

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale **Diversité du vivant**

Laboratoire **Ecologie & Évolution**

Equipe de recherche **Ecophysiologie Evolutive**

Titre de la thèse

Transfert intergénérationnel de l'immunité chez le pigeon biset (*Columba livia*)

Par

Ahmad ISMAIL

Thèse de doctorat pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Dirigée par

Julien GASPARINI

Directeur de thèse

Présentée et soutenue publiquement le 20/06/2014

Devant le jury composé de :

Nicolas Loueille	Professeur, UPMC, Paris	Président
Thierry Boulinier	Directeur de recherche, CNRS, Montpellier	Rapporteur
Philippe Heeb	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse	Rapporteur
Emmanuelle Baudry	Maître de conférences, Université Paris-sud	Examinateuse
Gerard Leboucher	Professeur, Université Paris Ouest, Paris	Examinateur
Julien Gasparini	Maître de conférences, UPMC, Paris	Directeur de thèse

University Pierre and Marie CURIE

PHD THESIS

MAJOR

Ecole doctorale **Diversité du vivant**

Laboratoire **Ecologie & Évolution**

Equipe de recherche **Ecophysiologie Evolutive**

Intergenerational transfer of immunity in the Feral pigeon (*Columba livia*)

Presented by

AHMAD ISMAIL

To become a Doctor from the University Pierre and Marie CURIE

Defended on the 20 June, 2014

Jury

Nicolas Loueille	Professeur, UPMC, Paris	President
Thierry Boulinier	Directeur de recherche, CNRS, Montpellier	Reviewer
Philipp Heeb	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse	Reviewer
Emmanuelle Baudry	maître de conférences, Université Paris-sud	Examiner
Gerard Leboucher	Professeur, Université Paris Ouest, Paris	Examiner
Julien Gasparini	maître de conférences, UPMC, Paris	Advisor

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de «l'apprenti-chercheur».

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, monsieur Julien GASPARINI pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. Merci pour tout.

Je tiens encore à remercier le membre de jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ce travail. M. Boulinier, M. Heeb, Mme Baudry, M. Leboucher et M. Loeuille, malgré leur emploi du temps plus que chargé.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble des membres de laboratoire Ecologie & Evolution, et je suis en particulièrement reconnaissant tout l'équipe Ecophysiology évolutive pour leur soutien ainsi que pour la très bonne ambiance que j'ai toujours trouvée entre eux, et je remercie plus particulièrement, Sandrine, Loïc, Claire. Mille mercis à Adrien Frantz pour son aide Je te remercie infiniment pour le travail de correction que tu as apporté.

Un grand merci à Claudy Haussy pour m'avoir expliqué la technique ELISA de façon très pédagogique, et pour son aide technique ainsi que Julie Legoupi.

Merci aux membres de mon comité de thèse pour les discussions et les conseils: Adrien, Clotilde et Gérard.

Je suis particulièrement reconnaissante à toute l'équipe de la station de Foljuif-CEREEP, sans laquelle la majeure partie de ce projet de thèse n'aurait pas pu être réalisée. Merci à toute l'équipe du CEREEP, Sophie et particulièrement Samuel et

Béa, qui ont beaucoup apporté à cette thèse par leur aide technique et leurs qualités humaines. Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide des stagiaires formidables, Jade Dauvillers, Aurore Bailly, Stéphane Loisel.

Je souhaite remercier l'ensemble de mes collègues Thomas, Anaïs, Marion, Marie et Mélissa.

A l'issu de cette thèse, j'aimerais remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à sa réalisation.

Je tiens à remercier l'école doctorale «Diversité du Vivant» et en particulier Marie Donatien et Gaëlle Boutin pour faciliter les démarches administratives.

Ma reconnaissance s'adresse également à Lisa Jacquin, ancienne doctorante du labo, pour ses conseils et ses aides sur la manipulation expérimental pendant la première période de ma thèse et pour ses relectures d'articles.

Je tiens à remercier ma femme Mariam pour m'avoir encouragé pendant ces années très longues. Merci à mes enfants Baraa et Judy. Je les remercie d'avoir été là pour moi.

Enfin, j'adresse à mes parents toute ma reconnaissance. Rien n'aurait été possible sans leur aide et leurs encouragements à distance. Ce travail leur est dédié.

