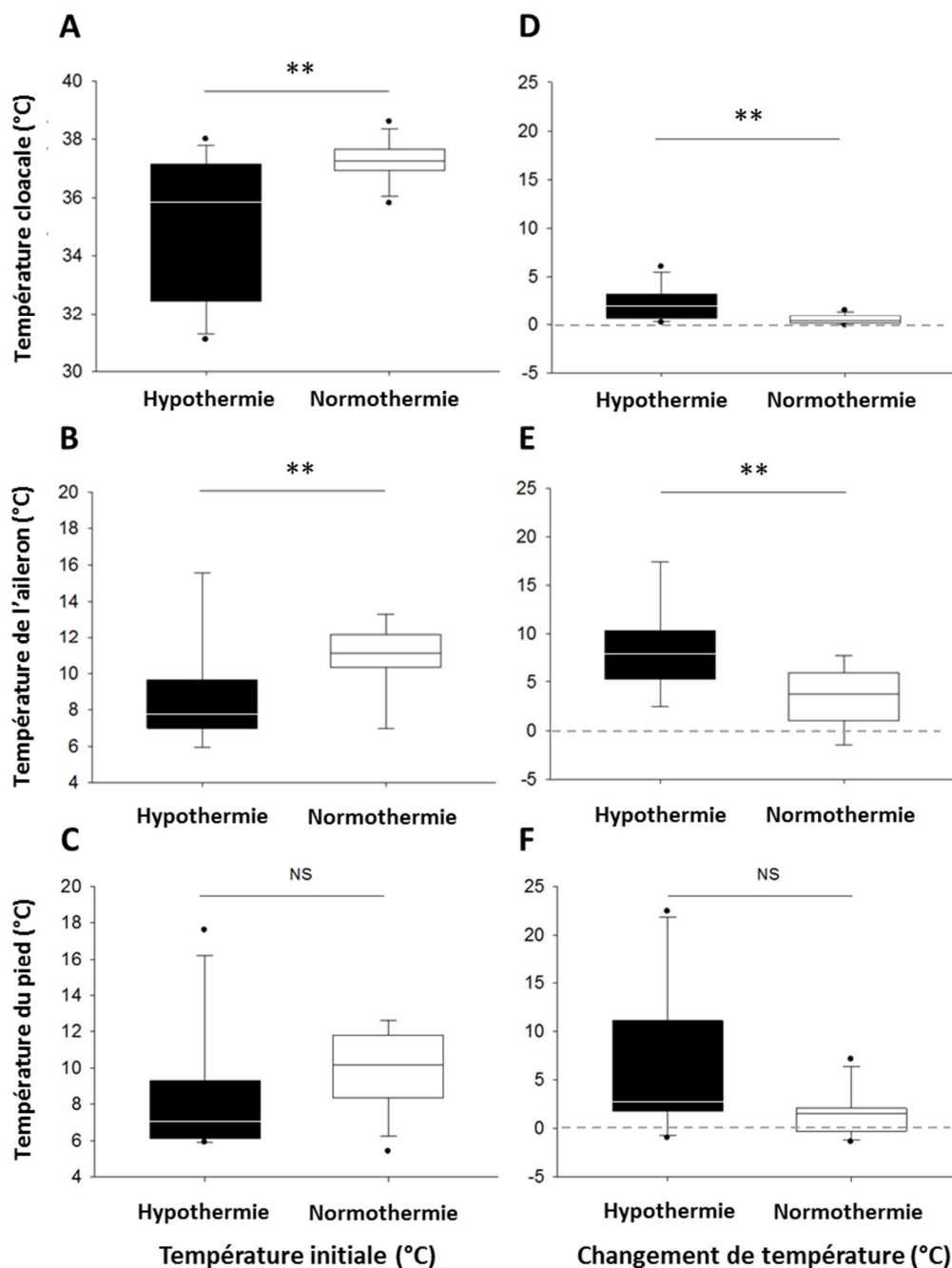


Figure 3 : Différence entre la température initiale et le changement de température entre l'expérience A – Hypothermie (boite noire) et l'expérience B – Normothermie (boite blanche) de la température cloacale (A, D), la température de l'aileeron (B, E) et du pied (C, F). Les boites montrent la médiane (ligne blanche et noire), le 1^{er} et le 3^{ème} quartile (partie supérieure et inférieure de la boite). Les moustaches s'étendent du 5th au 95th percentile. Les différences significatives sont estimées avec Post-hoc t-test. **: $P < 0.05$; NS: non-significant

La vasodilatation périphérique au niveau des ailerons, s'observe par l'augmentation de la température de surface (Figure 4A) qui atteint la même température finale stable durant l'expérience A ($16.00 \pm 3.77^\circ\text{C}$) et l'expérience B ($15.56 \pm 3.38^\circ\text{C}$) (moyenne \pm s.d). Cependant, la température moyenne observée durant la récupération des températures de l'expérience A ($16.95 \pm 0.66^\circ\text{C}$) est supérieure à celle mesurée durant l'expérience B ($12.84 \pm 0.55^\circ\text{C}$) (Post-hoc Student's t-test $p < 0.005$). De plus, on observe un effet positif de la température du cloaque sur l'évolution des températures de l'aileeron

(estimé de 0.88 et 1.38 respectivement durant l'expérience A et B ; Table 1). En effet, plus la température du cloaque sera élevée plus la température de l'aileron sera également élevée. Enfin, on remarque le même effet positif mais moins important de la température initiale de l'aileron (estimé de 0.25) sur les températures de récupération de l'aileron (Table 1).

Tableau 1 : Estimé du modèle et du test statistique pour les modèles décrivant les températures du flanc et du pied séparément en fonction des expériences expérimentales A et B de manchots à terre en récupération

	Température de l'aileron			Température du pied		
	R ² =69	n= 320	N=14	R ² = 86	n=127	N=14
	Estimate ± s.e.	t	prob> t	Estimate ± s.e.	t	prob> t
Temps de récupération	-0.002 ± 0.0003	-5.28	<0.0001***	-0.0019 ± 0.0008	-2.26	0.0257**
Température initiale	0.250 ± 0.080	3.12	0.0020 **	-0.6638 ± 0.2298	-2.89	0.0046***
Expérience (A)	2.1662 ± 0.4609	8.89	<0.0001***	2.1662 ± 0.4609	4.63	<0.0001***
Expérience A [température cloacale]	0.888 ± 0.128	7.89	<0.0001***	0.5323 ± 0.314	1.69	0.0935
Expérience B [température cloacale]	1.383 ± 0.352	3.92	0.0001***	1.2980 ± 0.5740	2.26	0.0257*
Ta	-	-	NS	6.4217 ± 0.797	8.92	<0.0001***

Même sans différence de la température initiale du pied entre l'expérience A et l'expérience B (Figure 3C), on observe un effet significatif des expériences avec la température du pied supérieure durant l'expérience A (13.25 ± 3.09°C) que durant l'expérience B (8.92 ± 3.13°C)(*Post-hoc* Student's t-test $p < 0.005$). Ainsi, la température du pied ne semble pas évoluer durant l'expérience B comparativement à l'expérience A (Figure 4B). De plus, on observe un effet positif de la température du cloaque et de façon surprenante un effet négatif de la température initiale du pied (Table 1). En effet, plus la température initiale du pied est élevée moins la température du pied augmente durant l'expérience.

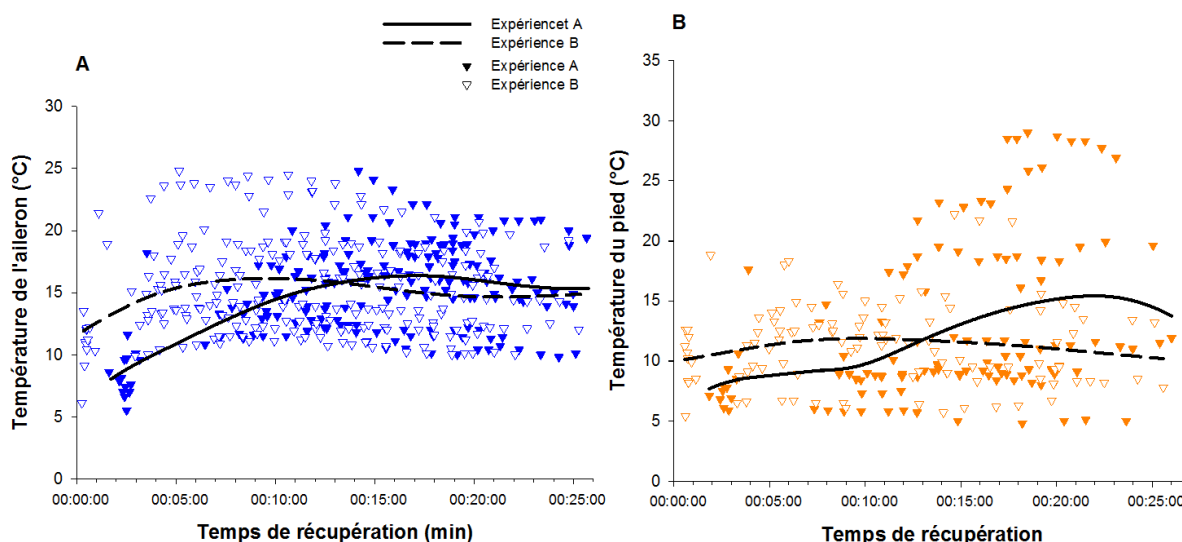


Figure 4 : Données brutes extraites de l'analyse des images thermiques pour l'aileron (bleu - A) et le pied (orange - B) présentées en fonction du temps de récupération. Les points pleins représentent les données de températures enregistrées durant l'expérience A et les points vides durant l'expérience B. Les lignes ont été ajustées par une régression de Loess (Lissage = 0.5 ; degré = 2) séparément pour l'expérience A (ligne noire) et pour l'expérience B (ligne pointillée)

On remarque que la température initiale du tissu n'a pas le même effet sur l'évolution des températures du pied et de l'aileron. En effet, le changement de la température de l'aileron diminue avec l'augmentation de la température initiale de l'aileron (LMM estimé, -1.76 ± 0.69 ; $P = 0.016$; Figure 5A)

tandis que le changement de température du pied augmente avec l'augmentation de la température initiale du pied (LMM estimé, 2.94 ± 0.19 ; $P < 0.0001$; Figure 5B). De plus, on note un effet significatif de l'expérience sur le changement de température de l'aileon (LMM : $P = 0.020$) (Figure 3B), alors que comme constaté précédemment (Figure 3C) il n'y pas d'effet de l'expérience sur le changement de température du pied (LMM : $P > 0.05$).

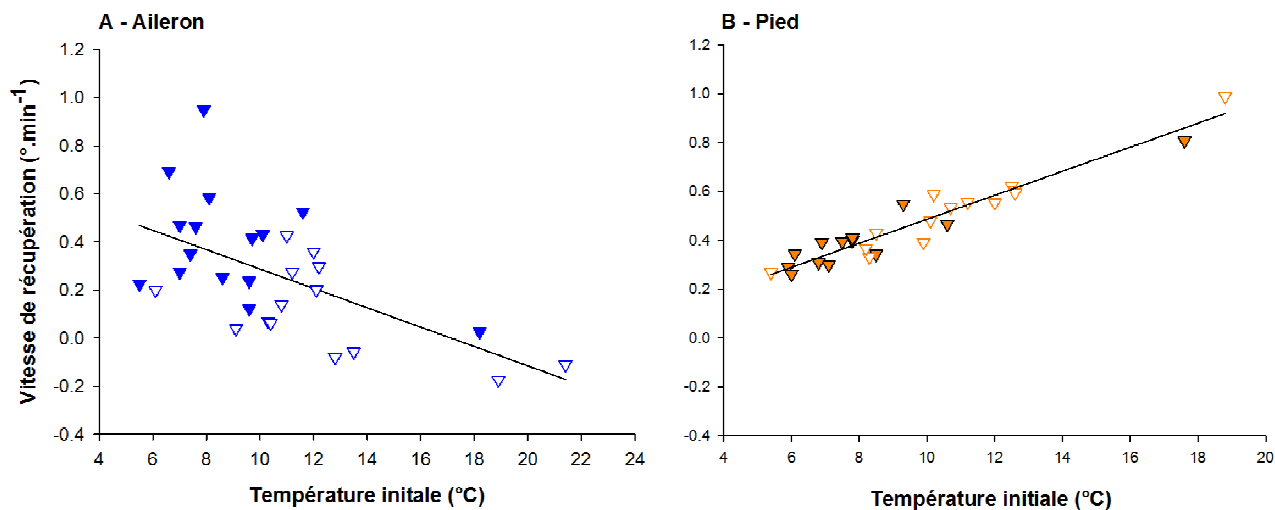


Figure 5 : Températures de récupération de l'aileon (bleu - A) et du pied (orange - B) en fonction de la température initiale. Les points pleins représentent les températures initiales durant l'expérience A et les points vides durant l'expérience B

Mesure en condition naturelle

Les oiseaux mesurés en condition naturelle montrent une augmentation des températures périphériques dès la sortie de l'eau avec une augmentation de la température des yeux plus rapide que les autres parties du corps (Figure 6). Cependant, on note que l'augmentation des températures du pied semble différer par rapport à l'augmentation rapide de l'aileon et de l'œil (Figure 6), avec une seconde partie de la courbe d'augmentation montrant une pente bien supérieure à celle de l'aileon.

Contrairement aux études précédentes, nous n'observons pas d'effet significatif de la distance des individus sur les températures mesurées ($P > 0.05$) mais un effet significatif du temps de récupération sur ces températures (estimé 0.001 ± 0.0001 ; $P < 0.0001$), avec une augmentation des températures plus le temps de récupération passe et un effet positif des conditions environnementales (estimé 0.28 ± 0.11 ; $P = 0.0234$) (LMM : $R^2 = 0.77$, $N = 21$, $n = 154$).

Enfin, on note une augmentation de l'aileon et du pied deux fois plus rapide en condition expérimentale qu'en condition naturelle (Figure 7). En effet, la température du pied augmente à une vitesse de $0.23 \text{ °C} \cdot \text{min}^{-1}$ et de $0.45 \text{ °C} \cdot \text{min}^{-1}$ en condition naturelle et expérimentale respectivement, avec une vitesse significativement plus rapide en condition expérimentale (Temps de récupération x condition ; $P < 0.0001$) (LM : $P < 0.0001$; $R^2 = 0.94$). Le même patron est identifiable pour la température de l'aileon

avec une vitesse d'augmentation de $0.20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en condition naturelle significativement plus lente qu'en conditions expérimentales où la vitesse est de $0.41^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Temps de récupération x condition ; $P < 0.0001$) (LM : $P < 0.0001$; $R^2 = 0.96$).

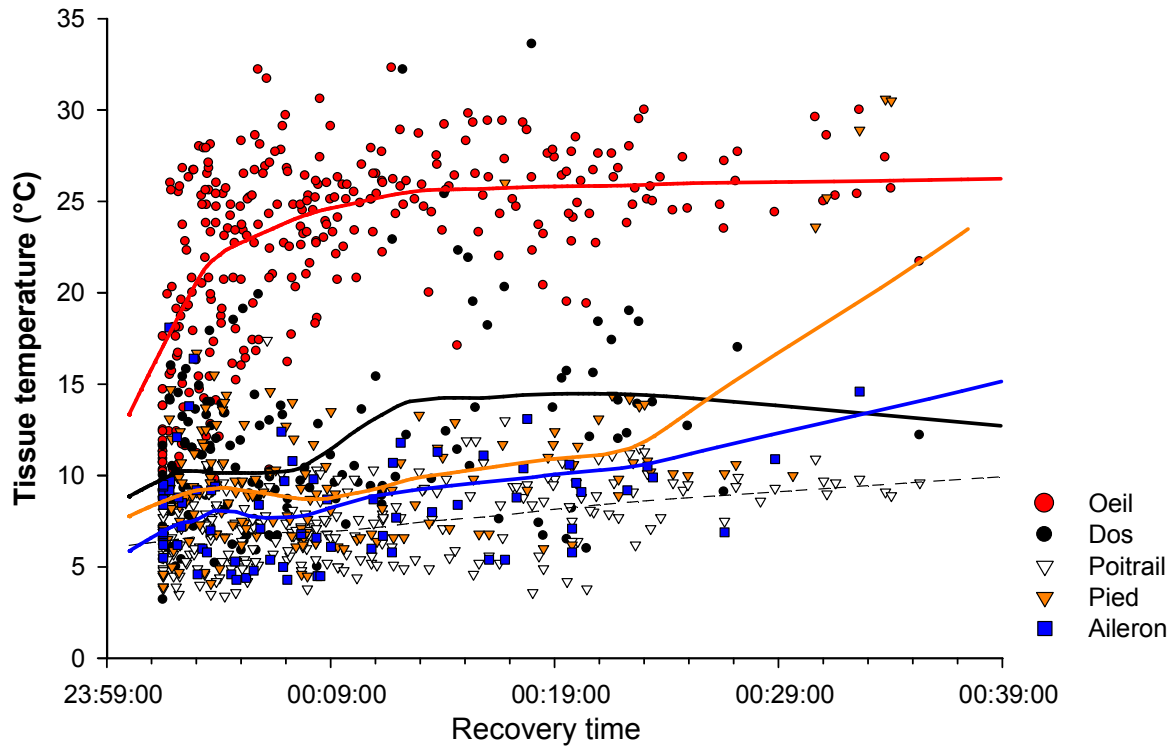


Figure 6 : Températures durant le temps de récupération à terre après la sortie de l'eau d'images thermiques prises sur des individus en condition naturelle, non contraints. La figure montre la température maximale de l'œil (rouge), la température moyenne de la face intérieure de l'aile (bleu), le dos (noir), la température moyenne du pied (orange) et de la poitrine (blanc). Les lignes ont été ajustées par une régression de Loess (Lissage = 0.5 ; degré = 2) séparément par chaque aire

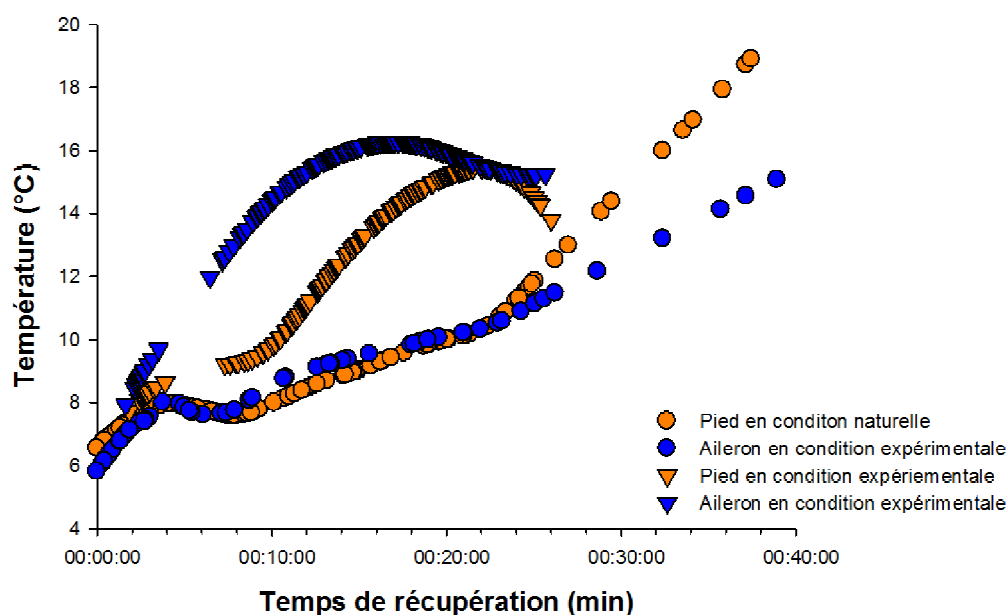


Figure 7 : Températures de l'aile droit (bleu) et du pied droit (orange) durant le temps de récupération mesurées en condition naturelle (rond) et en condition expérimentale (triangle). Les températures sont extraites des températures ajustées par une régression de loess (Lissage =0.5 ; degré=2) chez 24 individus en condition naturelle et 16 individus en condition expérimentale

Discussion

Les résultats obtenus indiquent que la récupération des températures, considérées comme un *proxy* de la perfusion sanguine, s'effectue au niveau des membres rapidement après le retour à terre des individus. Bien que ce phénomène soit présent aussi bien chez des individus en hypothermie, à normothermie (Figure 3) que chez des oiseaux mesurés en milieu naturel et en condition expérimentale (Figure 6 et 7), on constate que son intensité dépend des conditions de mesures et que les différents membres (*i.e.* aileron et pied) ne semblent pas jouer le même rôle lors de la récupération (Figure 5).

De façon surprenante, la reperfusion périphérique après une période d'immersion dans l'eau froide se fait indépendamment de la température interne des oiseaux (Figure 3). En effet, on remarque que même les individus ayant une température cloacale faible à leur retour de mer (*i.e.* Expérience A ; Figure 3A) expriment une augmentation de la température de l'aile (Figure 3E) et du pied (Figure 3F). Cependant on remarque la présence d'un délai lors de la réaugmentation des températures de l'aile avec une température cloacale plus faible (*i.e.* Expérience A) tandis que les individus à normothermie (*i.e.* Expérience B) réaugmentent instantanément la température de l'aile pour atteindre plus rapidement la même température de stabilisation (Figure 2A). Au niveau du pied, il semble que la réaugmentation des températures soit différée comparativement à l'aile. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales (expérience A), on observe un décalage de la phase de réaugmentation du pied par

rapport à l'aileton (Figure 7; condition expérimentale). De plus, on remarque que plus la température initiale du pied est élevée plus la température du pied pendant la mesure va augmenter (Figure 5A).

Ces résultats semblent indiquer que l'utilisation des fenêtres thermiques, avec la perfusion des ailerons dans un premier temps et des pieds par la suite, intervienne chez le manchot royal à des fins d'ajustement de la température corporelle possiblement pour éviter des épisodes d'hyperthermies. Cette utilisation des fenêtres thermiques a d'ailleurs déjà été suggérée chez les phoques au sortir de l'eau (Mauck et al. 2003). Certains organes peuvent avoir un rôle physiologique en plus d'être périphérique, c'est le cas du tissu adipeux sous-cutané pouvant suggérer un rôle dans la gestion des réserves énergétiques chez cette espèce (Lewden et al. 2017, *in prep*) ou des yeux et des vibrisses chez les dauphins et les phoques ayant un rôle sensoriel (Dehnhardt et al. 1998; Mauck et al. 2000). En revanche, les ailerons et les pieds ne possèdent pas de tissu adipeux et leur rôle à terre semble restreint à un rôle de dissipation de chaleur. En effet, de par leur large surface et la présence d'un réseau vasculaire faiblement isolé, ils représentent une zone d'échange de chaleur efficace. Cette capacité de dissipation de chaleur, exploitée dès la sortie de l'eau, pourrait permettre une régulation plus fine des températures internes en ajustant les flux thermiques périphériques afin d'éviter une réaugmentation des températures corporelles proche du niveau d'hyperthermie.

Une autre hypothèse suggère l'utilisation des fenêtres thermiques à des fins de séchage du plumage/pelage (Mauck et al. 2003). En effet, une expérience réalisée sur plusieurs carcasses d'oiseaux et de mammifères révèle une conductance plus élevée lorsque le plumage/pelage est mouillé comparativement à une couverture sèche (de Vries et van Eerden 1995). Ainsi, l'utilisation de fenêtres thermiques au niveau des membres (étude actuelle) et du tronc (matériel supplémentaire 1 ; Lewden et al. *in prep.*) soutient cette hypothèse.

Enfin, la réaugmentation de la température de surface pourrait également être une réponse physiologique induite par une température ambiante supérieure à celle rencontrée dans l'eau et donc un rétablissement du flux sanguin après une période de vasoconstriction.

On remarque, que la vitesse de réaugmentation des températures varie en fonction des conditions de mesures (Figure 7). Bien que montrant le même schéma, les individus en condition naturelle montrent une réaugmentation des tissus périphériques moins rapide que ceux en condition expérimentale. Ces résultats confirment dans un premier temps l'impact de la manipulation humaine sur le stress des individus déjà observé dans de nombreuses études. En effet, ces études ont montré deux types de réponses : une augmentation rapide des températures internes simultanément à une vasoconstriction périphérique (Edgar et al. 2013, 2011; Herborn et al. 2015; Jerem et al. 2015) ou une augmentation simultanée des températures périphériques et internes (Ikkatai et Watanabe 2015). Il semblerait que la manipulation humaine induise le deuxième type de réponse chez le manchot royal. Cette observation soutient également l'utilisation des fenêtres thermiques à des fins d'ajustement de thermorégulation. En

effet, bien qu'intensifiée par la manipulation humaine en condition expérimentale, le patron de réaugmentation des températures périphériques est similaire en condition naturelle alors qu'il n'y a pas de stress induit par la présence humaine. Ainsi, la forte augmentation des températures périphériques observées en condition expérimentale pourrait résulter de la combinaison du stress et de la récupération des températures à terre tandis que l'effet unique de la récupération à terre induit le même schéma à plus faible intensité en condition naturelle (Figure 7).

Le gradient défavorable observé durant cette période, avec un envoi du flux sanguin chaud en périphérie en parallèle d'une température cloacale faible, souligne une situation favorable aux pertes de chaleur pouvant être utilisé à des fins de thermorégulation. De plus, il est à noter que l'environnement terrestre, à l'endroit de la colonie, correspond à la zone de thermoneutralité du manchot royal et n'induit pas de perte de chaleur suffisante pour impacter négativement la température corporelle comparativement au milieu marin. L'effet positif des conditions environnementales sur les températures corporelles en milieu naturel pourrait également suggérer un gain de chaleur, par radiation solaire par exemple, dans cet environnement terrestre 'favorable'. Alors, bien que, l'isolation du tronc au niveau du dos et du poitrail ne permet pas d'évaluer les perfusions sanguines sous-cutanées, l'augmentation de la température du dos, une surface noire, comparativement au poitrail, une surface blanche, soutient l'hypothèse d'un gain de chaleur par radiation solaire (Figure 6).

Enfin, contrairement aux mesures effectuées sur les passereaux, nous avons vu que la température de l'œil chez le manchot royal ne représente pas un bon indicateur de la température interne des individus. En effet, on observe une réaugmentation rapide (en deçà de 5 minutes) de la température de l'œil chez des individus sortant de l'eau présentant des températures cloacales faibles (*i.e.* mesurées en conditions expérimentales). De par l'utilisation de l'hétérothermie bien connue chez cette espèce (Handrich et al. 1997; Fahlman et al. 2007), le manchot royal est capable de maintenir plusieurs degrés d'écart entre deux tissus. Cependant, même si la température de l'œil chez le manchot royal ne constitue pas un *proxy* de la température interne, elle pourrait se révéler pertinente dans de futures études pour évaluer l'activité et l'efficacité de la dissipation de chaleur avec un maintien stable de la température lors d'une dissipation de chaleur efficace (étude actuelle) ou une augmentation de cette température en conditions proches de l'hyperthermie.

Matériel supplémentaire 1 :

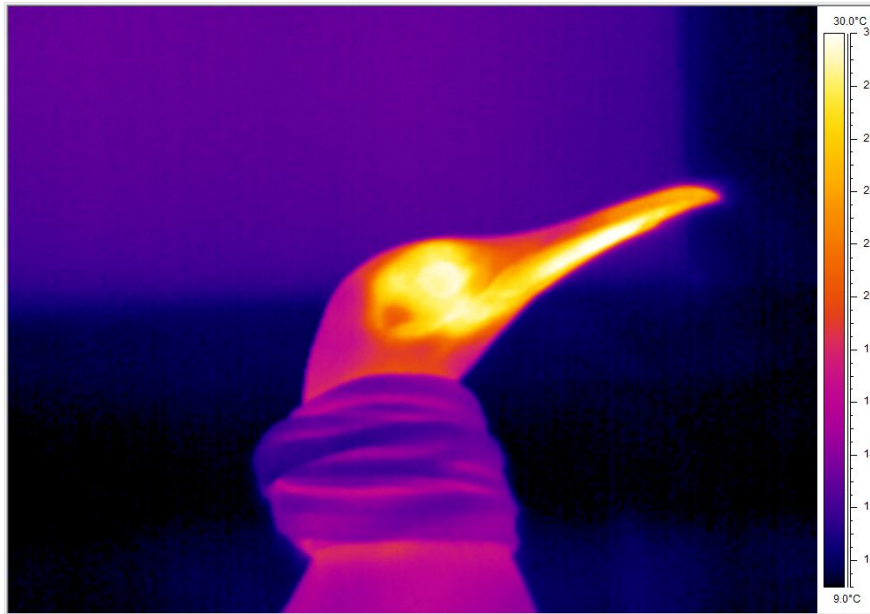


Figure A : Photo thermique de la tête d'un individu acclimaté à la manipulation humaine ne nécessitant pas de port de cagoule

La température de l'œil et du bec a été mesurée simultanément à la température de l'aileon chez un individu acclimaté ne nécessitant pas le port d'une cagoule (Figure A). Cet individu avait également été équipé préalablement des deux enregistreurs de température l'un placé dans la cavité abdominale, l'autre en position sous cutanée suivant une implantation chirurgicale sous anesthésie gazeuse décrit dans Lewden et al. 2017b. Cet individu a été mesuré une fois par jour durant 5 jours consécutifs sur une période de récupération $00:38 \pm 00:10$ heures après la sortie de l'eau.

Les températures de l'œil, de l'aileon et du bec montrent le même schéma de réaugmentation des températures (Figure B). De plus, les températures mesurées à l'aide d'imagerie infra-rouge sont corrélées aux températures enregistrées par l'enregistreur implanté en sous-cutané (dans le dos). La température de l'œil est positivement corrélée à la température de la cavité abdominale ($n=30$, $R^2=0.27$, $P=0.0036$), de même que la température de l'aileon est corrélée à la température sous-cutanée du dos ($n=67$, $R^2=0.22$, $P<0.0001$) et du bec ($n=33$, $R^2=0.33$, $P=0.0005$).

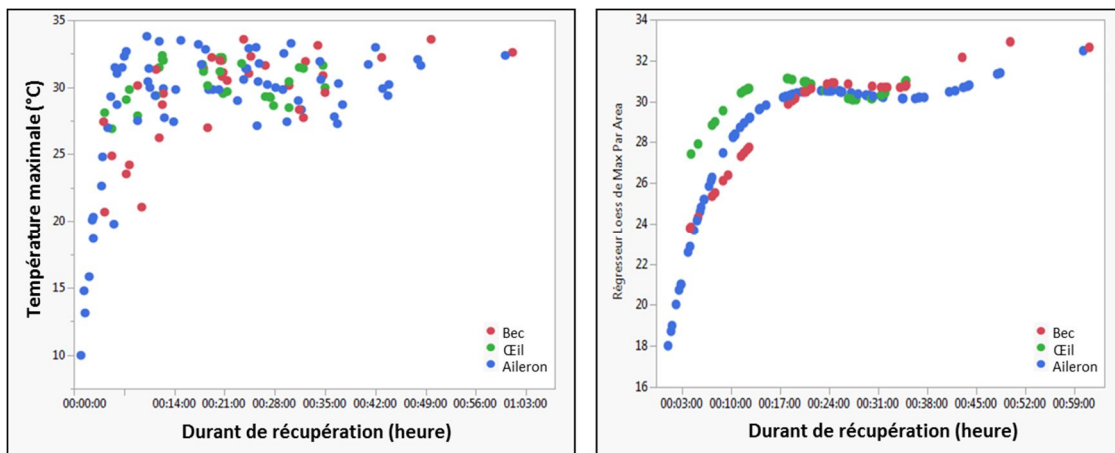


Figure B : Profil de réaugmentation des températures du bec, de l'œil et l'aileon mesurées par imagerie infrarouge en fonction de la durée de récupération après la sortie de l'eau froide.

Références:

- Boyd, I. L. and Croxall, J. P.** (1996). Dive durations in pinnipeds and seabirds. *Can. J. Zool.* **74**, 1696–1705.
- Cherel, Y., Charrassin, J.-B. and Handrich, Y.** (1993). Comparison of body reserve buildup in prefasting chicks and adults of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Physiol. Zool.* **66**, 750-770.
- Cockrem, J. F., Potter, M. A., Barrett, D. P., Candy, E. J., Cockrem, J. F., Potter, M. A., Barrett, D. P. and Candy, E. J.** (2008). Corticosterone Responses to Capture and Restraint in Emperor and Adelie Penguins in Antarctica. **25**, 291-298.
- Culik, B., Wilson, R. and Bannasch, R.** (1994). Underwater Swimming at Low Energetic Cost by *Pygoscelid* Penguins. *J. Exp. Biol.* **197**, 65-78.
- Dawson, C., Vincent, J., Jeronimidis, G., Rice, G. and Forshaw, P.** (1999). Heat transfer through penguin feathers. *J. Theor. Biol.* **199**, 291-5.
- Dehnhardt, G., Mauck, B. and Hyvärinen, H.** (1998). Ambient temperature does not affect the tactile sensitivity of mystacial vibrissae in harbour seals. *J. Exp. Biol.* **201**, 3023-3029.
- Delord, K., Barbraud, C. and Weimerskirch, H.** (2004). Long-term trends in the population size of king penguins at Crozet archipelago: environmental variability and density dependence? *Polar Biol.* **27**, 793-800.
- Edgar, J. L., Lowe, J. C., Paul, E. S. and Nicol, C. J.** (2011). Avian maternal response to chick distress. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **278**, 3129-3134.
- Edgar, J. L., Nicol, C. J., Pugh, C. A. and Paul, E. S.** (2013). Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. *Physiol. Behav.* **119**, 195-200.
- Fahlman, A., Handrich, Y., Woakes, A. J., Bost, C.-A., Holder, R., Duchamp, C. and Butler, P. J.** (2004). Effect of fasting on the VO₂ -fh relationship in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, 870-877.
- Fahlman, A., Schmidt, A., Jones, D. R., Bostrom, B. L. and Handrich, Y.** (2007). To what extent might N₂ limit dive performance in king penguins? *J. Exp. Biol.* **210**, 3344-3355.
- Froget, G., Handrich, Y., Maho, Y. Le, Rouanet, J.-L., Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (2002). The heart rate/oxygen consumption relationship during cold exposure of the king penguin: a comparison with that during exercise. *J. Exp. Biol.* **205**, 2511-2517.
- Handrich, Y., Bevan, R. M., Charrassin, J.-B., Butler, P. J., Putz, K., Woakes, A. J., Lage, J. and Maho, Y. Le** (1997). Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* **388**, 64-67.
- Herborn, K. A., Graves, J. L., Jerem, P., Evans, N. P., Nager, R., McCafferty, D. J. and McKeegan, D. E. F.** (2015). Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiol. Behav.* **152**, 225-230.
- Ikkatai, Y. and Watanabe, S.** (2015). Eye surface temperature detects stress response in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Neuroreport* **26**, 642-646.
- Jerem, P., Herborn, K., McCafferty, D., McKeegan, D. and Nager, R.** (2015). Thermal Imaging to Study Stress Non-invasively in Unrestrained Birds. *J. Vis. Exp.* e53184.
- Klir, J. J. and Heath, J. E.** (1992). An infrared thermographic study of surface temperature in relation to external thermal stress in three species of foxes: the Red fox (*Vulpes vulpes*), Arctic fox (*Alopex lagopus*), and Kit fox (*Vulpes macrotis*). *Physiol. Zool.* **65**, 1011-1021.

- Kooyman, G. L., Gentry, R. L., Bergman, W. P. and Hammel, H. T.** (1976). Heat loss in penguins during immersion and compression. *Comp. Biochem. Physiol. A*. **54**, 75-80.
- Kvadsheim, P. H. and Folkow, L. P.** (1997). Blubber and flipper heat transfer in harp seals. *Acta Physiol. Scand.* **161**, 385-395.
- Lewden, A., Enstipp, M.R., Picard, B., van Walsum, T. and Handrich, Y.** (2017b). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea: thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Physiol.* **220**, 3084-3094.
- Lewden, A., Enstipp, E.R., Bonnet, B., Bost, C. and Handrich, Y.** (*Submit*) Thermal strategies of king penguins during prolonged fasting in water.
- Lewden, A., Nord, A., Bonnet, B. and Handrich, Y.** (*in prep*) Recovery temperatures of King Penguins after long-term immersion in cold water: An unexpected strategy.
- Luna-Jorquera, G. and Culik, B. M.** (2000). Metabolic rates of swimming Humboldt penguins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **203**, 301–309.
- Mauck, B., Eysel, U. and Dehnhardt, G.** (2000). Selective heating of vibrissal follicles in seals (*Phoca vitulina*) and dolphins (*Sotalia fluviatilis guianensis*). *J. Exp. Biol.* **203**, 2125-2131.
- Mauck, B., Bilgmann, K., Jones, D. D., Eysel, U., Dehnhardt, G., Zoologie, A., Bochum, R., Bochum, D., Tierphysiologie, I., Köln, U., et al.** (2003). Thermal windows on the trunk of hauled-out seals : hot spots for thermoregulatory evaporation? *J. Exp. Biol.* 1727–1738.
- McCafferty, D.J., Gilbert, C., Paterson, W., Pomeroy, P.P., Thompson, D., Currie, J.I. and Ancel, A.** (2011). Estimating metabolic heat loss in birds and mammals by combining infrared thermography with biophysical modelling. *Comp. Biochem. Phys. A* **158**, 337–345.
- McCafferty, D. J.** (2013). Applications of thermal imaging in avian science. *Ibis*. **155**, 4–15.
- Meagher, E. M., McLellan, W. A., Westgate, A. J., Wells, R. S., Frierson, D. Jr and Pabst, D. A.** (2002). The relationship between heat flow and vasculature in the dorsal fin of wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *J. Exp. Biol.* **205**, 3475-3486.
- Noren, D. P., Williams, T. M., Berry, P. and Butler, E.** (1999). Thermoregulation during swimming and diving in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Comp. Physiol. B* **169**, 93-99.
- Pabst, D. A., Rommel, S. A., McLellan, W. A., Williams, T. M. and Rowles, T. K.** (1995). Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise. *J. Exp. Biol.* **198**, 221-236.
- Pap, L., Vincze, O., Wekerle, B., Daubner, T., Csongor, I. V, Nudds, R. L., Dyke, G. J. and Osv, G.** (2016). A phylogenetic comparative analysis reveals correlations between body feather structure and habitat. *Functional. Ecology. In prep.*
- Ponganis, P. J., Van Dam, R. P., Levenson, D. H., Knower, T., Ponganis, K. V. and Marshall, G.** (2003). Regional heterothermy and conservation of core temperature in emperor penguins diving under sea ice. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **135**, 477–487.
- Ryg, M., Lydersen, C., Knutsen, L. O., Bjorge, A., Smith, T. G. and Øritsland, N. A.** (1993). Scaling of insulation in seals and whales. *J. Zool. Lond.* **230**, 193-206.
- Tattersall, G. J., Andrade, D. V and Abe, A. S.** (2009). Heat exchange from the toucan bill reveals a controllable vascular thermal radiator. *Science* **325**, 468-70.