Résumé

Le transfert intergénérationnel de l'immunité est un phénomène dont l'étude remonte à une dizaine d'années. Chez les vertébrés, il prend la forme d'un transfert d'anticorps de la mère aux juvéniles. Pourtant, les processus écologiques et évolutifs du transfert sur plusieurs générations et la persistance des anticorps maternels chez les juvéniles n'ont pas été bien étudiés. Ce travail de thèse porte sur l'étude des mécanismes du transfert d'anticorps maternels sur plusieurs générations consécutives et leurs conséquences sur la réponse immunitaire et sur la croissance des juvéniles. En utilisant des approches expérimentales, j'ai pu dans un premier temps montrer que le transfert d'anticorps maternels était affecté par la disponibilité en nourriture dans l'environnement. De plus, nos résultats suggèrent que la persistance d'anticorps maternels dépend du niveau initial d'anticorps maternels présents chez le juvénile dans les premiers jours de vie. Dans un second temps, nous avons étudié la réponse immunitaire et la croissance des poussins en tentant de mettre en évidence comment les anticorps maternels influençaient le compromis entre ces deux paramètres physiologiques. Enfin, nos résultats suggèrent que les anticorps maternels pourraient être le messager intergénérationnel d'un effet épigénétique sur la réponse immunitaire. En effet, nous avons trouvé qu'une réponse immunitaire des grand-mères induite par l'exposition à un parasite stimule la réponse immunitaire des petits-enfants contre ce même parasite. Mes travaux de thèse soulignent une fois de plus l'importance du transfert de l'immunité dans l'écologie et l'évolution des interactions hôte-parasite.

Mots-clés : effets maternels, transfert et persistance des anticorps maternels, juvéniles, réponse immunitaire humorale, croissance, épigénétique.

Abstract

Intergenerational transfer of immunity is a phenomenon which started to be studied 10 years ago. In vertebrates, it takes the form of a transfer of antibodies from mothers to juveniles. However, the ecological and evolutionary processes of transfer across several generations and the persistence of maternals antibodies in chicks remain poorly understood. This thesis focuses on the study of the mechanisms of maternal antibodies transfer over several generations and on how they impact the immune response and growth in juveniles. By using experimental approaches, I first show that the transfer of maternal antibody was affected by food availability in the environment. In addition, our results suggest that the persistence of maternal antibodies depends on the initial level of maternal antibodies present in the nestlings in the first days of life. Secondly, we studied the immune response and growth of juvenile by investigating how maternal antibodies may affect the resolution of the trade-off between these two physiological parameters. Finally, our results suggest that maternal antibodies would be a messenger of an epigenetic effect on immunituy. Indeed, induced immune response in grand-mothers towards a pathogen has been found to stimulate the immune response of grand-children. My thesis emphasizes the importance of maternal transfer of immunity in the ecology and evolution of host-parasite.

Key-words: maternal effect, transfer and persistence of maternal antibodies, chick, humoral immune response, growth, epigenetic

SOMMAIRE

INDEX DES FIGURES.....	09
INDEX DES TABLEAUX.....	10
INTRODUCTION GENERAL.....	11
OBJECTIF DE LA THESE.....	15

CHAPITRE: MODELE D'ETUDE, SITE, MATERIEL ET METHODES

1. Modèle biologique.....	17
1.1. Le pigeon biset feral (<i>Columba livia</i>).....	17
2. Site d'étude.....	20
3. Approche expérimentale	21
3.1 Traitement des parents en 2010 (Génération (G0)).....	24
3.1.1. Traitement alimentaire	24
3.1.2. Traitement immunitaire.....	24
3.1.3. Echange des nids.....	25
3.2. Traitement des juvéniles en 2010 (Génération (G1)).....	26
3.2.1. Mesure de la croissance des juvéniles (G1).....	26
3.3. Collecte et traitement des œufs en 2011 (contenant des embryons de la génération (G2)).....	28
3.4. Traitement des petits-enfants en 2012 (génération (G2)).....	28
3.5. Dosage d'anticorps anti-KLH par la technique ELISA.....	29

CHAPITRE I: EFFETS MATERNELS & TRANSFERT D'ANTICORPS MATERNELS

1. Effets maternels et l' immunité.....	32
2. La transmission d'anticorps maternels.....	37
3. Rôle de la nutrition dans le transfert et la persistance des anticorps maternels.....	41
4. Décroissance des anticorps maternels.....	43