- Tattersall, G. J., Roussel, D., Voituron, Y. and Tattersall, G. J.** (2016). Novel energy-saving strategies to multiple stressors in birds : the ultradian regulation of body temperature. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **283**, 1551.
- Van De Ven, T. M. F. N., Martin, R. O., Vink, T. J. F., Mckechnie, A. E. and Cunningham, S. J.** (2016). Regulation of Heat Exchange across the Hornbill Beak: Functional Similarities with Toucans? *PLoS One*.
- Vries, J. De and Eerden, P. W.** (1995). Thermal Conductance in aquatic bird in relation to the degree of Water Contact, Body Mass, and Body Fat : Energetic implications of living in a strong cooling environment. **68**, 1143–1163.
- Watts, P.** (1992). Thermal constraints on hauling out by harbour seals (*Phoca vitulina*). *Can. J. Zool.* **70**, 553-560.
- Weissenböck, N.M., Weiss, C.M., Schwammer H.M. and Kratochvil H** (2010). Thermal windows on the body surface of African elephants (*Loxodonta africana*) studied by infrared thermography. *J. Therm. Biol.* **35**, 182–188.
- Williams, T. M.** (1990). Heat transfer in elephants: thermal partitioning based on skin temperature profiles. *J. Zool. Lond.* **222**, 235-245.
- Williams, T. M. and Worthy, G. A. J.** (2002). Anatomy and physiology: The challenge of aquatic living. In *Marine Mammal Biology: an Evolutionary Approach* (ed. R. Hoelzel), pp. 73-97. Oxford: Blackwell Science.
- Williams, C.L., Hagelin, J.C. and Kooyman, G.L.** (2015). Hidden keys to survival: the type, density, pattern and functional role of emperor penguin body feathers. *Proc. R. Soc. B.* **282**, 2015-2033.

VIII

Discussion



A – Synthèse des résultats obtenus

L'étude du paradoxe des épisodes de normothermie pendant l'inactivité de surface du Manchot royal en mer, effectuée en condition de captivité, nous a permis de **clarifier** les causes possibles du phénomène, sans pour autant apporter la **preuve** de notre hypothèse.

L'une de deux hypothèses de travail, basée sur l'incorporation des acides gras (FFA pour "*free fatty acid*"), comportait quatre étapes liant directement l'augmentation paradoxale des températures périphériques en eau froide à :

- (i) une augmentation des débits de flux sanguin du tissu adipeux sous-cutané (TASC)
- (ii) l'incorporation des FFA accumulés dans le sang dans le TASC
- (iii) une augmentation des pertes de chaleur périphérique
- (iv) de la dépense énergétique du manchot royal au repos dans l'eau froide.

L'autre hypothèse basée sur l'élimination de l'azote, passant également par l'étape (i), implique la nécessité pour les manchots de perfuser le TASC pour résorber plus rapidement une accumulation d'azote tissulaire, mise en place pendant l'activité de plongée en profondeur. Le fait que la normothermie périphérique ait été observée dans notre piscine n'a pas permis d'écarter cette hypothèse alternative, car elle ne s'oppose pas à l'hypothèse précédente. Néanmoins, sans activité de plongées profondes en piscine, il ne peut y avoir d'accumulation d'azote ni dans le sang, ni dans les tissus, ce qui renforce la possibilité que l'hypothèse de stockage des FFA soit correcte, au moins pour expliquer les observations faites en piscine.

Enfin, l'observation en piscine d'épisodes de normothermie chez des individus aussi bien 'nourris' que 'à jeun' (jeûne allant de 2 à 12 jours) représente un **résultat inattendu**, qui nous a complexifié la validation de l'hypothèse de stockage des FFA. En effet, si la normothermie d'inactivité en eau froide n'avait été observée qu'en condition 'nourris', donc en l'absence de normothermie en condition 'à jeun' (*i.e.* témoin négatif), nous aurions pu appuyer la relation entre l'augmentation des températures périphériques et l'étape (ii). Or, la perfusion du tissu périphérique en condition 'à jeun' nous ont conduit à considérer à la fois la **reconstitution**/stockage des réserves énergétiques en période d'alimentation mais également lors de la **mobilisation** de ces réserves en période de balance énergétique négative.

Ainsi, bien que nous ayons été challengés par les résultats obtenus durant le jeûne des oiseaux dans l'eau, ces derniers nous ont permis d'appréhender la généralisation de notre hypothèse initiale à la notion de **compromis énergétique** entre deux grandes fonctions, la gestion des réserves périphériques et la thermorégulation (en eau froide). De plus, notons que même si l'hypothèse de l'élimination de l'azote, testée de façon indirecte, a été écartée en condition expérimentale, cette dernière reste tout à fait

plausible en condition naturelle. En effet, il n'est pas possible d'écarter l'une ou l'autre de nos hypothèses initiales pour expliquer les périodes *inter-bout* de quelques heures en mer succédant à des séquences de plongées au cours de la journée.

Enfin, une des hypothèses non-testée, qui pourrait également intervenir dans les variations de températures constatées lors de nos expérimentations en piscine, est celle d'une influence de l'activité et plus précisément des pertes de chaleur par convection lors des mouvements du corps par rapport à l'eau. Cette hypothèse sera abordée dans la partie 4.3 (ci-après).

Contrairement aux prédictions que nous avons émises, la récupération des températures à normothermie à terre, après une période d'immersion en eau froide, s'effectue **simultanément** au niveau des tissus internes et périphériques (Chapitre 3). De plus, en contradiction avec la perfusion de la périphérie pour sa qualité de réserve énergétique, la perfusion sanguine a également été constatée au niveau des ailerons (Chapitre 4), un tissu ne présentant pas de TASC. Ainsi, nos interprétations de cette augmentation immédiate de toutes les températures périphériques peuvent être envisagées à des fins de :

- (I) séchage du plumage, ce qui permettrait une récupération plus rapide de son pouvoir isolant
- (II) d'utilisation des fenêtres thermiques présentes à la surface des ailerons, ce qui permettrait d'optimiser la remontée des températures profondes, en évitant le risque d'hyperthermie.

Les différentes stratégies de thermorégulation mises en évidence (ou suggérées) au cours de ma thèse soulignent la complexité et la **diversité des mécanismes** utilisés en fonction des conditions physiologiques et environnementales.

B – Limites et perspectives

1. Récupération et acclimatation des oiseaux

Le pré-requis expérimental de ce projet de thèse était de pouvoir manipuler l'état nutritionnel des individus maintenus en captivité et de suivre quotidiennement leur prise de nourriture, leur masse corporelle, leur comportement et leurs températures corporelles. L'équipement des individus d'enregistreurs de température a nécessité une anesthésie générale, impliquant l'instauration d'une période de **récupération** d'environ 6 jours, durée minimum pour une disparition des phénomènes inflammatoires liés à la cicatrisation. Suite à cette période, tous les individus présentaient un comportement alerte et des plaies cicatrisées. Il est important de noter que les manchots royaux ont une très bonne capacité de cicatrisation, démontrée par l'absence complète de cicatrice lors de la chirurgie de déséquipement, 21 jours après la chirurgie d'équipement. La bonne récupération des oiseaux a également été démontrée par le retour sur la colonie des individus ayant suivi le protocole de la piscine (*i.e.* équipement et déséquipement). Pour exemple, 7 des 8 individus équipés durant la première saison

de terrain ont été ré-observés à de nombreuses reprises au cours de l'année suivante et au moins un individu a été observé sur œuf durant la même saison de reproduction, quelques semaines après son déséquipement.

Enfin, comme nous l'avions observé en temps réel, l'étude du comportement des individus (Etude complémentaire) a montré un bon niveau d'**acclimatation** à la piscine avec des binômes ne démontrant pas de comportement d'agression entre eux et ayant un budget temps principalement alloué aux comportements de repos et de toilette.

2. Condition naturelle *versus* expérimentale

2.1 En mer *versus* en piscine

Bien que permettant une bonne reconstitution des conditions de la nuit en mer en surface, et l'étude de l'état nutritionnel indépendamment de la problématique d'accumulation de l'azote au cours de la plongée, les conditions expérimentales de notre piscine restent artificielles.

Tout d'abord la piscine réduit considérablement l'**activité quotidienne** des individus et la possibilité de plongée en eau profonde. Ainsi, les mécanismes d'épargne mis en place lors des plongées profondes (*i.e.* hypothermie et hypométabolisme), les comportements de chasse et le timing des repas (continu en mer *versus* toutes les 3 heures en piscine) diffèrent en piscine. En résumé, les activités ayant lieu en mer durant le jour ne peuvent pas être exercées dans nos conditions expérimentales. La situation d'un manchot royal relativement immobile à la surface de l'eau, jour et nuit, demeure une situation artificielle que les individus ne rencontrent probablement jamais en mer. Au fait de ces différences, les modifications de températures n'ont été analysées que durant la phase nocturne, période où nous estimons les conditions similaires à celles rencontrées en mer.

Ainsi, il est possible que l'observation d'épisodes de normothermie **plus courts** durant la nuit en piscine qu'en milieu naturel (Schmidt et al. 2006; Chapitre 1) puisse avoir été induit par les conditions expérimentales. En effet, l'absence d'hypothermie diurne (liée à l'activité de plongée) en piscine et les repas épisodiques pourraient permettre de ne pas concentrer la phase de transfert des FFA au TASC uniquement pendant la nuit. Cette première hypothèse pourrait expliquer que l'analyse des événements de normothermie uniquement pendant la nuit en piscine sous-estime le nombre d'évènements total dans une journée (jour et nuit) et donc la durée totale du maintien à normothermie des tissus. Une deuxième hypothèse a été émise dans le chapitre 1 abordant la capacité des manchots à réduire leur activité de digestion (voir partie 4.1). En effet, l'arrêt de la digestion, déjà observée en milieu naturel chez des individus mâles en incubation (Gauthier-Clerc et al. 2000), pourrait également intervenir en piscine, induit éventuellement par le stress lié aux conditions expérimentales. En l'absence d'activité de digestion, il n'y aurait plus de nécessité de stockage des FFA et donc, possiblement, une diminution de

la durée des épisodes de normothermie, comparativement à ceux observés en mer, bien que la mobilisation des réserves énergétiques puisse également prendre le relais sur la perfusion périphérique.

2.2 En colonie *versus* en studio photographique

Le point fort du Chapitre 4 est la mise en évidence d'un schéma de réaumentation des températures similaire en condition naturelle et expérimentale, bien que l'intensité du réchauffement ne soit pas comparable dans les deux conditions. En effet, nous avons observé une récupération des températures plus rapide (plus intense) en condition expérimentale que dans la colonie. Nous pensons que la réaction au stress de manipulation et la production de chaleur accompagnant les tentatives de fuites peuvent engendrer cette différence entre les deux conditions.

Bien évidemment, l'objectif de tout chercheur est de mesurer un phénomène sans que la technique de mesure n'impacte les données, mais la mise en pratique de cet idéal reste complexe. Nous avons vu que dans le cas de l'utilisation de la caméra thermique, la prise des photos en condition standardisée améliore la qualité des photos et facilite leurs analyses. Les photos prises en colonie sont quant à elles soumises à différents **biais** induits par l'environnement naturel. La prise de photos par temps clair ou nuageux pourra légèrement influencer la température de surface tandis que la visibilité de l'individu dépendra de sa mobilité et de son déplacement dans la colonie. De plus, sans intervention sur l'oiseau, la température interne des individus dans la colonie n'a pas pu être mesurée. Cependant cette information aurait été enrichissante afin de contrôler la variabilité interindividuelle des températures internes et ainsi mieux comprendre la relation entre les variations de températures internes et périphériques.

3. Variation de la masse

L'une des difficultés rencontrée au cours de l'alimentation des individus a été de nourrir les oiseaux avec une quantité de poisson permettant d'induire une prise de masse optimale au cours du séjour en piscine (condition 'nourris'). En effet, l'hypothèse de la nutrition supposait que l'on assure un gain lipidique journalier reproductible entre les individus. Malheureusement, les données collectées lors de la première année d'expérimentation en condition 'nourris' n'ont pas pu être exploitées en raison d'une prise de masse insuffisante, voir même d'une diminution de la masse corporelle selon les jours d'alimentation et/ou les individus. La deuxième année d'expérimentation a permis la mise en place de 4 repas de poissons quotidiens permettant, cette année-là, une prise de masse conséquente.

Une pesée quotidienne ne permet pas de distinguer la part du gain de masse corporelle que l'on peut attribuer au gain de masse du tissu adipeux. En d'autres termes, quelle est la proportion réelle de poisson assimilée par le manchot royal après la prise d'un repas ? Cette question représente une des limites de notre étude pour deux raisons : (1) Après 2-3 jours de jeûne, on peut s'attendre à ce qu'une part du gain de masse soit liée au remplissage du tractus digestif, conduisant à une prise de masse plus importante le premier jour d'alimentation comparativement au jours suivants (2) connaissant la capacité

des manchots royaux à moduler/bloquer leur digestion, la proportion de la masse du repas réellement **incorporée** sous forme de TASC peut varier entre les individus selon, par exemple, leur sensibilité au stress. Ainsi, j'ai pu constater le cas d'une régurgitation de la quantité totale d'un repas, et ce, 12 heures après l'alimentation de l'individu. Pour une raison inconnue, cet individu avait bloqué complètement sa digestion durant 12 heures de non dérangement (6:00 PM et 6:00 AM) incluant la période de nuit. Cependant, bien que la délimitation précise de la période de digestion n'ait pas été possible dans notre expérience, l'observation des fèces dans la piscine comme à terre a confirmé globalement une bonne activité de digestion chez les oiseaux nourris.

Une des prédictions émises dans le chapitre 2, durant le maintien des individus à jeun en piscine, était que dans cette situation de **challenge** énergétique, coûts de thermorégulation élevés en eau froide face à une inaccessibilité prolongée à la nourriture aurait conduit, logiquement, à une stratégie d'**économie d'énergie** soit le maintien d'une vasoconstriction périphérique, *i.e.* absence d'épisode de normothermie.

Nos résultats contraires à cette prédiction sont peut être liés au fait que le jeûne n'a pas été poussé assez loin ; c'est en tout cas ce que suggère le cas particulier d'un binôme de l'étude (non présenté en chapitre 2). Ces deux oiseaux, maintenus ensemble dans la piscine, et soumis au même protocole, ont suivi un parcours de perte de masse bien différent (voir Figure 45). Le premier individu (ID A) a perdu en moyenne 244g par jour (Figure 45A), sans jamais atteindre la masse critique de l'entrée en Phase III du jeûne chez le manchot royal (Cherel et al. 1988, voir Box 8), tandis qu'ID B, s'amaigrissant deux fois plus rapidement (431 g par jour), a dépassé ce seuil, atteignant une masse corporelle de 9.33kg, Figure 45B ci-contre). Or cet individu, contrairement à ID A, montre une absence complète de retour à la normothermie des températures sous-cutanées (*i.e.* flanc et dos ; Figure 45B) lors des dernière 48h en piscine. Cette observation, bien que ponctuelle, soutient l'idée que dans le cas d'un jeûne plus avancé, l'épargne énergétique semble l'emporter sur toutes autres considérations. Une autre hypothèse également plausible est qu'arrivé au stade de phase III, avec une modification de la production d'énergie (voir Box 8), l'individu puisse subvenir aux besoins énergétiques du métabolisme, via le catabolisme protéique (Thouzeau et al. 1999). Ce changement de substrat pourrait réduire la nécessité de perfuser le tissu adipeux lipidique sous-cutané.

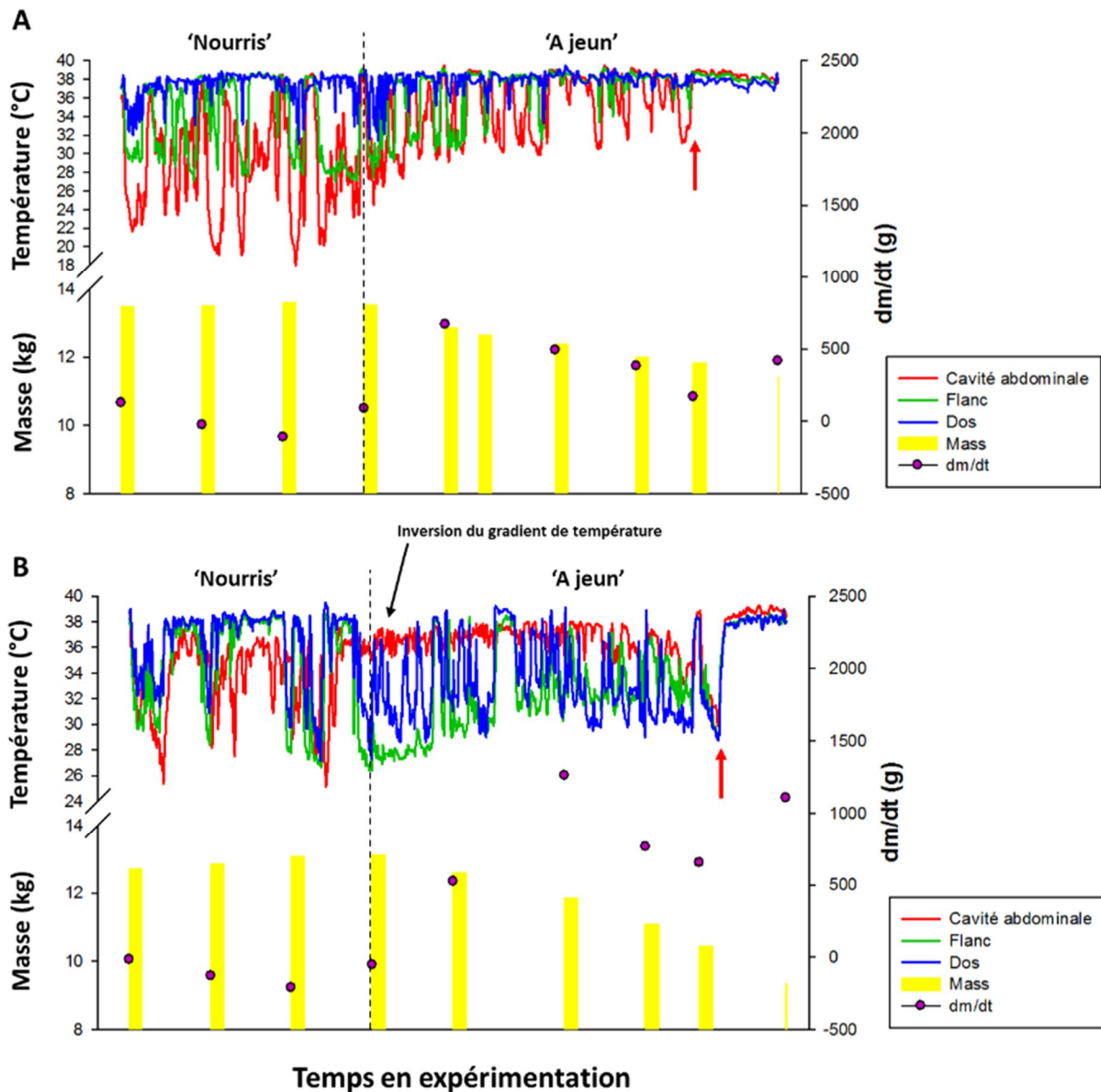


Figure 45 : Variation des températures du flanc (vert), du dos (bleu) et de la cavité abdominale (rouge) de l'individu ID A (A) et ID B (B) ayant suivi le même protocole expérimental en même temps composé d'une période de 3 jours 'nourris' en piscine et de 5 jours 'à jeun' en piscine. Les individus ont été pesés quotidiennement (barre jaune) et leur perte de masse quotidienne a été calculée par jour d'expérimentation (point violet). La flèche rouge à la fin du temps en expérimentation indique la sortie de la piscine et le retour à terre des individus

4 - Variation des températures

Afin d'apporter une conclusion définitive à ma thèse, il serait, tout d'abord, nécessaire de valider notre hypothèse d'augmentation des débits du flux sanguin dans le tissu adipeux (Etape i) en mesurant directement ces flux au niveau du tissu adipeux sous-cutané.