CHAPITRE II: DIVERSITE DES EFFETS DES ANTICORPS MATERNELS

1. La fonction immunitaire comme un trait d'histoire de vie	48
2. Rôle des anticorps sur la réponse immunitaire des poussins à court terme.....	51
2.1. Les anticorps maternels inhibent la réponse humorale des poussins.....	52
2.2. Les anticorps maternel éduquent la réponse humorale des poussins.....	54
3. Nutrition maternel dans le développement des nouveau-nés.....	55
4. Effet des anticorps maternels transmis aux poussins sur leur croissance.....	57

CHAPITRE III: LES ANTICORPS COMME MESSAGER DE L'IMMUNITÉ SUR PLUS D'UNE GÉNÉRATION.

1. Effets grand-maternels.....	61
2. Facteurs épigénétiques.....	61
3. Transfert d'anticorps grand-maternels.....	65
4. Réponse humorale de la génération G2.....	66

CONCLUSIONS GENERALES.....	69
PERSPECTIVES.....	72
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74

Annexe I:	91
Ismail A., Jacquin L., Haussy C., Legoupi J., Perret S., & Gasparini J. Food availability and maternal immunization affect transfer and persistence of maternal antibodies in nestling pigeons. PLoS ONE 8(11): e79942. doi:10.1371/journal.pone.0079942	

Annexe II:	100
Ismail A., Jacquin L., Haussy C., Perret S., & Gasparini J. Food availability modulates the effects of maternal antibodies on growth and immunity in young feral pigeons. En préparation.	

Annexe III:	117
--------------------------	-----

Ismail A., Jacquin L., Haussy C., & Gasparini J. **Multigenerational transfer of maternal antibodies and their effects on the humoral immune response in urban pigeons (*Columba livia*)**. En préparation.

INDEX DES FIGURES

Fig 1. Pigeon biset feral (<i>Columba livia</i>).....	18
Fig 2. Vue extérieure des volières à la station de Foljuif (CEREEP).....	21
Fig 3. Protocoles expérimentaux.....	23
Fig 4. Prise de sang et mesures morphologiques.....	27
A. prise de sang via la veine branchiale sur un pigeon feral.....	27
B. Mesure de la longueur du tarse en millimètres.....	27
C. Une méthode utilisée afin de mesurer la demi-aile de pigeons en millimètres.....	27
Fig 5. Les effets maternels se manifestent à différents stades du développement de la progéniture.....	33
Fig 6. Des nombreux paramètres influencés par les effets maternels.....	37
Fig 7. Transfert pré et post-natal d'anticorps chez les oiseaux.....	41
Fig 8. Relations quadratiques positives entre les niveaux Ab anti-KLH chez les poussins à 3 jours et chez la mère biologique.....	43
Fig 9. Persistance des Anticorps anti-KLH maternels.....	45
Fig 10. Relation positive entre taux d'anti-KLH anticorps chez les poussins entre le 3 ^{ème} et le 21 ^{ème} jour de vie du poussin.....	46
Fig 11. Réponse immunitaire humorale des poussins, mesurée par le niveau anticorps (Ab) d'anti-KLH du poussin au cours du temps.....	54
Fig 12. Masse corporelle du poussin en fonction de l'âge du au niveau d'anticorps maternelle anti-KLH	59
Fig13. L'environnement maternel a un effet sur la génération G1 & G2.....	64

Fig 14. Les niveaux anti- KLH d'anticorps dans le jaune d'œuf des grand-mères injectées avec l'antigène KLH et des grand-mères injectées avec une solution saline.....66

Fig 15 La réponse immunitaire humorale des poussins mesurée par le niveau anti - KLH Anticorps68

INDEX DES TABLEAUX

Table 1. Composition chimique moyenne de differents grains (d'apres CETIOM et enquetes ITCF-ONIC) (% de la ms).....24

Table 2. Protocole expérimental de l'étude.....25

Table 3. Effet le régime alimentaire sur le transfert d'anticorps maternels.....46