4.1 Un proxy de la perfusion sanguine

Tous les chapitres présentés dans ce manuscrit de thèse utilisent la température comme un *proxy* de la perfusion sanguine. Seule l'utilisation de la caméra thermique (chapitre 5) a permis d'observer en temps réel la restitution du flux sanguin au niveau de deux zones précises, l'aile et la patte, caractérisée par une fine couche de peau et l'absence de tissu adipeux. Un prélèvement sanguin basé sur la localisation thermique du réseau vasculaire sous-cutané a d'ailleurs confirmé sa présence au niveau de l'aile (Figure 46).

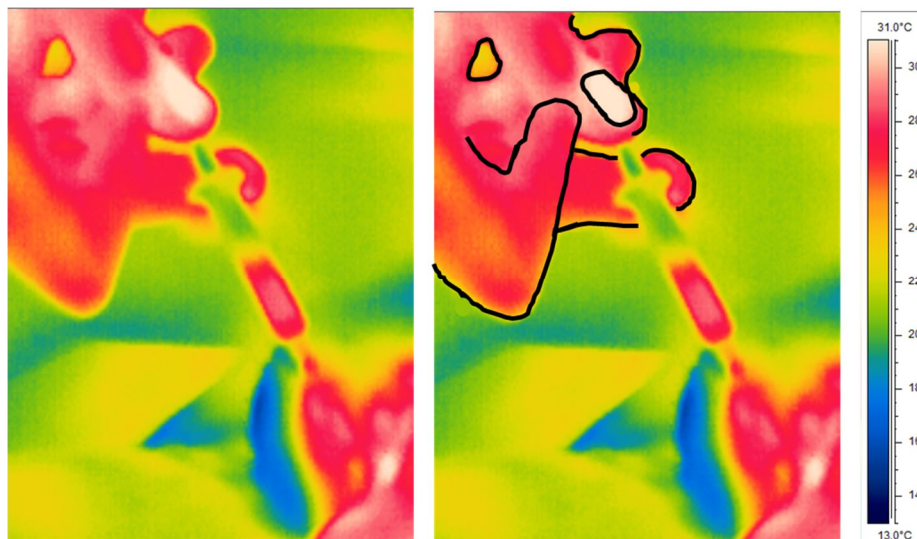


Figure 46 : Visualisation en infra-rouge d'un prélèvement sanguin effectué sur la veine brachiale de l'aile d'un manchot royal dont la localisation avait été préalablement déterminée par image thermique. Les contours noirs délimitent les doigts tenant la seringue

En dehors des ailerons et des pattes, le réseau vasculaire irriguant le derme et le tissu adipeux sous-cutané n'a pas pu être identifié à l'aide de l'imagerie thermique. Cela est impossible étant donné la bonne isolation thermique du plumage des oiseaux et des manchots en particulier. La technique de 'laser-Doppler flowmetry', communément utilisé dans le domaine médical, a été parfois utilisée chez l'animal, par exemple durant des épisodes d'apnée chez des éléphants de mer captifs (*Mirounga angustirostris*) (Ponganis et al. 2008). Cette technique permettrait de confirmer l'étape (i) soit la relation entre l'augmentation des températures et les flux sanguins. Cependant cette technique de mesure demeure non compatible avec le milieu aquatique et avec l'anatomie vasculaire périphérique composée de nombreuses artérioles perfusant le tissu adipeux et donc difficiles à cibler.

4.2 Collecte de données en temps réel

Les variations de températures ont pu être enregistrées au niveau de 4 tissus simultanément durant une période de 21 jours. Cependant, toutes ces températures ont été mesurées à l'aide d'un bio-logger (Ibutton) ne permettant pas d'accéder aux données en temps réel : ces dernières devant être téléchargées au déséquipement des individus. Ainsi, cette absence de **visibilité** des variations de températures en temps réel a réduit les possibilités quant (1) aux prélèvements de tissu adipeux avant et après une

augmentation de température (voir ci-après) mais également pour (2) la mesure du métabolisme pendant une période de réaugmentation des températures dans l'eau, qui du coup a été réalisée à terre (Chapitre 3). Face à cette limite, l'utilisation d'un type de capteur de température implantable permettant de télécharger les données de températures à tout moment de la journée a été testée (ANIPILS). Malheureusement, l'eau salée a grandement compliqué la transmission des données vers le moniteur, ce dernier devant être situé à moins d'un mètre au-dessus de la piscine.

4.3 Approche comportementale grâce à l'accélérométrie

Les pertes de chaleur périphériques par convection augmentent rapidement avec la vitesse de déplacement et l'altération de la couche limite (voir Introduction, page 25). Nous ne pouvons donc pas écarter une certaine influence du **comportement** de déplacement des manchots dans la piscine sur les modifications de température observées.

Même si, comme nous l'avons vu dans les résultats de l'étude complémentaire, nos individus ne bougeaient pratiquement pas dans la piscine, le niveau d'agitation a été clairement impacté par les perturbations humaines : capture pour les 4 repas et la pesée journalière, présence de l'expérimentateur, et son (Etude complémentaire). Il est possible de quantifier précisément (minute par minute) le niveau d'activité global ainsi que la dépense locomotrice en équipant les individus d'un logger muni d'un accéléromètre 3D (voir Matériel & Méthodes).

L'équipement des individus d'un **logger accélérométrique** pendant toutes les sessions en piscine a permis d'accumuler un nombre de données brutes considérable, puisque l'échantillonnage était réalisé en 60Hz (plus d'un million de points par 24h). Bien que non exploitées pour le moment, ces données pourraient donc permettre de compléter la compréhension des variations de températures. De plus, le niveau des dépenses locomotrices, la position et les mouvements du corps, déterminés par l'accélérométrie, pourraient également être reliés par exemple aux différences de variations de températures simultanées entre les tissus (*e.g.* dos vs flanc). En effet, dans le cas d'une agitation élevée, il serait possible de voir une augmentation des températures périphériques possiblement liée à la production/dissipation de chaleur ou une diminution des températures dans le cas d'un dérangement humain et donc de l'immersion de tissu sec dans l'eau (voir Etude complémentaire). Ainsi, les premières heures suivant la mise en piscine correspondent à une période d'acclimatation, caractérisées systématiquement par une forte agitation des individus. Cette période pourrait être plus précisément analysée grâce à l'accélérométrie, afin d'expliquer les variations de températures au cours du temps (Figure 47), voir les différences interindividuelles. Le bruit vraisemblablement lié à ces mouvements pourrait également être diminué en se focalisant strictement sur des périodes sans aucun mouvement de l'individu.

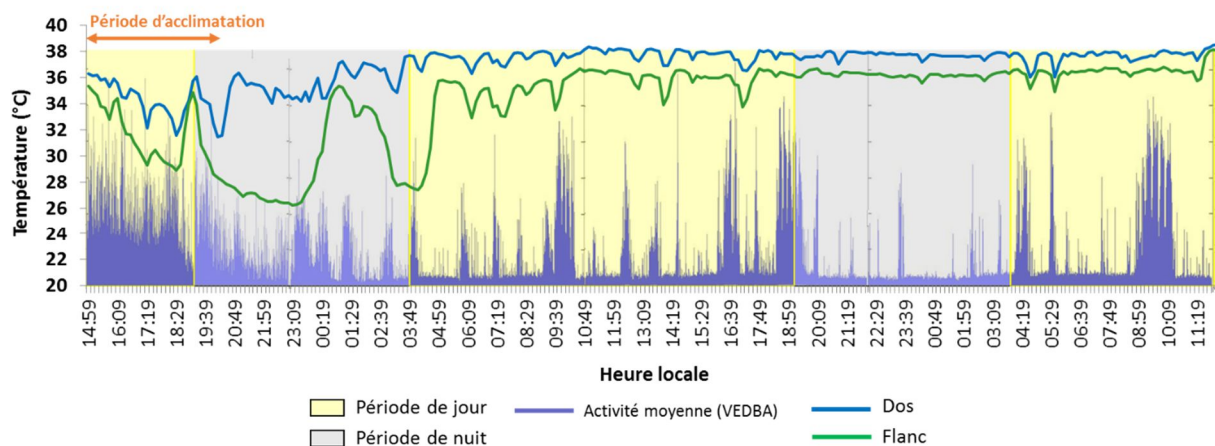


Figure 47 : Superposition des données de températures du dos (bleu) et du flanc (vert) et des données d'agitation moyenne (VEDBA ; bleu foncé) de l'individu mesuré jour et nuit en piscine durant environ 44 heures. La période d'agitation plus élevée en début d'enregistrement caractérise la période d'agitation des individus lors de la première immersion

5. Activité de digestion et dépôt lipidique

Comme abordé précédemment, l'une des limites de l'étude du chapitre 1, durant le maintien des individus nourris en piscine, est le fait de ne pas avoir d'information sur le timing de la digestion et sur des éventuels arrêts du processus. De ce fait, une partie de la variabilité interindividuelle observée dans les relations masse du repas, gain de masse et conséquences sur le profil des températures n'a pas pu être interprétée. Quelles techniques auraient pu être mises en place pour surmonter cette limite ? Plusieurs techniques sont théoriquement disponibles, mais pas toujours applicables pour diverses raisons.

5.1 Mesure directe de l'activité de digestion

Nous pourrions tout d'abord mesurer la **motilité intestinale**, via des techniques de mesure de l'activité électromyographique des fibres lisses (Felder et al. 1984), de radiologie sous amplificateur de brillance (Duke et al. 1997) ou encore par fluorescence (Beaufrière et al. 2010). Ces techniques restent cependant contraignantes, avec la nécessité de maintenir les individus immobiles durant toute la durée de digestion, et donc non-applicable aux individus en piscine.

Nous pourrions aussi mesurer l'**activité chimique** de l'estomac, via la mesure du pH. En effet, les membres des supports techniques en Métrologie et Instrumentation en Biologie et Environnement (MIBE) ont par le passé développée ce type de *biologgers* compatible avec les manchots mais peu de publications scientifiques sont disponibles.

5.2 Mesure directe du stockage des FFA dans le TASC

Une deuxième validation, afin d'apporter une conclusion définitive à ma thèse, serait de démontrer l'hypothèse de stockage des FFA (Etape (ii)). En effet, actuellement les résultats obtenus (Chapitre 1)

soutiennent cette hypothèse sans pour autant la démontrer. Comment serait-il possible de procéder dans l'optique de démontrer le stockage des FFA dans le TASC ?

A- Identification de la preuve d'un stockage de FFA dans le TASC

L'analyse de la composition des acides gras du tissu adipeux pourrait permettre de mettre en évidence le stockage des lipides issus de l'activité de digestion. En effet, les différents acides gras, composant les lipides alimentaires, sont les seuls composants des aliments qui sont déposés intacts au niveau des tissus, du moment qu'ils sont assimilables (Klasing 1998). Conséquemment, la **composition en acide gras** (FFA) de l'alimentation détermine en grande mesure la composition en acide gras du tissu adipeux (*e.g.* chez les oiseaux, West et Meng 1968, Thomas et George 1975, West et Peyton 1980). Un des principes de marquage classiquement utilisé est l'utilisation d'acide gras n'existant que sous forme de trace dans l'alimentation. Ainsi la nourriture donnée à nos manchots pourrait être enrichie d'un acide gras non présent initialement dans les poissons (*e.g.* acide linoléique). Cet acide gras spécifique pourrait être révélé par chromatographie gazeuse, après extraction des lipides totaux (Folch et al. 1957) sur un prélèvement de TASC fait au bon moment (voir section suivante).

Il est à noter que cette approche avait été tentée en expérimentations préliminaires avec l'injection d'huile de ricin dans les poissons avant l'alimentation des manchots. Cependant, ayant sous-estimé l'effet laxatif de l'huile, cette approche a dû être abandonnée rapidement.

B- Activité de stockage en lien avec les températures périphériques

Idéalement, deux prélèvements de TASC seraient nécessaires pour établir le lien entre la réaugmentation des températures périphériques et le stockage d'acide gras dans le TASC (étape (ii)). Ces prélèvements devraient être effectués 'simplement' avant et après une réaugmentation des températures périphériques. La technique se base donc sur le fait d'effectuer ces deux prélèvements espacés de quelques minutes ou heures sur chaque individu, et de confronter le **taux d'enrichissement** de l'acide gras traceur en l'occurrence ou non d'un épisode de normothermie. Si ce principe est simple, l'application l'est beaucoup moins. Il faudrait idéalement : (1) mesurer la température périphérique en temps réel, afin de savoir à quel moment prélever (*i.e.* avant et après une augmentation du tissu périphérique) et (2) effectuer ces deux prélèvements sans perturber la thermorégulation de l'animal.

La grande taille des manchots royaux rend le prélèvement tissulaire possible, même à deux reprises rapprochées, cependant le prélèvement de tissu périphérique (*i.e.* retrait des plumes, incision, sutures), et donc le fait d'induire à la fois un stress important et une dégradation de l'isolation de l'individu lors d'une étude sur la thermorégulation, reste peu pertinent. Si l'on était capable d'effectuer ces prélèvements sans perturbation majeure (*e.g.* à l'image des études faites sur les cétacés, *e.g.* Herman et al. 2005), il conviendrait d'établir des corrélations entre le **taux d'accrétion** horaire du traceur et la moyenne de température du tissu concerné par le prélèvement.

Une toute autre approche pourrait être envisagée en laboratoire, sur des prélèvements de TASC frais. Il serait, en effet, également très intéressant d'étudier (indépendamment ou non de l'état nutritionnel des individus) la capacité d'incorporation des lipides au sein du tissu adipeux en fonction de la température du tissu. L'hypothèse sous-jacente à la reperfusion sanguine est que, d'une part cela permette d'amener les lipides au niveau du tissu et que, d'autre part, l'augmentation *per se* de la température du tissu peut via un effet Q_{10} accélérer les processus de transferts inter-membranaires et l'incorporation des lipides dans la gouttelette lipidique de l'adipocyte. Inversement, il existe sans doute une température inférieure seuil pour laquelle, même en présence d'acide gras dans le milieu nutritif des adipocytes, leur transfert et **incorporation** devient impossible. Ainsi, une étude *in vitro* pourrait permettre de mettre en évidence des vitesses d'incorporations différentes en fonction de la température et peut-être même un effet seuil. Cette absence de stockage soutiendrait d'autant plus l'importance de la vasodilatation périphérique après une journée de d'alimentation en mer.

IX

Conclusion



Tout au long de mes trois années de thèse, j'ai pu constater à quel point les adaptations et les stratégies, développées par le manchot royal pour faire face aux contraintes liées au milieu marin, étaient complexes, tant au niveau anatomique, morphologique que physiologique. Aussi, la difficulté majeure de ce travail a été d'appréhender cette complexité de réponses dans la mise en évidence *de la* ou *des* raisons conduisant aux épisodes de normothermie nocturne.

En effet, de nombreux facteurs (*e.g.* succès de capture de proie en mer ou sensibilité au stress en piscine) peuvent influencer ce phénomène, aussi bien en milieu naturel qu'en piscine. De plus, certains paramètres ne peuvent pas être contrôlés même en conditions expérimentales. L'activité de digestion, par exemple, est un processus physiologique que l'on ne peut contrôler ni en mer, ni en captivité.

Par ailleurs, la thermorégulation chez le manchot royal en milieu naturel ne se résume pas uniquement à une production de chaleur. Elle dépend également (i) des ajustements de la quantité de réserve énergétique (*i.e.* épaisseur du tissu adipeux) limitant les pertes de chaleur, (ii) de la vasomotricité sanguine, mécanisme permettant un compromis entre les pertes de chaleur et les besoins énergétiques, (iii) de la production de chaleur par d'autres activités telles que la digestion et la nage, pouvant réduire les coûts de la thermorégulation. Ainsi, ces processus annexes viennent également complexifier la compréhension que nous pouvons avoir du phénomène ciblé (*i.e.* normothermie nocturne) et souligne l'importance de systématiquement le replacer dans son contexte.

La thermorégulation du manchot royal est globalement orientée dans deux directions : l'économie d'énergie (*e.g.* plongée) et la réduction des pertes de chaleur (*e.g.* vasoconstriction périphérique). Par ces mécanismes les oiseaux maintiennent efficacement leur température corporelle à une température optimale pour le fonctionnement de l'organisme. En revanche, la question est désormais de savoir, comment des individus, aussi bien adaptés à réduire les pertes de chaleur, réagiront face aux anomalies résultant du réchauffement climatique ?

En effet, si comme nous l'avons vu tout au long de ce manuscrit de thèse, le manchot royal est tout à fait apte à faire face aux nombreuses contraintes induites par le milieu marin, sa flexibilité phénotypique (West-Eberhard 2005) face aux changements climatiques reste peu connue. Ainsi, une récente étude sur les voyages en mer du manchot royal montre que les anomalies climatiques de l'hémisphère sud affectent non seulement le comportement de plongée à l'échelle de l'individu mais également la dynamique de ses populations (Bost et al. 2015).

Comme décrit au tout début de ce manuscrit (page 4), les échanges thermiques entre l'individu et son environnement vont influencer l'activité de thermorégulation. De plus, ces échanges vont varier entre les milieux, en mer *versus* à terre, tout comme au sein d'un même milieu, à la surface de l'eau *versus* en plongée.

Or, ces échanges de chaleur pourraient être modifiés en raison de l'augmentation des températures ambiantes observées ces dernières années et pourraient devenir contraignants. En effet, l'une de mes études (Chapitre 4) suggère l'utilisation des fenêtres thermiques corporelles (*i.e.* aileron) lors du retour à terre des individus à des fins de dissipation de chaleur dont l'objectif final serait d'éviter des épisodes d'hyperthermie. Cependant, au-delà de cette utilisation, le comportement d'halètement a été observé de plus en plus fréquemment durant la période d'incubation (Figure 48). Ce comportement suggère que dans cet environnement plus chaud, (i) la dissipation de chaleur par les fenêtres thermiques corporelles ne suffit plus, et que (ii) face à l'augmentation de la température corporelle, les individus doivent pratiquer la polypnée thermique qui est une source de pertes hydriques supplémentaires.

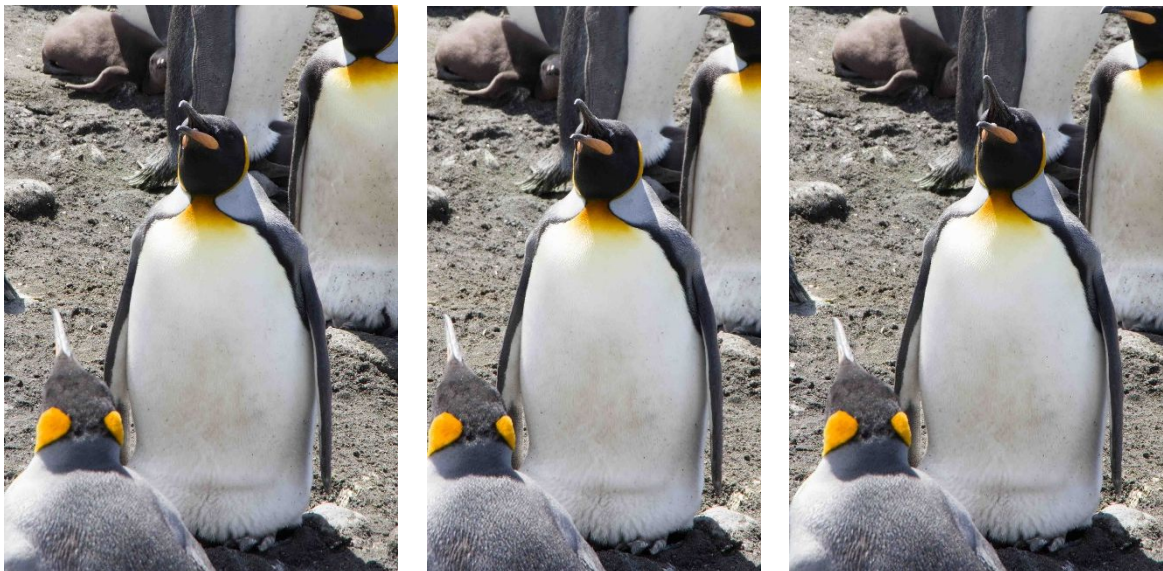


Figure 48: Illustration du comportement d'halètement chez deux individus incubant en colonie de la Baie du Marin en 2017
© F. Chauvet

L'étude de ces nouvelles contraintes (*e.g.* dissipation de chaleur, risque d'hyperthermie) induites par l'augmentation des températures ambiantes et d'autant plus pertinente au moment de l'incubation, lorsque les individus sont contraints de rester à terre. Ainsi, j'ai d'ores et déjà mobilisé le matériel nécessaire pour mesurer ces contraintes et observer les répercussions sur les individus tandis que le protocole et la mise en œuvre de cette étude ont été mis en place en collaboration avec une équipe de chercheurs.

Bibliographie



A

- Andreev, A.V.** (1980). Adaptation of birds in subarctic winter conditions. Academy of Sciences of the Soviet Union. The Far East scientific centre. Institute of the biological problems of the north. Moscow, Russia.
- Alberts, J.R.** (1978). Huddling by rat pups: group behavioral mechanisms of temperature regulation and energy conservation. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **92**, 231-246.
- Allen, J.A.** (1877). The influence of physical conditions in the genesis of species. *Radical Review* **1**, 108-140.
- Ancel, A., Starke, L. N., Ponganis, P. J., Dam, R. V. A. N. and Kooyman, G. L.** (2000). Energetics of surface swimming in Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus Brandt*). *J. Exp. Biol.* **203**, 3727-3731.
- Armitage, K.B.** (1999). Evolution of sociality in Marmots. *J. Mammal.* **80**, 1-10.
- Armitage, K.B and Woods. B.C.** (2003). Group hibernation does not reduce energetic costs of young yellow-bellied marmots. *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 888-898.
- Armitage, K.B., Blumstein, D.T. and Woods, B.C.** (2003). Energetics of hibernation yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **134**, 101-114.
- Aschoff, J.** (1981). Thermal conductance in mammals and birds: its dependence on body size circadian phase. *Comp. Biochem. Physiol.* **64**, 611-619.
- Ashton, K.G.** (2002). Patterns of within-species body size variation of birds: strong evidence for Bergmann's rule. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **11**, 505-524.
- Arnold, W.** (1990). The evolution of marmot sociality: II. Costs and benefits of joint hibernation. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **27**, 2392-46.
- Arnold, W., Heldmaier, G., Ortmann, S., Pohl, H., Ruf, T. and Steinlechner, S.** (1991). Ambient temperatures in hibernacula and their energetic consequences for alpine marmots *M. marmota*. *J. Therm. Biol.* **16**, 223-226.

B

- Barré, H., Geloën, A., Chatonnet, J., Dittmar, A. and Rouanet, J.L.** (1985). Potentiated muscular thermogenesis in cold-acclimated Muscovy Duckling. *Am. J. Physiol.* **249**, 533-538.
- Barré, H., Cohen-Adad, F., Duchamp, C. and Rouanet, J.L.** (1986). Multilocular adipocytes from muscovy ducklings differentiated in response to cold acclimation. *J. Physiol.* **375**, 27-38.
- Battam, H., Chappell, M.A. and Buttemer, W.A.** (2008). The effect of food temperature on postprandial metabolism in albatrosses. *J. Exp. Biol.* **211**, 1093-1101.
- Baudinette, R. V and Gill, P.** (1985). The energetics of flying and paddling in water : locomotion in penguins and ducks. **155**, 373-380.
- Baudinette, R. V., Gill, P. and O'Driscoll, M.** (1986). Energetics of the little penguin, *Eudyptula minor*: temperature regulation, the calorogenic effect of food, and moulting. *Aust. J. Zool.* **34**, 35-45.
- Bech, C. and Præsteng, K. E.** (2004) Thermoregulatory use of heat increment of feeding in the tawny owl (*Strix aluco*). *J. Therm. Biol.* **29**, 649-654.
- Benton, M.J.** (2004). Vertebrate paleontology. Blackwell Publishing, Oxford.
- Bergmann, C.** (1847). Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Göttinger Studien* **1**, 595-708.

- Bethge, P., Nicol, S., Culik, B. M., and Wilson, R. P.** (1997). Diving behaviour and energetics in breeding little penguins (*Eudyptula minor*). *J. Zool. London*. **242**, 483-502.
- Bevan, R. M.** (1989). Oxygen consumption during voluntary diving in the tufted duck, *Aythya fuligula*, acclimated to summer and winter temperatures. *J. Physiol.* **418**, 132.
- Bevan, R.M. and Butler, P.J.** (1992). The effects of temperature on the oxygen consumption, heart rate and deep body temperature during diving in the tufted duck, *Aythya fuligula*. *J. Exp. Biol.* **163**, 139-151.
- Bevan, R. M., Woakes, A. J., Butler, P. J. and Croxall, J. P.** (1995). Heart rate and oxygen consumption of exercising gentoo penguins. *Physiol. Zool.* **68**, 855-877.
- Bevan, R.M., Butler, P.J., Woakes, A.J. and Boyd, I.L.** (2002). The energetics of gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) during the breeding season. *Funct. Ecol.* **16**, 175-190.
- Bicego, K. C., Barros, R. C. H. and Branco, L. G. S.** (2007). Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 616-639.
- Bicudo, J.E.P.W., Bianco, A.C. and Vianna, C.R.** (2002). Adaptive thermogenesis in hummingbirds. *J. Exp. Biol.* **205**, 2267-2273.
- Bierber, C. and Ruf, T.** (2009). Summer dormancy in edible dormice (*Glis glis*) without energetic constraints. *Naturwissenschaftler* **96**, 165-171.
- Blackburn, T.M. and Gaston, K.J.** (1994). The distribution of body sizes of the world's bird species. *Oikos* **70**, 127-130.
- Blackburn, T.M., Gaston, K.J. and Loder, N.** (1999). Geographic gradients in body size: a clarification of Bergmann's rule. *Divers. Distrib.* **5**, 165-174.
- Blaxter, K.M.** (1989). Energy metabolism in animals and man. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bligh, J. and Johnson, K. G.** (1973). Glossary of terms for thermal physiology. *J. Appl. Physiol.* **35**, 941-961.
- Block, B.A.** (1994). Thermogenesis in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 535-577.
- Boersma, P. D.** (1976). An ecological and behavioral study of the Galapagos penguin. *Living Bird*, **15**, 43-93.
- Bost, C.-A. and Le Maho, Y.** (1996). Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **199**, 973-983.
- Bost, C.A., Cotte, C., Terray, P., Barbraud, C., Bon, C., Delord, K., Gimenez, O., Handrich, Y., Naito, Y., Guinet, C. and Weimerskirch, H.** (2015) Large-scale climatic anomalies affect marine predator foraging behaviour and demography. *Nat. Commun.* **6**, 8220
- Bourgeon, S., Viera, V.M., Raclot, T. and Groscolas, R.** (2007). Hormones and immunoglobulin levels in king penguins during moulting and breeding fasts. *Ecoscience* **14**, 519-528.
- Boyd, I. L.** (1997). The behavioural and physiological ecology of diving. *Trends. Ecol. Evol.* **12**, 213-217.
- Boyd, I. L. and Croxall, J. P.** (1996). Dive durations in pinnipeds and seabirds. *Can. J. Zool.* **74**, 1696-1705.
- Boyles, J.G., Storm, J.J. and Brack, V.** (2008). Thermal benefits of clustering during hibernation: a field test of competing hypotheses on *Myotis. sodalis*. *Funct. Ecol.* **22**, 632-636.
- Brigham, R. M.** (1992). Daily torpor in a free-ranging goatsucker, the Common Poorwill (*Phalaenoptilus nuttallii*). *Physiol. Zool.* **65**, 457-472.
- Brody, S.** (1945). Bioenergetics and Growth. Reinhold, New York.
- Broggi, J., Orell, M., Hohtola, E. and Nilsson, J.-A.** (2004). Metabolic response to temperature variation in the great tit : an interpopulation comparison. *J. Anim. Ecol.* **73**, 967-972.
- Bruinzeel, L.W. and Piersma, T.** (1998). Cost reduction in the cold: Heat generated by terrestrial locomotion partly substitutes for thermoregulation costs in Knot *Calidris canutus*. *Ibis* **140**, 323-328.
- Bryant, D. M., and Furness, R. W.** (1995). Basal metabolic rates of North Atlantic seabirds. *Ibis*, **137**(2), 219-226.
- Bush, N.G., Brown, M. and Downs, C.T.** (2008). "Seasonal effects on thermoregulatory responses of the Rock kestrel, *Falco rupicolis*. *J. Therm. Biol.* **33**, 404-412.

- Butler, P.J. and Woakes A.J.** (1984). Heart rate and aerobic metabolism in humbolt penguins (*Sphenicus humboldti*) during voluntary dives. *J. Exp. Biol.* **108**, 419-428.
- Butler, P. J.** (2000). Energetic costs of surface swimming and diving of birds. *Physiol. Biochem. Zool.* **73**, 699-705.
- Butler, P. J.** (2001). Diving beyond the limits. *News. Physiol. Sci.* **16**, 222-227.
- Butler, P. J.** (2004). Metabolic regulation in diving birds and mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **141**, 297-315.
- Butler, P. J.** (2006). Aerobic dive limit. What is it and is it always used appropriately ? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **145**, 1-6.

C

- Calder, W.A. and King, J.R.** (1974). Thermal and caloric relations of birds. In: *Avian biology*, ed. D.S. Farner and J.R. King. Academic Press, New York. Vol 4 pp 259.
- Canals, M., Rosenmann, M. and Bozinovic, F.** (1997). Geometrical aspects of the energetic effectiveness of huddling in small mammals. *Acta Theriol.* **42**, 321-328.
- Canals, M., Rosenmann, M., Novoa, F.F. and Bozinovic, F.** (1998). Modulating factors of the energetic effectiveness of huddling in small mammals. *Acta Theriol.* **43**, 337-348.
- Cannon, B. and Nerdergaard, J.** (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277-359.
- Canterbury, G.** (2002). Metabolic adaptation and climatic constraints on winter bird distributions. *Ecology* **83**, 946-957.
- Casler, C. L.** (1973). The air-sac systems and buoyancy of the anhinga and double-crested cormorant. *Auk* **90**, 324-340.
- Cavagna, G.A., Saibene, F., and Margaria, R.** (1963). External work in walking. *J. Appl. Physiol.* **18**, 1-9.
- Cendron, J.** (1952). Une visite hivernale à une rookerie de Manchots empereurs. *La Terre et la Vie*, **2**, 101-108.
- Chang, B., Croson, M., Straker, L., Gart, S., Dove, C., Gerwin, J. and Jung, S.** (2016). How seabirds plunge-dive without injuries. *PNAS.* **113**, 12006-12011.
- Chappell, M. A. and Souza, S. L.** (1988). in Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*). *J.Comp. Physiol. B.* **157**, 783-790.
- Chappell, M. A., Shoemaker, V. A., Jones, D. N. and Maloney, S. K.** (1993). Diving behavior during foraging in breeding Adelie penguins. *Ecology* **74**, 1204-1215.
- Chappell, M. A., Bachman, G. C. and Hammond, K. A.** (1997). The heat increment of feeding in house wren chicks : magnitude, duration, and substitution for thermostatic costs. *J. Comp. Physiol. B* **167**, 313-318.
- Charnov, E.L.** (1976). Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theor. Popul. Biol.* **9**, 129-136.
- Charrassin, J. B. and Bost, C. A.** (2001). Utilisation of the oceanic habitat by king penguins over the annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **221**, 285-297.
- Charrassin, J.B., Le Maho, Y. and Bost, C.A.** (2002). Seasonal changes in the diving parameters of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Mar. Biol.* **141**, 581-589.
- Cherel, Y. and Le Maho, Y.** (1985). Five months of fasting in king penguin chicks: body loss and fuel metabolism. *Am. J. Physiol.* **249**, 387-392.
- Cherel, Y., Stahl, J. and Le Maho, Y.** (1987). Ecology and physiology of fasting in King Penguin chicks. *Auk* **104**, 254-262.
- Cherel, Y., Leloup, J. and Le Maho, Y.** (1988a). Fasting in king penguin. II. Hormonal and metabolic changes during molt. *Am. J. Physiol.* **254**, 178-184.

- Cherel, Y., Robin, J. P., Walch, O., Karmann, H., Netchitailo, P. and Le Maho, Y.** (1988b). Fasting in king penguin. I. Hormonal and metabolic changes during breeding. *Am. J. Physiol.* **254**, 170-177.
- Cherel, Y., and Ridoux, V.** (1992). Prey species and nutritive value of food fed during summer to King Penguin *Aptenodytes patagonica* chicks at Possession Island, Crozet Archipelago. *Ibis.* **134**, 118-127.
- Cherel, Y., Charrassin, J.B. and Handrich, Y.** (1993). Comparison of Body Reserve Buildup in Prefasting Chicks and Adults of King Penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Physiol. Zool.* **66**, 750-770.
- Cherel, Y., Gilles, J., Handrich, Y. and Le Maho, Y.** (1994). Nutrient reserve dynamics and energetics during longterm fasting in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Zool.* **234**, 1-12.
- Cherel, Y., Tremblay, Y., Guinard, E., and Georges, J.Y.** (1999). Diving behaviour of female northern rockhopper penguins, *Eudyptes chrysocome moseleyi*, during the brooding period at Amsterdam Island (Southern Indian Ocean). *Mar. Biol.* **134**, 375-385.
- Cherel, Y. and Groscolas, R.** (2014). Nutrient Storage and Utilisation in Birds S01. 2 : Relationships between nutrient storage and nutrient utilisation in long-term fasting birds and mammals. 1-10.
- Cooper, S.J. and Swanson D.L.** (1994). Seasonal acclimatization of thermoregulation in the black-capped chickadee. *Condor* **96**, 638-646.
- Cooper, S.J.** (1999). The thermal and energetic significance of cavity roosting in mountain chickadees and juniper titmice. *Condor* **101**, 863-866.
- Cooper, S.J.** (2002). Seasonal metabolic acclimatization in mountain chickadees and juniper titmice. *Physiol. Biochem. Zool.* **75**, 386-395.
- Corbel, H., Morlon, F. and Groscolas, R.** (2008) Is fledging in king penguin chicks related to changes in metabolic or endocrinal status? *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**, 804-813.
- Costa, D. P. and Kooyman, G. L.** (1984). Contribution of specific dynamic action to heat balance and thermoregulation in the sea otter *Enhydra lutris*. *Physiol. Zool.* **57**, 199-203.
- Costa, D.P.** (1991) Reproductive and foraging energetics of high latitude penguins, albatrosses and pinnipeds: implications for life history patterns. *Am. Zool.* **31**, 111-130.
- Croll, D. A. and McLaren, E.** (1993). Diving metabolism and thermoregulation in common and thick-billed murre. *J. Comp. Physiol. B* **163**, 160-166.
- Croxall, J. P., Briggs, D. R., Kato, A., et al.** (1993). Diving pattern and performance in the macaroni penguin *Eudyptes chrysolophus*. *J. Zool.* **230**, 31-47.
- Culik, B. M. and Wilson, R. P.** (1991). Swimming energetics and performance of instrumented Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*). *J. Exp. Biol.* **158**, 355-368.
- Culik, B. M., Wilson, R. P. and Bannasch, R.** (1994). Underwater swimming at low energetic cost by Pygoscelid penguins. *J. of Exp. Biol.* **197**, 65-78.
- Culik, B. M., Pütz, K., Wilson, R. P., Allers, D., Lage, J.,**
- Culik, B. M., Hennicke, J. and Martin, T.** (2000). Humboldt penguins out manoeuvring El Nino. *J. Exp. Biol.* **203**, 2311-2322.

D

- Daan, S., Masman, D. and Groenewold, A.** (1990) Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. *Am. J. Physiol* **259**, 333-340.
- Danner, R. M. and Greenberg, R.** (2015). A critical season approach to Allen 's rule : bill size declines with winter temperature in a cold temperate environment. **42**, 114-120.
- Dassis, M., Rodríguez, D. H., Ieno, E. N., Denuncio, P. E., Loureiro, J. and Davis, R. W.** (2014). Resting metabolic rate and heat increment of feeding in juvenile South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **168**, 63-68.
- Dawson, W.R. and O'Connor, T.P.** (1996) Energetic features of avian thermoregulatory responses. In: *Avian energetics and nutritional ecology*, ed. C. Carey, Chapman and Hall. New York, N.C. pp 85-124.

- Dawson, C., Vincent, J.F.V., Jeronimidis, G., Rice, G. and Forshaw, P.** (1999). Heat transfer through penguin feathers. *J. Theor. Biol.* **199**, 291-295.
- Dawson, W. R., and Whittow G.C.** (2000). Regulation of Body Temperature. In: *Avian Physiology* ed. Sturkie's. pp 343-390.
- Dejours, P.** (1987). Water and air physical characteristics and their physiological consequences. In *Comparative Physiology: Life in Water and on Land* (ed. P. Dejours, L. Bolis, C. R. Taylor and E. R. Weibel), pp. 3-11. Berlin: Springer Verlag.
- Delord, K., Barbraud, C. and Weimerskirch, H.** 2004. Long-term trends in the population size of king penguins at Crozet archipelago: Environmental variability and density dependence? *Polar. Biol.* **27**, 793-800.
- Despin, B., Le Maho, Y. and Schmitt, M.** (1978) Mesures de températures périphériques par thermographie infrarouge chez le manchot de Humboldt (*Spheniscus humboldti*). *Oiseau. Rev. Fr. Ornithol.* **48**, 151-158
- de Vries, J. and van Eerden, M. R.** (1995). Thermal Conductance in Aquatic Birds in Relation to the Degree of Water Contact, Body Mass, and Body Fat: Energetic Implications of Living in a Strong Cooling Environment. *Physiol. Zool.* **68**, 1143-1163.
- Doucette, L.I. and Geiser, F.** (2008) Seasonal variation in thermal energetics of the Australian owl-nightjar (*Aegotheles cristatus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part. A* **151**, 615-620.
- Duchamp, C., Barre, H., Delage, D., Rouanet, J.L., Cohen-Adad, F. and Minaire, Y.** (1989) Nonshivering thermogenesis and adaptation to fasting in king penguin chicks. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **257**, 744-751.
- Duchamp, C., Barre, H., Rouanet, J.L., Lanni, A., Cohen-Adad, F., Berne, G. and Brebion, P.** (1991) Nonshivering thermogenesis in king penguin chicks. I. Role of skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **261**, R1438-R1445.
- Duchamp, C., Marmonier, F., Denjean, F., Lachuer, J., Eldershaw, T.P., Rouanet, J.L., Morales, A., Meister, R., Benistant, C., Roussel, D. and Barré, H.** (1999) Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle nonshivering thermogenesis. *Ornis. Fenn.* **76**, 151-165.
- Duke, G.E., Reynhout, J., Tereick, A.L., Place, A. E. and Bird, D. M.** (1997). Gastrointestinal morphology and motility in American kestrels receiving high or low fat diets. *Condor* **99**, 123-131.