INTRODUCTION GENERALE

Dans la nature, la reproduction et la survie des organismes dépendent d'un grand nombre de caractères intrinsèques: ceux-ci constituent les **traits d'histoire de vie**. Via le phénotype, ces traits vont déterminer la **fitness** (ou **valeur sélective**) d'un individu dans un environnement donné. Cependant, lorsque l'environnement est variable, plusieurs combinaisons de traits seront nécessaires pour qu'un organisme conserve une fitness moyenne maximale. La plasticité phénotypique, qui correspond à une modification du phénotype non liée à une modification du génotype, permet aux organismes de s'adapter rapidement aux modifications de l'environnement. En fonction du temps des générations, certaines espèces auront intérêt à faire preuve de plasticité environnementale intergénérationnelle ou autrement appelée «**effets maternels**». Les effets maternels sont depuis longtemps relativement connus chez les oiseaux par les écologistes de l'évolution et ils constituent aujourd'hui clairement un domaine important et développé de la recherche. Les effets maternels se définissent lorsque l'environnement de la mère entraîne des modifications sur le **phénotype** de sa descendance. Ces effets peuvent avoir une valeur adaptative lorsqu'elle apporte un gain de fitness chez la descendance.

Jusque à présent, dans la littérature, les études sur les effets maternels sont abondantes et variées. Étonnamment peu d'études écologiques ont évalué la durée des effets maternels. A ce jour, des études récentes ont montré que les effets maternels peuvent persister jusqu'à l'âge adulte et même affecter les générations suivantes (Lemke *et al.* 2004; Reid *et al.* 2006; Curley *et al.* 2011). Par ailleurs, ces effets maternels peuvent influencer des nombreux paramètres tels que la **survie de la progéniture**, le **taux de croissance**, l'**immunité** des jeunes. Le **transfert d'anticorps** maternels des parents et principalement de la mère (effets maternels) aux jeunes a reçu une grande attention de la part des chercheurs (Revue par Boulinier *et al.*

2008). Ainsi, cet effet maternel a été démontré jouer un rôle dans la mise en place des défenses immunitaires du poussin. Deux effets adaptatifs ont été mis en évidence: l'effet protecteur (Gasparini *et al.* 2009), et l'effet éducateur (Gasparini *et al.* 2006; Boulinier *et al.* 2008).

Or, le **système immunitaire** joue un rôle central dans la survie d'un organisme car il lui permet de lutter contre les infestations parasitaires. Cependant, celui-ci est un processus énergétiquement coûteux (Bonneaud *et al.* 2003) qui peut se répercuter sur plusieurs autres traits d'histoire de vie (Roff, 1992; Stearns; 1992; Ricklefs & Wikelski 2002). Après l'exposition d'un hôte aux parasites, une partie importante de cette réponse immunitaire acquise peut être transmise à la génération suivante via le transfert d'anticorps immunoactifs (Lee 2006). Du coup, la valeur adaptative pourrait être renforcée chez le jeune dont le système immunitaire n'est pas totalement développé à la naissance (Frank, 2002). Un tel transfert constitue donc un effet induit des parents pour protéger les jeunes durant la période critique de la maturation du système immunitaire (Wallach *et al.* 1992; Smith *et al.* 1994; Kariyawasam *et al.* 2004; Pravieux *et al.* 2007). Ainsi l'effet protecteur, qui va participer à la destruction de l'antigène, va permettre au poussin de ne pas monter une réponse immunitaire coûteuse (Grindstaff *et al.* 2003; Boulinier *et al.* 2008). Ainsi, dans les premiers jours de sa vie, le jeune pourrait allouer l'énergie économisée dans sa croissance (Pihlaja *et al.* 2006; Grindstaff *et al.* 2008). Cette hypothèse repose sur le fait qu'il existe un compromis d'allocation entre croissance et immunité. En effet, l'énergie disponible étant limitée, les individus peuvent allouer préférentiellement cette énergie dans la croissance ou l'immunité. La résolution de ce compromis dépend fortement des conditions environnementales rencontrées par les parents (nourriture, pathogènes). Celles-ci vont influencer la quantité d'anticorps transmis aux jeunes et la qualité des soins parentaux comme le nourrissage (Scheldon et Verhulst, 1996; Lochmiller & Deerenberg, 2000; Pihlaja *et al.* 2006).

Toutefois, le développement prénatal est l'un des moments les plus importants dans la vie d'un animal. La condition physiologique et l'histoire de vie de la mère à la naissance, le choix du nid et l'environnement de ponte sont des exemples d'effets maternels prénataux. La condition physiologique de la mère va également impacter les divers aspects du phénotype à court et à long terme. En effet, le statut immunitaire de la mère au cours de la période prénatale est la plus importante pour l'immunité de la descendance. Récemment Garnier *et al.* 2012 ont montré que, chez certaines espèces, les anticorps maternels spécifiques et leurs effets perduraient jusqu'à 20 jours après la naissance. En revanche, les études concernant la dynamique des décroissances des anticorps maternels et l'identification des facteurs qui peuvent influencer cette persistance sont très rares. Ceci est certainement dû à la difficulté à estimer la persistance d'anticorps maternels dans le sang des descendants, car cela nécessite notamment de faire des prises de sang et des captures de manière répétée sur les individus, ce qui peut être compliqué sur le terrain. Toutefois, on connaît peu les facteurs qui influencent la capacité à de transférer des anticorps maternels, la persistance temporelle des anticorps maternels chez les juvéniles, et les coûts énergétiques pour les mères et les petits. Cependant, la persistance temporelle des anticorps maternels dans la circulation sanguine de la progéniture a été récemment démontrée être très variable selon les espèces; Garnier *et al.* (2012) ont montré que la persistance des anticorps maternels et la protection immunitaire pourraient être prolongées chez les espèces longévives, adaptée à la fois à la durée de leur période d'élevage généralement plus longue et à la mise en place d'un système immunitaire acquis supposé plus fort du fait des bénéfices des réponses mémoires (Lee, 2006). En outre, le taux initial d'anticorps maternels transféré de la mère à ses petits ajoute un point important sur l'étude de la décroissance des anticorps maternels (Grindstaf. 2010; Ismail *et al.* 2013 (Annexe I)). De plus, le taux initial d'anticorps maternel transféré par la mère pourrait être affecté par l'environnement prénatal, comme la nourriture (Annexe I). En conséquence, la

persistance des anticorps maternels peut être façonnée par les forces sélectives agissant sur les deux phénotypes parentaux et de la progéniture, tandis que la capacité de la mère à transférer des anticorps maternels peut être façonnée par les forces sélectives agissant uniquement sur les femelles adultes (Grindstaf *et al.* 2003). D'une manière plus générale, l'étude de la dynamique de décroissance d'anticorps maternels apporte un éclairage sur les déterminants écologiques de ce mécanisme.

Par ailleurs, certaines études suggèrent que l'effet des anticorps maternels pourrait avoir des effets sur plusieurs générations consécutives (Lemke *et al.* 2004). L'anticorps maternel pourrait donc être un messager non génétique du phénotype "résistance au parasite" pendant plusieurs générations successives. Cette hypothèse prédit que l'expérience immunitaire de la grand-mère pourrait influencer le système immunitaire de la mère, ce qui pourrait à son tour influencer le système immunitaire des petits-enfants. Dans ce contexte, le niveau de résistance du parasite induit par les propriétés éducatives des anticorps maternels est un phénotype non génétiquement hérité de la mère et constitue un bon exemple d'un effet épigénétique que l'on définit comme suit: toutes les modifications héritables de l'expression des gènes sans changements dans les séquences d'ADN (Poulin *et al.* 2008; Jablonka *et al.* 2009).

OBJECTIF DE LA THÈSE

Dans ce contexte, cette thèse se focalise sur les trois points suivants:

- 1.** Dans une première partie, nous allons étudier le rôle potentiel des conditions environnementales pré-natales sur la capacité des mères à transmettre des anticorps et sur la persistance des anticorps maternels chez les juvéniles.
- 2.** Dans une seconde partie, il s'agit de comprendre comment les anticorps maternels peuvent jouer un rôle sur la croissance en fonction de leurs effets sur la réponse immunitaire en s'attachant particulièrement sur le compromis entre ces deux paramètres physiologiques.
- 3.** Dans une troisième partie, nous allons étudier si l'environnement antigénique rencontré par les grand-mères se répercute sur l'immunité des petits-enfants via les anticorps comme messager intergénérationnel?

CHAPITRE

MODELE BIOLOGIQUE,

SITE D'ETUDE

&

MATERIEL ET METHODES



Pour éviter d'alourdir ce texte par des répétitions des descriptions techniques des expériences, ce chapitre regroupe les matériels et méthodes utilisés de façon répétitive pour répondre aux différentes questions.