- Eichhorn, G., Groscolas, R., Le Glaunec, G., Parisel, C., Arnold, L., Medina, P. and Handrich, Y.** (2011). Heterothermy in growing king penguins. *Nat. Commun.* **2**, 435.
- Elliott, K. H., Davoren, G. K. and Gaston, A. J.** (2007). The influence of buoyancy and drag on the dive behaviour of an Arctic seabird, the Thick-billed Murre. **361**, 352-361.
- Elliott, K. H., Ricklefs, R. E., Gaston, A. J., Hatch, S. A., Speakman, J. R. and Davoren, G. K.** (2013). High flight costs, but low dive costs, in auks support the biomechanical hypothesis for flightlessness in penguins. **110**, 9380-9384.
- Enstipp, M. R., Grémillet, D. and Lorentsen, S.-H.** (2005). Energetic costs of diving and thermal status in European shags (*Phalacrocorax aristotelis*). *J. Exp. Biol.* **208**, 3451-3461.
- Enstipp, M.R., Grémillet, D. and Jones, D.R.** (2006). The effects of depth, temperature and food ingestion on the foraging energetics of a diving endotherm, the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *J. Exp. Biol.* **209**, 845-859.
- Enstipp, M.R., Grémillet, D. and Jones, D.R.** (2007) Investigating the functional link between prey abundance and seabird predatory performance. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **331**, 267-279.
- Enstipp, M. R., Grémillet, D. and Jones, D. R.** (2008). Heat increment of feeding in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) and its potential for thermal substitution. *J. Exp. Biol.* **211**, 49-57.

F

- Fahlman, A., Handrich, Y., Woakes, A. J., Bost, C.A., Holder, R., Duchamp, C. and Butler, P. J.** (2004). Effect of fasting on the VO₂ -fh relationship in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, 870-877.
- Fahlman, A., Schmidt, A., Handrich, Y., Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (2005). Metabolism and thermoregulation during fasting in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*, in air and water. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, 670-679.
- Felder G., Crenner, F. and Grenner, J.-F.** (1984). Intestinal motility and continuous enteral nutrition : an electromyographic study in dogs. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **8**, 599-603.
- Fish, F. E.** (2016). Integrative and Comparative Biology Secondary Evolution of Aquatic Propulsion in Higher Vertebrates : Validation and Prospect. **56**, 1285-1297.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley GH.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Froget, G., Butler, P. J., Handrich, Y. and Woakes, A.J.** (2001). Heart rate as an indicator of oxygen consumption: influence of body condition in the king penguin. *J. Exp. Biol.* **204**, 2133-2144.
- Froget, G., Handrich, Y., Le Maho, Y., Rouanet, J.L., Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (2002). The heart rate/oxygen consumption relationship during cold exposure of the king penguin: a comparison with that during exercise. *J. Exp. Biol.* **205**, 2511-2517.
- Froget, G., Butler, P. J., Woakes, A.J., Fahlman, A., Kuntz, G., Le Maho, Y. and Handrich, Y.** (2004). Heart rate and energetics of free-ranging king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *J. Exp. Biol.* **207**, 3917-3926.
- Frost, P.G.H., Siegfried, W.R. and Burger, E.A.** (1976) Behavioural adaptations of the Jackass Penguin *Spheniscus demersus* to a hot, arid environment. *J. Zool.* **179**:165-187.

G

- Gabrielsen, G. W., Mehlum, F. and Karlsen, H. E.** (1988). Thermoregulation in four species of arctic seabirds. *J. comp. Physiol. B* **157**, 703-708.
- Garthe, S., Benvenuti, S. and Montevecchi, W.A.** (2000). Pursuit plunging by northern gannets (*Sula bassana*) feeding on capelin (*Mallotus villosus*). *Proc. Biol. Sci.* **267**, 1717-1722.
- Garthe, S., Guse, N., Montevecchi, W. A., Rail, J. and Grégoire, F.** (2013). The daily catch : Flight altitude and diving behavior of northern gannets feeding on Atlantic mackerel. *J. Sea. Res.* **1**, 1-7.
- Garthe, S., Guse, N., Montevecchi, W.A., Rail, J.F. and Grégoire, F.** (2014). The daily catch: Flight altitude and diving behavior of northern gannets feeding on Atlantic mackerel. *J. Sea. Res.* **85**, 456-462.
- Gauthier-clerc, M., Le Maho, Y., Clerquin, Y., Drault, S., Griffin, T. M. and Kram, R.** (2000). Penguin fathers preserve food for their chicks. *Nature* **408**, 928-929.
- Gauthier-Clerc, M., Le Maho, Y., Gendner, J.P., Durant, J. and Handrich, Y.** (2001) State-dependent decisions in long-term fasting King penguins, *Aptenodytes patagonicus*, during courtship and incubation. *Anim. Behav.* **62**, 661-669.
- Gauthier-Clerc, M., Mangin, S., Le Bohec, C., Gendner, J-P. and Le Maho, Y.** (2003) Comparison of behaviour, body mass, haematocrit level, site fidelity and survival between infested and non-infested king penguin *Aptenodytes patagonicus* by ticks *Ixodes uriae*. *Polar. Biol.* **26**, 379-382.
- Geiser, F. and Ruf, T.** (1995). Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiol. Zool.* **68**, 935-966.

- Geiser, F.** (2004). The role of torpor in the life of Australian arid zone mammals. *Aust. Mammal.* **26**, 125-134.
- Geiser, F. and Drury, R. L.** (2003). Radiant heat affects thermoregulation and energy expenditure during rewarming from torpor. *J. Comp. Physiol. B.* **173**, 55-60.
- Geiser, F., Currie, S. E., O'Shea, K. A. and Hiebert, S. M.** (2014). Torpor and hypothermia: reversed hysteresis of metabolic rate and body temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, 1324-1329.
- Gibert, C.** (2006). Le comportement de thermorégulation sociale : son importance pour l'économie d'énergie. Thèse d'université, Université Louis Pasteur, Strasbourg, pp 245.
- Gilbert, C., Robertson, G., Le Maho, Y., Naito, Y. and Ancel, A.** (2006) Huddling behavior in emperor penguins: dynamics of huddling. *Physiol. Behav.* **88**, 479-488.
- Gilbert, C., McCafferty, D., Le Maho, Y., Martrette, J., Giroud, S., Blanc, S. and Ancel, A.** (2010). One for all and all for one: the energetic benefits of huddling in endotherms. *Biol. Rev.* **85**, 545-569.
- Gilles, R.** (2012). *Physiologie Animale*. ed. de Boeck.
- Gleiss, A. C., Wilson, R. P. and Shepard, E. L. C.** (2011) Making dynamic body acceleration work: on the theory of acceleration as a proxy for energy expenditure. *Methods Ecol. Evol.* **2**, 23-33.
- Green, J. A., Butler, P. J., Woakes, A. J. and Boyd, I. L.** (2003). Energetics of diving in macaroni penguins. *J. Exp. Biol.* **206**, 43-57.
- Green, J. A., Boyd, I. L., Woakes, A. J., Green, C. J. and Butler, P. J.** (2005). Do seasonal changes in metabolic rate facilitate changes in diving behaviour? *J. Exp. Biol.* **208**, 2581-2593.
- Green, K., Williams, R. and Green, M.** (1998). Foraging ecology and diving behaviour of macaroni penguins *Eudyptes chrysolophus* at Heard Island. *Mar. Ornithol.* **26**, 27-34.
- Green, J. A. and Frappell, P.** (2006). Physiological response to feeding in Little Penguins. *Physiol. Biochem. Zool.* **79**, 1088-1097.
- Green, J.A.** (2011). The heart rate method for estimating metabolic rate: a review and recommendations. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **158**, 287-304.
- Greenberg, R., Cadena, V., Danner, R.M. and Tattersall, G.** (2012). Heat loss may explain bill size differences between birds occupying different habitats. *PLoS ONE*, **7**, 40933.
- Grémillet, D., Kuntz, G., Woakes, A.J., Gilbert, C., Robin, J.P., Le Maho, Y. and Butler, P.J.** (2005) Year-round recordings of behavioural and physiological parameters reveal the survival strategy of a poorly insulated diving endotherm during the Arctic winter. *J. Exp. Biol.* **208**, 4231-4241.
- Groscolas, R. and Robin, J. P.** (2001). Long-term fasting and refeeding in penguins. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **128**, 645-655.
- Groscolas, R., Viera, V., Guerin, N., Handrich, Y. and Côté, S.D.** (2010) Heart rate as a predictor of energy expenditure in undisturbed fasting and incubating penguins. *J. Exp. Biol.* **213**, 153-160.

H

- Hagan, A.A. and Heath, J.E.** (1980). Regulation of heat loss in the duck by vasomotion in the bill. *J. Therm. Biol.* **5**, 95-101.
- Halsey, L. G., Handrich, Y., Fahlman, A., Schmidt, A., Bost, C. A., Holder, R. L., Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (2007). Fine-scale analyses of diving energetics in king penguins *Aptenodytes patagonicus*: How behaviour affects costs of a foraging dive. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **344**, 299-309.
- Halsey, L. G., Handrich, Y., Rey, B., Fahlman, A., Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (2008). Recovery from swimming-induced hypothermia in king penguins: effects of nutritional condition. *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 434-441.

- Halsey, L. G., Butler, P. J., Fahlman, A., Bost, C. A. and Handrich, Y.** (2010). Changes in the foraging dive behaviour and energetics of king penguins through summer and autumn: A month by month analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **401**, 279-289.
- Halsey, L.G., White, C. R., Enstip, M.R., Wilson, R. P., Butler, P. J., Martin, G. R., Grémillet, D. and Jones D.R.** (2011a). Assessing the validity of the accelerometry technique for estimating the energy expenditure of diving double-crested cormorants *Phalacrocorax auritus*. *Physiol. Biochem. Zool.* **84**, 230-237.
- Halsey, L. G., Shepard, E.L.C. and Rory P. Wilson** (2011b). Assessing the development and application of the accelerometry technique for estimating energy expenditure. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **158**, 305-314.
- Handrich, Y., Bevan, R. M., Charrassin, J.-B., Butler, P. J., Putz, K., Woakes, A. J., Lage, J. and Le Maho, Y.** (1997). Hypothermia in foraging king penguins. *Nature* **388**, 64-67.
- Haney, J.C. and Stone, A.E.** (1988). Seabird foraging tactics and water clarity: are plunge divers really in the clear? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **49**, 1-9.
- Halsey, L. G., Butler, P. J. and Blackburn, T. M.** (2006). A phylogenetic analysis of the allometry of diving. *Am. Nat.* **167**, 276-287.
- Hart, J.S.** (1971). Rodents. In: *Comparative physiology of thermoregulation* in Mammals, ed. G.C. Whittow. New York: Academic Press. Vol 2 pp 1-149
- Hayes, J.P. and Garland, T. Jr.** (1995). The evolution of endothermy: Testing the aerobic capacity model. *Evolution*, **49**, 836-847.
- Hawkins, P., Butler, P., Woakes, A. and Gabrielsen, G.** (1997). Heat increment of feeding in Brunnich's guillemot. *J. Exp. Biol.* **200**, 1757-1763.
- Hays, G.C., Houghton, J.D.R. and Myers, A.E.** (2004). Endangered species—pan- Atlantic leatherback turtle movements. *Nature* **429**, 522-522.
- Heath, J. P., Gilchrist, H. G., and Ydenberg, R. C.** (2006). Regulation of stroke pattern and swim speed across a range of current velocities: diving by common eiders wintering in polynyas in the Canadian Arctic. *J. Exp. Biol.* **209**, 3974-3983.
- Herborn, K. A., Graves, J. L., Jerem, P., Evans, N. P., Nager, R., McCafferty, D. J. and McKeegan, D. E. F.** (2015). Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiol. Behav.* **152**, 225-230.
- Herman, D. P., Burrows, D. G., Wade, P. R., Durban, J. W., Matkin, C. O., LeDuc, R. G., Barret-Lennard, L.G. and Krahn, M. M.** (2005). Feeding ecology of eastern North Pacific killer whales *Orcinus orca* from fatty acid, stable isotope, and organochlorine analyses of blubber biopsies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **302**, 275-291.
- Hick, O., Burthe, S., Daunt, F., Butler, A., Bishop, C. and Green J.** (2017). Validating accelerometry estimates of energy expenditure across behaviours using heart rate data in a free-living seabird. *J. Exp. Biol.* **220**, 1875-1881.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. and Jarvis, A.** (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* **25**, 1965-1978.
- Hill, R.W., Wyse, G.A. and Anderson, A.** (2004). "Animal Physiology- Chapter 8: Thermal relations". Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A. pp 191-239.
- Himms-Hagen, J.** (1972). Lipid metabolism during cold-exposure and during cold-acclimation. *Lipids* **7**, 310-323.
- Hogstad, O.** (1989). Social Organization and Dominance Behavior in Some Parus Species. *Wilson. Bull.* **101**, 254-262.
- Hohtola, E.** (2002). Facultative and obligatory thermogenesis in young birds: a cautionary note. *Comp. Biochem. Physiol. A* **131**, 733-739.
- Hohtola, E.** (2004). Shivering thermogenesis in birds and mammals. ? In: *Life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation and application*, ed. B.M. Barnes and H. V. Carey. 12th international hibernation symposium Fairbanks, Inst. Arctic Biol., Univ. Alaska, pp 241-252.
- Houston, A.I. and Carbone, C. C.** (1992). The optimal allocation of time during the diving cycle. *Behav. Ecol.* **3**, 255-265.

- Hui, C.A.** (1988) Penguin swimming II. Energetics and behaviour. *Physiol. Zool.* **61**, 344-350.
- Hull, C. L.** (2000). Comparative diving behaviour and segregation of the marine habitat by breeding royal penguins, *Eudyptes schlegeli*, and eastern rockhopper penguins, *Eudyptes chrysocome filholi*, at Macquarie Island. *Can. J. Zool.* **78**, 333-345.
- Humphries, M. M. and Careau, V.** (2011). Heat for nothing or activity for free? Evidence and implications of activity-thermoregulatory heat substitution. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 419-31.
- Hustler, K.** (1992). Buoyancy and its constraints on the underwater foraging behaviour of the reed cormorants *Phalacrocorax africanus* and darters *Anhinga melanogaster*. *Ibis* **134**, 229-236.
- Innes, S., Worthy, G.A.J., Lavigne, D.M. and Ronald, K.** (1990). Surface areas of phocid seals. *Can. J. Zool.* **68**, 2531-2538.

J

- Janes, D. N. and Chappell, M. A.** (1995). The effect of ration size and body size on specific dynamic action in Adélie penguin chicks, *Pygoscelis adeliae*. *Physiol. Zool.* **68**, 1029-1044.
- Jansky, L.** (1973). Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol. Rev.* **48**, 85-132.
- Jansky, L.** (1998). Shivering. In: *Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation*, ed. C, Blatteis. World Scientific, Singapore, pp 47-59.
- Jarman, M.** (1973). Experiments on the Emperor Penguin, *Aptenodytes forsteri*, in various thermal environments. *Br. Antarct. Surv. Bull.*, **33**, 57-63.
- Jensen, R. N. M., Ekker, M. and Bech, C.** (1989). Thermoregulation in winter-acclimatized common eiders (*Somateria mollissima*) in air and water. *Can. J. Zool.* **67**, 669-673.
- Jerem, P., Herborn, K., McCafferty, D., McKeegan, D. and Nager, R.** (2015). Thermal imaging to study stress non-invasively in unrestrained Birds. *JoVE* 105.

K

- Karasov, W. H., Brittingham, M. C. and Temple, S. A.** (1992). Daily energy and expenditure by Black-Capped Chickadees (*Parus atricapillus*) in winter. *Auk* **109**, 393-395.
- Kaseloo, P.A and Lovvorn, J.R.** (2003). Heat increment of feeding and thermal substitution in mallard ducks feeding voluntarily on grain. *J. Comp. Physiol. B* **173**, 207-213
- Kaseloo, P. A. and Lovvorn, J. R.** (2005). Effects of surface activity patterns and dive depth on thermal substitution in fasted and fed lesser scaup (*Aythya affinis*) ducks. *Can. J. Zool.* **83**, 301-311.
- Kaseloo, P. A. and Lovvorn, J. R.** (2006). Substitution of heat from exercise and digestion by ducks diving for mussels at varying depths and temperatures. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **176**, 265-275.
- Klaassen, M., Bech, C. and Slagsvold, G.** (1989). Basal metabolic rate and thermal conductance in Arctic tern chicks and the effect of heat increment of feeding on thermoregulatory expenses. *Ardea* **77**, 193-200.
- Klasing, K. C.** (1998). *Comparative avian nutrition*. - CAB International, New York.
- King, F.W.** (1982). Historical review of the decline of the green turtle and the hawksbill. In: *Biology and conservation of sea turtles*, ed. by K.A. Bjorndal. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. pp 183-188.
- Kooyman, G. L., Wahrenbrock, E. A., Castellini, M. A., Davis, R. W. and Sinnett, E. E.** (1980). Aerobic and anaerobic metabolism during voluntary diving in Weddell seals: Evidence of preferred

- pathways from blood chemistry and behavior. *J. Comp. Physiol. B* **138**, 335-346.
- Kooyman, G. L., Croxall, J. P. and Costa, D. P.** (1982) Diving depths and energy requirements of king penguins. *Science* **217**, 726-727.
- Kooyman, G.L., Castellini, M.A., Davis, R.W. and Maue, R.A.** (1983). Aerobic diving limits of immature Weddell seals. *J. Comp. Physiol.* **151**, 171-174.
- Kooyman, G. L.** (1989). Diverse divers, physiology and behavior. Berlin: Springer-Verlag.
- Kooyman, A. G. L., Cherel, Y., Le Maho, Y., Croxall, J. P., Thorson, P. H., Ridoux, V., Kooyman, C. A., Monographs, S. E. and Mar, N.** (1992a). Diving Behavior and Energetics During Foraging Cycles in King Penguins Published by : *Ecol. Monogr.* **62**, 143-163.
- Kramer, D.L.** (1988). The behavioural ecology of air breathing by aquatic animals. *Can. J. Zool.* **66**, 89-94.
- Kuhn, R.** (2009). Comparative analysis of structural and functional hair coat characteristics, including heat loss regulation, in the Lutrinae (*Carnivora: Mustelidae*). PhD Thesis. University of Hamburg, Hamburg, Germany.