1. Modèle Biologique

Les effets maternels chez les oiseaux ont surtout été étudiés chez différentes espèces de goélands et de mouettes (par exemple, Nager *et al.* 2000; Gasparini *et al.* 2001; Eising *et al.* 2001; Blount *et al.* 2002; Verboven *et al.* 2003; Müller *et al.* 2004, 2005), les galliformes domestiques (par exemple Haq *et al.* 1996; Klasing & Leshchinsky 1999; Yasuda *et al.* 1998; Müller *et al.* 2002; Grindstaff *et al.* 2005), certains passereaux (par exemple Buechler *et al.* 2002; Saino *et al.* 2002; Royle *et al.* 2003; Soler *et al.* 2003; Tscharren *et al.* 2005; Badyaev *et al.* 2006; Dubiec *et al.* 2006; Kilpimaa *et al.* 2007) et des oiseaux de proie (par exemple Korpimäki *et al.* 2000; Blanco *et al.* 2003; Martínez-Padilla *et al.* 2004). Pour ma thèse, j'ai utilisé le pigeon biset (*Columba livia*) comme une espèce modèle pour étudier les effets maternels et grand-maternels.

1.1. Le pigeon biset feral (*Columba livia*)

Le pigeon urbain ou biset (*Columba livia*) fait partie de la famille des colombidés (Gmelin, 1789) qui vit en colonies principalement en milieu urbain (Figure 1). Sa proximité avec l'homme en fait un modèle de choix en épidémiologie des zoonoses (maladies transmissibles à l'homme) et dans l'étude des interactions hôte-parasite en milieu urbain. En effet, le pigeon a longtemps été un modèle en immunologie et en physiologie du fait de la

grande plasticité de son système immunitaire et de sa croissance (Johnston and Janiga, 1995).

Le pigeon est considéré comme une espèce altriciale ce qui veut dire que les poussins post-embryonnaire naissent avec les yeux fermés et peu de duvet. Il est par ailleurs incapable de quitter le nid et est nourri par ses parents.



Figure 1: Pigeon biset feral *Columba livia* (Paris, juillet 2011) FRESILLON, Cyril @CNRS Photothèque

Le pigeon pond généralement 2 œufs par ponte et l'incube environ 18 jours. Les petits deviennent sexuellement matures dès leur première année avant d'avoir atteint leur taille adulte. L'espèce pratique des soins biparentaux. Les deux parents subviennent aux besoins nutritionnels des petits lors de leurs premiers jours de vie grâce à un « lait de jabot ». Ce dernier est sécrété par l'épithélium du jabot, sous forme de cellules desquamées gorgées de protéines (60% du poids sec), de lipides (32-36 % du poids sec), de minéraux (calcium, potassium, sodium et de phosphore) mais pauvre en sucre (1-3 %) (Davies, 1939; Engberg *et al.* 1992; Eraud *et al.* 2008). Ce liquide particulièrement nutritif est responsable du taux de croissance très élevé des jeunes pigeons (Horseman *et al.* 1995; Meagan *et al.* 2012). Par

ailleurs, il contient également des anticorps à l'instar du colostrum chez les mammifères (Engberg *et al.* 1992). Cette substance est secrétée sous l'action stimulante d'une hormone hypophysaire (la prolactine). Chez les pigeons, ce sont les petits qui enfoncent leur bec à l'intérieur de celui de leurs parents, quasiment jusqu'à l'œsophage, pour la becquée. (Ravazzi, 2002). La croissance du pigeonneau est très rapide et passe de 15 à 20g à la naissance pour atteindre 300g trois semaines plus tard. La femelle assume en général les trois quarts du temps de couvaison pour chaque pigeonneau que le couple élève, répartition établie sur la base du temps passé au nid pour chacun d'entre eux. L'exacte contribution à l'investissement parental varie selon les couples (Burley, 1979). Ainsi, nous avons ici un modèle qui nous permet d'avoir des indications sur un transfert d'anticorps prénatal, via l'œuf, et postnatal, via le lait de jabot.