L

- La Barbera, K., Hayes, K.R., Marsh, K.J. and Lacey, E.A.** (2017). Complex relationship among environmental conditions and bill morphology in a generalist songbird. *Evol. Ecol.* **1**-18.
- Lefevre, J.** (1911). Chaleur animale et bioénergétique. Masson, Paris.
- Le Maho, Y., Delclitte, P. and Chatonnet J.** (1976). Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *Am. J. Physiol.* **231**, 913-922.
- Le Maho, Y. and Despin, B.** (1976). Réduction de la dépense énergétique au cours du jeûn chez le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*).
- Le Maho, Y.** (1983). Metabolic adaptation to long-term fasting in antarctic penguins and domestic geese. *J. Therm. biol.* **8**, 91-96.
- Le Maho, Y., Robin, J.P. and Cherel, Y.** (1988). Starvation as a treatment for obesity: the need to conserve body protein. *News. Physiol. Sci.* **3**, 21-24.
- Le Maho, Y., Gendner, J.P., Challet, E., Bost, C.A. and 5 others** (1993) Undisturbed breeding penguins as indicators of changes in marine resources. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **95**, 1-6.
- Le Ninan, F., Cherel, Y., Robin, J. P., Leloup, J. and Le Maho, Y.** (1988). Early changes in plasma hormones and metabolites during fasting in king penguin chicks. *J. Comp. Physiol. B.* **158**, 395-401.
- Lescroel, A. and Bost, C.-A.** (2005). Foraging under contrasting oceanographic conditions: the gentoo penguin at Kerguelen Archipelago. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **302**, 245-261.
- Lewden, A., Petit, M. and Vézina, F.** (2012). Dominant black-capped chickadees pay no maintenance energy costs for their wintering status and are not better at enduring cold than subordinate individuals. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **182**, 381-392.
- Lewden, A., Nord, A., Petit, M., and Vézina, F.** (2017a). Body temperature responses to handling stress in wintering Black-capped Chickadees (*Poecile atricapillus L.*). *Physiol. Behav.* **179**, 49-54.
- Lewden, A., Enstipp, M.R., Picard, B., van Walsum, T. and Handrich, Y.** (2017b). High peripheral temperatures in king penguins while resting at sea: thermoregulation versus fat deposition. *J. Exp. Biol.* **220**, 3084-3094.
- Lewden, A., Enstipp, M.R., Bonnet, B., Bost, C., Georges, J.Y. and Handrich, Y.** (2017) Thermal strategies of king penguins during prolonged fasting in water. *Submitted in J. Exp. Biol.*
- Lighton, J. R. B.** (2008). Measuring metabolic rates - a manual for scientists. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Lighton, J.R.B. and Halsey, L.G.** (2011). Flow-through respirometry applied to chamber systems: pros and cons, hints and tips. *Comp. Biochem. Physiol. A* **158**, 287-304.

- Limpus, C.J. and Walter, D.G.** (1980). The growth of immature green turtles (*Chelonia mydas*) under natural conditions. *Herpetologica*, **36**, 162-165.
- Liwanag, H.E.M.** (2008) Fur versus blubber: A comparative look at marine mammal insulation and its metabolic and behavioral consequences. PhD thesis. University of California, Santa Cruz.
- Liwanag, H.E.M., Williams, T.M., Costa, D.P., Kanatous, S.B., Davis, R.W. and Boyd, I.L.** (2009). The effects of water temperature on the energetic costs of juvenile and adult California sea lions (*Zalophus californianus*): The importance of skeletal muscle thermogenesis for thermal balance. *J. Exp. Biol.* **212**, 3977-84.
- Liwanag, H.E.M., Oraze, J., Costa, D.P. and Williams T.M.** (2014). Thermal benefits of aggregation in a large marine endotherm: Huddling in California sea lions. *J. Zool.* **393**, 152-159.
- Lovvorn, J. R.** (2001). Upstroke thrust, drag effects, and stroke-glide cycles in wing-propelled swimming by birds. *Amer. Zool.* **41**, 154-165.
- Lovvorn, J. R., Watanuki, Y., Kato, A., Naito, Y. and Liggins, G. A.** (2004). Stroke patterns and regulation of swim speed and energy cost in free-ranging Brünnich ' s guillemots. **207**, 4679-4695.
- Lovvorn, J. R.** (2007). Thermal substitution and aerobic efficiency: measuring and predicting effects of heat balance on endotherm diving energetics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 2079-2093.
- Lowe, P.R.** (1933). On the primitive characters of the penguins, and their bearing on the phylogeny of birds. *Proc. Zool. Soc. Lond.* **103**, 483-538.
- Lucas, A.M. and Stettenheim, P.R.** (1972) Avian anatomy: integument. *Agricultural Handbook*, 362. Agricultural Research Services. Washington, DC, US Department of Agriculture.
- Luschi, P., Hays, G.C., DelSeppia, C., Marsh, R. and Papi, F.** (1998). The navigation feats of green sea turtles migrating from Ascension Island investigated by satellite telemetry. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **265**, 2279-2284.
- Luna-Jorquera, G., and Culik, B. M.** (1999). Diving behaviour of Humboldt penguins *Spheniscus humboldti* in northern Chile. *Mar. Ornithol.*, **27**, 67-76.
- Luna-Jorquera, G. and Culik, B. M.** (2000). Metabolic rates of swimming Humboldt penguins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **203**, 301-309.
- Luther, D. and Greenberg, R.** (2013). Habitat type and ambient temperature contribute to bill morphology.

M

- MacArthur, R. A. and Campbell, K. L.** (1994). Heat increment of feeding and its thermoregulatory benefit in the muskrat (*Ondatra zibethicus*). *J. Comp. Physiol. B* **164**, 141-146.
- Machovsky Capuska, G.E., Dwyer, S.L., Alley, M.R., Stockin, K.A. and Raubenheimer, D.** (2011b). Evidence for fatal collisions and kleptoparasitism while plunge-diving in Gannets. *Ibis* **153**, 631-635.
- Machovsky Capuska, G.E., Vaughn-Hirshorn, R., Wursig, B., Raubenheimer, D.** (2013). Can Gannets Select Their Diving Profile Prior To Submergence? *Notornis* **60**, 255-257.
- Marinho, D. A., Reis, V. M., Alves, F. B., Vilas-boas, J. P., Machado, L., Silva, A. J. and Rouboa, A. I.** (2009). Hydrodynamic drag during gliding in swimming hydrodynamic. *J. Appl. Biochem.* **25**, 253-257.
- Marjoniemi, K.** (2001). Thermogenic mechanisms during the development of endothermy in juvenile birds. In *Biology: Oulu*. **Markussen, N. H., Ryg, M. and Oritsland, N. A.** (1994). The effect of feeding on the metabolic rate in harbour seals (*Phoca vitulina*). *J. Comp. Physiol. B* **164**, 89-93.
- Marsh, R. L. and Dawson, W. R.** (1989). Avian adjustments to cold. In: *Advances in comparative and environmental physiology 4: animal adaptation to cold*, ed. Springer-Verlag, Berlin. pp 206-253.

- Masman, D., Daan, S. and Dietz, M.** (1989). Heat increment of feeding in the kestrel, *Falco tinnunculus*, and its natural seasonal variation. In: Physiology of cold adaptation in birds, ed. C. Bech and R. E. Reinertsen. NewYork, NY, Plenum Press. pp 123-135.
- Mata, A. J., Caloin, M., Michard-Picamelot, D., Ancel, A. and Le Maho, Y.** (2001). Are non-migrant white storks (*Ciconia ciconia*) able to survive a cold-induced fast? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **130**, 93-104.
- Mauck, B., Bilgmann, K., Jones, D. D., Eysel, U., Dehnhardt, G., Zoologie, A., Bochum, R., Bochum, D., Tierphysiologie, I., Köln, U. and al.** (2003). Thermal windows on the trunk of hauled-out seals : hot spots for thermoregulatory evaporation ? *J. Exp. Biol.* **206**, 1727-1738.
- McCafferty, D. J., Moncrieff, J. B. and Taylor, I. R.** (2001). How much energy do barn owls (*Tyto alba*) save by roosting? *J. Therm. Biol.* **26**, 193-203.
- McCafferty, D. J., Currie, J. and Sparling, C. E.** (2007). The effect of instrument attachment on the surface temperature of juvenile grey seals (*Halichoerus grypus*) as measured by infrared thermography. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **54**, 424-436.
- McCafferty, D. J.** (2013). Applications of thermal imaging in avian science. *Ibis.* **155**, 4-15.
- McKechnie, A. E.** (2008). Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: A review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **178**, 235-247.
- McKechnie, A. E., Whitfield, M. C., Smit, B., Gerson, A. R., Smith, E. K., Talbot, W. A. and Wolf, B. O.** (2016). Avian thermoregulation in the heat: efficient evaporative cooling allows for extreme heat tolerance in four southern hemisphere columbids. *J. Exp. Biol.* **219**, 2145-2155.
- McPhail, L.T. and Jones, D.R.** (1999). The autonomic nervous control of heart rate in ducks during voluntary diving. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 164-169.
- McNab, B.K.** (1974). The energetics of endotherms. *Ohio. J. Sci.* **74**, 370-380.
- McNab, B.K.** (2002) Minimizing energy expenditure facilitates vertebrate persistence on oceanic islands. *Ecol. Lett.* **5**, 693-704
- Meiri, S. and Dayan, T.** (2003). On the validity of Bergmann's rule. *J. Biogeogr.*, **30**, 331-351.
- Mendonca, M.** (1983). Movements and feeding ecology of immature green turtles (*Chelonia mydas*) in a Florida Lagoon. *Copeia*, 1013-1023.
- Miller, A. K. and Trivelpiece, W. Z.** 2008. Chinstrap penguins alter foraging and diving behavior in response to the size of their principle prey, Antarctic krill. *Mar. Biol.* **154**, 201-208.
- Mills, K.** (2000). Diving behaviour of two Galapagos penguins *Spheniscus mendiculus*. *Mar. Ornithol.* **28**, 75-79.
- Minamikawa, S., Naito, Y., Sato, K., Matsuzawa, Y., Bando, T. and Sakamoto, W.** (2000). Maintenance of neutral buoyancy by depth selection in the loggerhead turtle, *Caretta caretta*. *J. Exp. Biol.* **203**, 2967-2975.
- Montague, T.** (1985). A maximum dive recorder for little penguins. *Emu*, **85**, 264-267.
- Moore, J.K. and Abbott, M.R.** (2000). Phytoplankton chlorophyll distributions and primary production in the Southern Ocean. *J. Geophys. Res. Ocean.* **105**, 28709-28722.

N

- Nadel, E.R.** (1984). Energy exchanges in water. *Undersea Biomed. Res.* **11**, 149-158.
- Nagy, K.A., Kooyman, G.L. and Ponganis, P.J.** (2001). Energetic cost of foraging in free-diving emperor penguins. *Physiol. Biochem. Zool.* **74**, 541-547.
- Nakamura, K. and Morrison, S. F.** (2008). A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat. Neurosci.* **11**, 62-71.
- Nelson, J.B.** (1978). *The Sulidae: Gannets and Boobies*. Oxford: Oxford University Press.

- Noda, T., Kikuchi, D. M., Takahashi, A., Mitamura, H. and Arai, N.** (2016). Pitching stability of diving seabirds during underwater locomotion : a comparison among alcids and a penguin. *Anim. Biotelemetry* 1-15.
- Norman, F. and Ward, S.** (1993). Foraging group size and dive duration of Adélie penguins *Pygoscelis adeliae* at sea off Hop Island, Rauer group, East Antarctica. *Mar. Ornithol.* **21**, 37-47.
- Olsson, O.** (1997) Clutch abandonment: a state-dependent decision in king penguins. *J. Avian Biol.* **28**, 264-267.

O

- Olsson, O., and A. W. North.** (1997). Diet of the king penguin *Aptenodytes patagonicus* during three austral summers at South Georgia. *Ibis* **139**, 504-513.
- Osvath, G., Daubner, T., Dyke, G., Fuisz, T., Nord, A., Pénczes, J., Vargancsik, D., Vagasi, C., Vincze, O. and Pap, P.** How feathered are birds? Environment predicts both the mass and density of body feathers. Submitted.
- Orians, G.H. and Pearson, N.E.** (1979). On the theory of central place foraging. In : Analysis of ecological systems, ed. D.J., Horn, R.D., Mitchell and G.R., Stairs. Columbus, OH: Ohio State University Press. pp 155-177.
- Owen, E., Daunt, F. and Wanless, S.** (2010). Sampling avian adipose tissue : assessing a nondestructive biopsy technique. **81**, 92–98.

P

- Pabst, D.A., Rommel, S.A. and McLellan, W.A.** (1999). The functional morphology of marine mammals. In: *Biology of Marine Mammals*, ed. Reynolds III, J.E., Rommel, S.A. Smithsonian Institution Press, Washington. pp 15-72.
- Paladino, F.V. and King, J.R.** (1984). Thermoregulation and oxygen consumption during terrestrial locomotion in white-crowned sparrows *Zonotrichia leucophrys gambelii*. *Physiol. Zool.* **57**, 226-263.
- Pap, P.L., Vincze, O., Wekerle, B., Daubner, T., Vagasi, C.I., Nudds, R.L., Dyke, G.J. and Osvath, G.** (2017) A phylogenetic comparative analysis reveals correlations between body feather structure and habitat. *Funct. Ecol. In press.*
- Pérez J-P. and A. M. Romulus A.M.** (1993). *Thermodynamique. Fondements et applications*, Paris, Masson, pp 153.
- Peters, G., Wilson, R. P., Scolaro, J. A., Laurenti, S., Upton, J., and Galleli, H.** (1998). The diving behavior of Magellanic penguins at Punta Norte, Peninsula Valdés, Argentina. *Colonial Waterbirds*, **21**, 1-10.
- Petersen, S. L., Ryan, P. G. and Gremillet, D.** (2006). Is food availability limiting African penguins *Spheniscus demersus* at Boulders? A comparison of foraging effort at mainland and island colonies. *Ibis*, **148**, 14-26.
- Phillips, J. G., Butler, P. J. and Sharp, P. J.** (1985). *Physiological Strategies in Avian Biology*. Glasgow: Blackie.
- Pierce, B. J., McWilliams, S. R., O'Connor, T. P., Place, A. R. and Guglielmo, C. G.** (2005). Effect of dietary fatty acid composition on depot fat and exercise performance in a migrating songbird, the red-eyed vireo. *J. Exp. Biol.* **208**, 1277–1285.
- Piersma, T., Cadee, N. and Daan, S.** (1995) Seasonality in basal metabolic- rate and thermal conductance in a long-distance migrant shorebird, the knot (*Calidris canutus*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **165**, 37-45.

- Ponganis, P. J., Kooyman, G. L., Winter, L. M. and Starke, L. N.** (1997d). Heart rate and plasma lactate responses during submerged swimming and diving in California sea lions (*Zalophus californianus*). *J. Comp. Physiol. B.* **167**, 9-16.
- Ponganis, P. J., Kooyman, G. L., Van Dam, R. P. and Le Maho, Y.** (1999). Physiological responses of King Penguins during simulated diving to 136 m depth. *J. Exp. Biol.* **202**, 2819-2822.
- Ponganis, P. J., Van Dam, R. P., Levenson, D. H., Knower, T., Ponganis, K. V. and Marshall, G.** (2003b). Regional heterothermy and conservation of core temperature in emperor penguins diving under sea ice. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **135**, 477-487.
- Ponganis, P. J., Stockard, T. K., Meir, J. U., Williams, C. L., Ponganis, K. V., van Dam, R. P. and Howard, R.** (2007). Returning on empty: extreme blood O₂ depletion underlies dive capacity of emperor penguins. *J. Exp. Biol.* **210**, 4279-4285.
- Ponganis, P. J., Kreutzer, U., Stockard, T. K., Lin, P., Sailasuta, N., Tran, T., Hurd, R. and Jue, T.** (2008). Blood flow and metabolic regulation in seal muscle during apnea. *J. Exp. Biol.* **211**, 3323-3332.
- Ponganis, P. J., Meir, J. U. and Williams, C. L.** (2010a). Oxygen store depletion and the aerobic dive limit in emperor penguins. *Aquat. Biol.* **8**, 237-245.
- Ponganis, P.J.** (2015) *Diving physiology in marine mammals and seabirds.* Cambridge university press.
- Prévost, J. and Sapin-Jaloustre, J.** (1964). A propos des premières mesures de topographie thermique chez les Sphéniscidés de la Terre Adélie. *L'oiseau et la R.F.O.* **34**, 52-90.
- Putala, A., Hohtola, E. and Hissa, R.** (1995). The effect of group-size on metabolism in huddling grey partridge (*Perdix perdix*). *Comp. Biochem. Physiol. B* **111**, 243-247.
- Pütz, K., Wilson, R.P., Charrassin, J.B., Raclot, T., Lage, J., Le Maho, Y., Kierspel, M.A.M., Culik, B. and Adelung, D.** (1998). Foraging strategy of king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) during summer at the Crozet Islands. *Ecology* **79**, 1905-1921.
- Pütz, K.** (2002). Spatial and temporal variability in the foraging areas of breeding king penguins. *Condor* **104**, 528-538.
- Pütz, K. and Cherel, Y.** (2005). The diving behaviour of brooding king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) from the Falkland Islands: variation in dive profiles and synchronous underwater swimming provide new insights into their foraging strategies. *Mar. Biol.* **147**, 281-290.
- Prinzinger, R., Pressmar, A. and Schleucher, E.** (1991) Body temperature in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* **99**, 499-506
- Quintana, F., Wilson, R. P. and Yorio, P.** (2007). Dive depth and plumage air in wettable birds: the extraordinary case of the imperial cormorant. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **334**, 299-310.

R

- Raclot, T., Groscolas, R. and Cherel, Y.** (1998). Fatty acid evidence for the importance of myctophid fishes in the diet of king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Mar. Biol.* **132**, 523-533.
- Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M. and Ricquier, D.** (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.* **353**, 441-444.
- Reinertsen, R. E.** (1996). Physiological and ecological aspects of hypothermia. In: *Avian energetics and nutritional ecology*, ed. C. Carey, Chapman and Hall. New York. pp 125-157.
- Rey, B., Roussel, D., Romestaing, C., Belouze, M., Rouanet, J. L., Desplanches, D., Sibille, B., Servais, S. and Duchamp, C.** (2010). Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC Physiol.* **10**, 5.
- Richard, D., Anselme, B., Baehr, J.C., Chaffard, J., Méreaux, J., Périlleux, E. and Valet, P.** (1998). *Physiologie des animaux : Construction de l'organisme homéostasie et fonctions de relations.* In: *Fac.sciences*, ed Nathan Université. Tome 2.

- Richman, S. E. and Lovvorn, J. R.** (2008). Costs of diving by wing and foot propulsion in a sea duck, the white-winged scoter. *J. Comp. Physiol. B* **178**, 321-332.
- Richman, S. E. and Lovvorn, J. R.** (2011). Effects of Air and Water Temperatures on Resting Metabolism of Auklets and Other Diving Birds. **84**, 316-332.
- Robinson, S. A. and Hindell, M. A.** (1996). Foraging ecology of gentoo penguins *Pygoscelis papua* at Macquarie Island during the period of chick care. *Ibis*, **138**, 722-731.
- Rocha, A. D., Ara, P. M., Martinho, F. R. and Ramos, J. A.** (2016). A non-lethal biopsy technique for sampling subcutaneous adipose tissue of small and medium-sized birds. **87**, 213–221.
- Rodary, D., Bonneau, W., Le Maho, Y. and Bost, C. A.** (2000). Benthic diving in male emperor penguins foraging in winter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**, 171-181.
- Ropert-Coudert, Y., Kato, A., Naito, Y. and Cannell, B. L.** (2003). Individual diving strategies in the little penguin. *Waterbirds*, **26**, 403-408.
- Ropert-coudert, Y., Cannell, B. and Kato, A.** (2004). Temperature inside nest boxes of little. **32**, 177-182.
- Ropert-Coudert, Y., Chiaradia, A. and Kato, A.** (2006). An exceptionally deep dive by a little penguin *Eudyptula minor*. *Mar. Ornithol.*, **34**, 71-74.
- Rosen, D. A. S. and Trites, A. W.** (2003). No evidence for bioenergetic interaction between digestion and thermo- regulation in Steller sea lions *Eumetopias jubatus*. *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 899-906.
- Roussel, D., Chainier, F., Rouanet, J. and Barré, H.** (2000). Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation. *FEBS Let.t* **477**, 141-144.
- Ruby, N.F.** (2003). Hibernation: when good clocks go cold. *J. Biol. Rhythms.* **18**, 275-286.
- Ruf, T. and Geiser, F.** (2014) Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **90**, 891-926.
- Ruf, T., Streicher, U., Stalder, G.L., Nadler, T., and Walzer, C.** (2015) Hibernation in the pygmy slow loris (*Nycticebus pygmaeus*): multiday torpor in primates is not restricted to Madagascar. *Sci. Rep.* **5**.
- Rutschke, E.** (1965). Beitrage zur morphologie der pinguinfeder. *Z. Morph. u. Okol. Tiere* **55**, 835-858.

S

- Saroux, C., Friess, B., Le Maho, Y. and Le Bohec, C.** (2012). Chick-provisioning strategies used by king penguins to adapt to a multiseasonal breeding cycle. *Anim. Behav.* **84**, 675-683.
- Sato, K., Naito, Y., Kato, A., Niizuma, Y., Watanuki, Y., Charrassin, J. B., Bost, C., Handrich, Y. and Le Maho, Y.** (2002). Buoyancy and maximal diving depth in penguins: do they control inhaling air volume? *J. Exp. Biol.* **205**, 1189-1197.
- Sato, K., Shiomi, K., Marshall, G., Kooyman, G. L. and Ponganis, P. J.** (2011). Stroke rates and diving air volumes of emperor penguins: implications for dive performance. *J. Exp. Biol.* **214**, 2854-2863.
- Schiavani, A. and Rey, A. R.** (2004). Long days, long trips: foraging ecology of female rockhopper penguins *Eudyptes chrysocome chrysocome* at Tierra del Fuego. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **275**, 231-262.
- Schmid, D., Grémillet, D. J. H. and Culik, B. M.** (1995). Energetics of underwater swimming in the great cormorant (*Phalacrocorax carbo sinensis*). *Mar. Biol.* **123**, 875-881.
- Schmidt, A., Alard, F. and Handrich, Y.** (2006). Changes in body temperature in king penguins at sea: the result of fine adjustments in peripheral heat loss? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, 608-618.
- Schmidt-Nielsen, K.** (1979). *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Cambridge University Press, New York.
- Scholander, P.F., Hock, R., Walters, V. and Irving, L.** (1950). Adaptation to cold in arctic and tropical mammals and birds in relation to body temperature, insulation, and basal metabolic rate. *Biol. Bull.* **99**, 259-271.

- Scholander, P. E. and Schevill, W. E.** (1955). Countercurrent vascular heat exchange in the fins of whales. *J. Appl. Physiol.* **8**, 279-282.
- Schreer, J. F. and Kovacs, K. M.** (1997). Allometry of diving capacity in air-breathing vertebrates. *Can. J. Zool.* **75**, 339-358.
- Seagram, R., Adams, N. and Slotow, R.** (2001). Time of feeding and possible associated thermoregulatory benefits in bronze mannikins *Lonchura cucullata*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **130**, 809-818.
- Seddon, P. J. and Vanheezik, Y.** (1990). Diving depths of the yellow-eyed penguin *Megadyptes antipodes*. *Emu*, **90**, 53-57.
- Seebacher, F.** (2009). Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates *J. Exp. Biol.* **212**, 2885-2891.
- Siddall, R., Ancel, A. O., Kovac, M. and Siddall, R.** (2017). Wind and water tunnel testing of a morphing aquatic micro air vehicle. *Interface Focus*, **7**.
- Skora, S.** (1994) Les manchots antarctiques : une adaptation remarquable au milieu polaire. Contribution à l'étude de la thermorégulation chez le manchot empereur et le manchot adélie. Thèse Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 168p.
- Sparling, C. E. and Fedak, M. A.** (2004). Metabolic rates of captive grey seals during voluntary diving. 1615-1624.
- Speakman, J. R. and Ward, S.** (1998). Infrared thermography: principles and applications. *Zoology* **101**, 224-232.
- Stahel, C. D. and Nicol, S. C.** (1982). Temperature regulation in the little penguin, *Eudyptula minor*, in air and water. *J. Comp. Physiol. B* **148**, 93-100.
- Stahel, C. D. and Nicol, S. C.** (1988). Ventilation and oxygen extraction in the little penguin (*Eudyptula minor*), at different temperatures in air and water. *Respir. Physiol.* **71**, 387-398.
- Stawski, C. and Geiser, F.** (2010). Seasonality of torpor patterns and physiological variables of a free-ranging subtropical bat. *J. Exp. Biol.* **213**, 393-399.
- Steinfurth, A., Vargas, F. H., Wilson, R. P., Spindler, M. and Macdonald, D. W.** (2008). Space use by foraging Galapagos penguins during chick rearing. *Endangered Species Research*, **4**, 105-112.
- Stephenson, R., Lovvorn, J. R., Heieis, M. R. A., Jones, D. R. and Blake, R. W.** (1989). A hydromechanical estimate of the power requirements of diving and surface swimming in lesser scaup (*Aythya affinis*). *J. Exp. Biol.* **147**, 507-519.
- Stonehouse, B.** (1960). The king penguin *Aptenodytes patagonica* of South Georgia. I. Breeding behaviour and development. – Falkland Isl. Depend. Survey. Sci. Rep. **23**, 1-81.
- Stonehouse, B.** (1967). The general biology and thermal balances of penguins. In: *Advances in ecological research*, ed. J. B. Cragg. Academic Press, London. Vol. 4 pp 131-196.
- Stonehouse, B.** (1970). Adaptation in polar and subpolar penguins (*Spheniscidae*). In: *Antarctic ecology*, ed. M.W. Holdgate. London, UK: Academic Press. pp 526-541.
- Streicher, U., Nowack, J., Stalder, G., Walzer, C., Nadler, T. and Ruf, T.** (2017) Hibernation in pygmy lorises (*Nycticebus pygmaeus*) – what does it mean? *Vietnamese Journal of Primatology*, **2**, 51–57.
- Swanson, D. L. and Liknes, E. T.** (2006). A comparative analysis of thermogenic capacity and cold tolerance in small birds. *J. Exp. Biol.* **209**, 466-474.
- Swanson, D.L.** (2010). Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates. *Curr. Ornithol.* **17**, 75- 129.

T

- Takahashi, A., Dunn, M. J., Trathan, P. N., Sato, K., Naito, Y., and Croxall, J. P.** (2003). Foraging strategies of chinstrap penguins at Signy Island, Antarctica: importance of benthic feeding on Antarctic krill. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **250**, 279-289.

- Talbot, D. A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J. L., Sibille, B., Brand, M. D. and Int, L. P.** (2004). Uncoupling protein and ATP / ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *1*, 123-135.
- Tarasoff, F. J.** (1973). Anatomical observations of the river otter, sea otter and harp seal with reference to thermal regulation and diving. Dissertation Abstracts International Biological Science and Engineering **34**, 4843.
- Tattersall, G.J., Andrade, D.V. and Abe, A.S.** (2009). Heat exchange from the toucan bill reveals a controllable vascular thermal radiator. *Science* **325**, 468-470.
- Tattersall, G. J., Roussel, D., Voituron, Y. and Tattersall, G. J.** (2016). Novel energy-saving strategies to multiple stressors in birds : the ultradian regulation of body temperature. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **283**, 1551.
- Tattersall, G. J., Arnaut, B., & Symonds, M. R.** (2017). The evolution of the avian bill as a thermoregulatory organ. *Biol.Rev.* **92**, 1630-1656.
- Taylor, C. R.** (1980). Mechanical efficiency of terrestrial locomotion: a useful concept? In: Aspects of animal movement, ed. H. Y. Elder and E. R. Trueman. Cambridge, MA: Cambridge University Press. pp 235-244.
- Teulier, L., Degletagne, C., Rey, B., Tornos, J., Keime, C., de Dinechin, M., Raccurt, M., Rouanet, J.L., Roussel, D. and Duchamp, C.** (2012). Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins: an integrative study. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**, 2464-2472.
- Thaxter, C. B., Wanless, S., Daunt, F., Harris, M. P., Benvenuti, S., Watanuki, Y., Grémillet, D. and Hamer, K. C.** (2010). Influence of wing loading on the trade-off between pursuit-diving and flight in common guillemots and razorbills. *J. Exp. Biol.* **213**, 1018-1025.
- Thomas, V. G. and George, J. C.** (1975). Plasma and depot fat fatty acids in Canada geese in relation to diet, migration, and reproduction. *Physiol. Zool.* **48**, 157- 167.
- Thomas, D. B. and E. F.** (2007). The heterothermic loophole exploited by penguins. *Aust. J. Zool.* **55**, 317-321.
- Thomas, D. B. and Fordyce, R. E.** (2012). Biological Plasticity in Penguin Heat-Retention Structures. **256**, 249-256.
- Thomas, D. B., Ksepka, D. T., Fordyce, R. E., Thomas, D. B. and Ksepka, D. T.** (2011). Penguin heat-retention structures evolved in a greenhouse Earth Penguin heat-retention structures evolved in a greenhouse Earth. 461-464.
- Thouzeau, C., Duchamp, C., & Handrich, Y.** (1999). Energy metabolism and body temperature of barn owls fasting in the cold. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 170-178.
- Thouzeau, C., Froget, G., Monteil, H., Le Maho, Y. and Harf-Monteil, C.** (2003). Evidence of stress in bacteria associated with long-term preservation of food in the stomach of incubating king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Polar. Biol.* **26**, 115-123.
- Thouzeau, C., Peters, G., Le Bohec, C. and Le Maho, Y.** (2004). Adjustments of gastric pH, motility and temperature during long-term preservation of stomach contents in free-ranging incubating king penguins. *J. Exp. Biol.* **207**, 2715-2725.
- Tollu, B.** (1988). *Les manchots : Ecologie et vie sociale*. In : "Science et Découvertes", ed. Rocher, J.-P. Bertrand. pp 125.
- Torres-Romero, E. J., Morales-Castilla, I., and Olalla-Tárraga, M. Á.** (2016). Bergmann's rule in the oceans? Temperature strongly correlates with global interspecific patterns of body size in marine mammals. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **25**, 1206-1215.
- Trawa, G.** (1970). Note préliminaire sur la vascularisation des membres des spheniscides. In : L'Oiseau et RFO. Vol 40 pp 142-156.
- Tremblay, Y., Guinard, E. and Cherel, Y.** (1997). Maximum diving depths of northern rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome moseleyi*) at Amsterdam Island. *Polar Biol.* **17**, 119-122.
- Tremblay, Y. and Cherel, Y.** (2000). Benthic and pelagic dives: a new foraging behaviour in rockhopper penguins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **204**, 257-267.

Tremblay, Y. and Cherel, Y. (2003). Geographic variation in the foraging behaviour, diet and chick growth of rockhopper penguins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **251**, 279-297.

V

Vallerand, A. and Jacobs, I. (1992). Energy metabolism during cold exposure. *Int. J. Sports Med.* **13**, 191-193.

Van De Ven, T. M. F. N., Martin, R. O., Vink, T. J. F., Mckechnie, A. E. and Cunningham, S. J. (2016). Regulation of Heat Exchange across the Hornbill Beak: Functional Similarities with Toucans? *PLoS One* **11**.

Viblanc, V. A., Saraux, C., Malosse, N. and Groscolas, R. (2014). Energetic adjustments in freely breeding-fasting king penguins: Does colony density matter? *Funct. Ecol.* **28**, 621-631.

Viblanc, V. A., Smith, A. D., Gineste, B., Kauffmann, M. and Groscolas, R. (2015). Modulation of heart rate responses to acute stressors throughout the breeding season in a colonial seabird, the king penguin. *J. Exp. Biol.* **218**, 1686-1692.

Videler, J. J. and Weihs, D. (1982). Energetic advantages of burst-and-coast swimming of fish at high speeds. *J. Exp. Biol.* **97**, 169-178.

W

Walker, B. G. and Boersma, P. D. (2003). Diving behavior of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Punta Tombo, Argentina. *Can. J. Zool.* **81**, 1471-1483.

Walsberg, G.E. (1986) Thermal consequences of roost-site selection: the relative importance of three modes of heat conservation. *Auk* **103**, 1-7.

Wang, L.C.H and Lee, T.F. (2011). Torpor and hibernation in mammals: Metabolic, physiological, and biochemical adaptations. In: *compr. physiol.*, ed J. Wiley & Son, Inc. pp 507-532.

Watanuki, Y., Kato, A., Naito, Y., Robertson, G. and Robinson, S. (1997). Diving and foraging behaviour of Adelie penguins in areas with and without fast sea-ice. *Polar Biol.* **17**, 296-304.

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

Watts, P. D. and Jonkel, C. (1998). Energetic Cost of Winter Dormancy in Grizzly Bear. In: *The Journal of Wildlife Management*. Vol. 52 pp 654-656.

Weathers WW, and Sullivan, K.A. (1993). Seasonal patterns of time and energy allocation by birds. *Physiol. Zool.* **66**, 511-36

Weathers, W. W., Olson, C. R., Siegel, R. B., Davidson, C. L., and Famula, T. R. (1999). Winter and breeding-season energetics of non-migratory White-crowned Sparrows. *The Auk*, 842-847.

Webster, M.D. and Weathers, W.W. (1990). Heat produced as by-product of foraging activity contributes to thermoregulation in verdins, *Auriparus flaviceps*. *Physiol. Zool.* **63**, 777-794.

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

Weihs, D. (1974) Energetic advantages of burst swimming of fish. *J. theor. Biol.* **48**, 215-229.

Weissenböck, N.M., Weiss, C.M., Schwammer, H.M. and Kratochvil, H. (2010) Thermal windows on the body surface of African elephants (*Loxodonta africana*) studied by infrared thermography. *J. Therm. Biol.* **35**, 182-188.

Welch Jr. K.C. (2011). The power of feeder-mask respirometry as a method for examining hummingbird energetics. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **158**, 276-286.

- West, G. C. and Meng, M. S.** (1968). Seasonal changes in body weight and fat and the relation of fatty acid composition to diet in the Willow Ptarmigan. *Wilson Bull.* **80**, 426-441.
- West-Eberhard, M.J.** (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6543-6549.
- Wienecke, B., Robertson, G., Kirkwood, R. and Lawton, K.** (2007). Extreme dives by free-ranging emperor penguins. *Polar Biol.* **30**, 133-142.
- Williams, T.D., Briggs, D.R., Croxall, J.P., Naito, Y., and Kato, A.** (1992a). Diving pattern and performance in relation to foraging ecology in the gentoo penguin, *Pygoscelis papua*. *J. Zool.* **227**, 211-230.
- Williams, T.M. and Worthy, G.A.J.** (2002). Anatomy and physiology: the challenge of aquatic living. In: *Marine Mammal Biology: An Evolutionary Approach*, ed. R. Hoelzel. Blackwell Science, Oxford, p. 73-97.
- Williams, C.L., Hagelin, J.C. and Kooyman, G.L.** (2015) Hidden keys to survival: the type, density, pattern and functional role of emperor penguin body feathers. *Proc. R. Soc. B* **282**, 2015-2033.
- Wilson, R. P.** (1985). The jackass penguin (*Spheniscus demersus*) as a pelagic predator. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **25**, 219-227.
- Wilson, R. P. and Wilson, M.P. T.** (1990). Foraging ecology of breeding Spheniscus penguins. In: *Penguin Biology* Davis, ed. L. S. and J. T. Darby. San Diego, CA: Academic Press.
- Wilson, R. P. and Peters, G.** (1999). Foraging behaviour of the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* at Ardley Island, Antarctica. *Mar. Ornithol.* **27**, 85-95.
- Wilson, R., White, C., Quintana, F., Halsey, L., Liebsch, N., Martin, G. and Butler, P.J.** (2006). Moving towards acceleration for estimates of activity-specific metabolic rate in free-living animals: the case of the cormorant. *J. Anim. Ecol.* **75**, 1081-1090.
- Woakes, A. J. and Butler, P. J.** (1983). Swimming and diving in tufted ducks, *Aythya fuligula*, with particular reference to heart rate and gas exchange. *J. Exp. Biol.* **107**, 311-329.
- Wodzicki, K. and Robertson, F.** (1955). Observations on diving of Australasian gannet. *Notornis* **6**, 72-76.

Y

- Yeates, L.C., Williams, T. M. and Fink, T. L.** (2007) Diving and foraging energetics of the smallest marine mammal, the sea otter (*Enhydra lutris*). *J. Exp. Biol.* **210**, 1960-1970
- Yoda, K., Kohno, H. and Naito, Y.** (2004). Development of flight performance in the brown booby. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **271**, 240-242.
- Yoda K, Ropert-Coudert Y** (2004) Decision-rules for leaping Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*). *J. Zool.* **263**, 1-5.
- Zerba, E. and Walsberg, G.E.** (1992). Exercise-generated heat contributes to thermoregulation in Gambel's quail in the cold. *J. Exp. Biol.* **171**, 409-422.

Stratégies de thermorégulation liées aux
contraintes physiologiques et environnementales
chez le manchot royal
(*Aptenodytes patagonicus*)

Résumé

Les espèces endothermes amphibies font face à de fortes contraintes durant leurs séjours en mer dont l'augmentation des coûts de thermorégulation. La recherche alimentaire du manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) s'étend sur plusieurs jours alternant des plongées profondes de chasse et des périodes de repos à la surface de l'eau correspondant à deux stratégies de thermorégulation différentes. Durant les plongées, l'hypothermie des tissus suggère une économie d'énergie visant à augmenter la durée d'apnée. Cependant, l'utilité de la réaugmentation des températures corporelles durant les périodes de repos reste méconnue. Alors que la digestion débute durant les plongées, nous supposons que le stockage des acides gras dans les tissus adipeux périphériques ne peut se faire que par le retour à normothermie de ces tissus. Nous avons testé cette hypothèse en maintenant des individus équipés d'enregistreurs de températures (périphériques et interne) dans une piscine d'eau de mer afin d'étudier les **variations de températures** en fonction de l'état nutritionnel des manchots. De plus, nous avons mesuré, par **respirométrie**, les dépenses énergétiques en fonction des températures corporelles. Enfin, nous avons étudié les variations de flux sanguins à l'aide de **thermographie infra-rouge** afin de comprendre le retour à normothermie des tissus périphériques et les coûts énergétiques associés.

Mots-clés : Thermorégulation – Normothermie – Oiseaux marins – Vasodilatation – Énergétique

Résumé en anglais

The energetic cost of foraging activities in King Penguin (*Aptenodytes patagonicus*) consists to reach favourable areas, realizes depth diving to attempt fish patch and resting in high latitude cold water. Several studies have shown that resting in cold water could be represent a more expensive cost than realized depth diving. Indeed, this **paradox** is probably linked with contrasting thermoregulation processes. During daylight, a general hypothermia occurs and is believed to reduce energy expenditure. At sunrise occurs a re-warming to normothermia, contributing to increase heat-loss during the night. We hypothesise an energetic conflict between thermoregulation and digestive processes. During daylight, the organism may be unable to assimilate the end product of prey digestion (free fatty acids) inside the peripheral subcutaneous adipose tissues (SAT), because skin is no more blood perfused. During the night, re-warming and re-connecting to blood circulation peripheral tissues could be inevitable to end the assimilation of FFA inside the SAT. In a first step, we have reproduced the conditions of a resting night at sea and events of rewarming skin temperature, using a sea water tank in which king penguins equipped with internal **temperature loggers** were maintained several days. In a second step, we have tested a generalisation of our hypothesis studying body temperature variations on penguins fast and feed. Finally, we have measured the cost to maintain normothermia in cold water with **respirometry** measures and investigated peripheral vasodilation with body temperature variations and **infrared thermography**.

Key words: Thermoregulation – Normothermia – Seabirds – Vasodilation - Energetic