La période de reproduction dure environ 8 mois, elle s'étale de fin janvier à fin septembre. La femelle produit 2 à 8 nichées par an pour un couple. Mais les critères influençant ce comportement sont nombreux et variés: la génétique, le climat, l'âge, l'habitat, les ressources alimentaires disponibles, la densité de population sur un territoire (Jonhston et Janiga, 1995). La femelle pond dans un nid qu'elle confectionne au moyen de la paille ou de brindilles sèches. La ponte survient une dizaine de jours après l'accouplement, la femelle pond deux œufs de couleur blanchâtre d'environ 20g, de 3cm de largeur et 4cm de longueur. Une variation considérable est constatée en ce qui concerne l'intervalle de la ponte entre les deux œufs: moins de 24 heures (Pikula *et al.* 1982; Glutz von Blotzheim and Bauer, 1980), 48h (Riddel, 1971; Kelly, 1979; Kautz, 1985) ou de 45 h à 52 h (Dorzhev, 1991). En fin d'incubation, les petits percent la coquille avec leur bec. Ils sont alors complètement dépendants de leurs parents car ils naissent aveugles et incapables de se déplacer. Les parents les protègent du froid et s'occupent de l'alimentation. Il faut attendre le quatrième jour pour voir leurs yeux s'ouvrir. Vers le sixième jour, les parents commencent le sevrage. Vers le

vingt-cinquième jour ils commencent à battre des ailes et à un mois ils peuvent prendre leur envol. Le taux de mortalité pour les oiseaux libres est aussi difficile à déterminer (Haag, 1995).

2. Site d'étude

Le domaine de la station de Foljuif (CEREEP) Saint Pierre les-Nemours en Ile-de-France est une propriété de l'ENS. Il est situé en marge des espaces naturels de la vallée du Loing et de la forêt de Fontainebleau et du bois la Commanderie (Figure 2). Ses espaces naturels offrent une combinaison unique et protégée de milieux ouverts à l'étude, à l'expérimentation et à la protection des écosystèmes. Ce site permet de manipuler les variables environnementales et d'effectuer des mesures régulières et répétées pour étudier les mécanismes physiologiques de manière précise. La construction des animaleries du centre a été financée par l'ENS, le Ministère de la Recherche, l'ANR, le CNRS et la Région Ile-de-France. Ce site comprend des pièces de laboratoire et à des locaux de stockage, une volière en extérieur recouverte sur toute sa longueur d'un toit et séparée en 15 compartiments grillagés. La dimension pour chaque volière est 2.20 m x 2.20 m.



Figure 2: Vue extérieure des volières à la station de Foljuif (CEREEP) Saint Pierre les-Nemours en Ile-de-France.

3. Approche expérimentale

Les effets maternels et grand-maternels comprennent de nombreux paramètres (Mousseau & Fox, 1998; Lundin *et al.* 1999), il est donc nécessaire d'utiliser des approches expérimentales pour distinguer les différents types d'effets maternels (pré- et post-nataux).

Dans cette thèse, on s'est focalisé sur trois études principales basées une grosse approche expérimentale (Fig 3.). Pour tester nos hypothèses, deux facteurs-clés de l'environnement ont été manipulés: la quantité de nourriture et l'exposition à un parasite grâce à l'injection d'un antigène.

Dans **la première expérience** réalisée en 2010, nous avons étudié les effets croisés de la limitation des ressources alimentaires et de l'exposition à un parasite par l'injection d'un antigène, le KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) sur la transmission et la persistance des anticorps maternels chez les poussins (Annexe I). Dans **la deuxième partie** de cette

expérience, j'ai étudié l'effet des ces traitements (traitements alimentaire et immunitaire) sur l'immunité et la croissance des oisillons (Annexe II). **Enfin**, dans la troisième partie, j'ai étudié l'impact de l'environnement rencontré par les grand-mères sur la réponse immunitaire des petits-enfants avec comme support de l'information à travers les générations: l'anticorps. Dans ce contexte, les grand-mères maternelles ont été soumises à deux traitements immunitaires simulant des expositions aux parasites (KLH vs. PBS). Afin de regarder comment ces traitements affectaient l'immunité des descendants produits par les poussins des femelles traitées, c'est-à-dire les grand-mères des poussins, nous avons également collecté 143 œufs issus des poussins des femelles traitées pour quantifier les anti-KLH dans les œufs pour voir si les anticorps sont bien les messagers intergénérationnels de l'immunité (Annexe III). Ainsi, grâce à cette grosse expérience initiée en 2010 et les collectes de données sur plusieurs générations en 2011 et 2012, nous avons pu tester nos différentes hypothèses.

Protocoles Expérimentaux

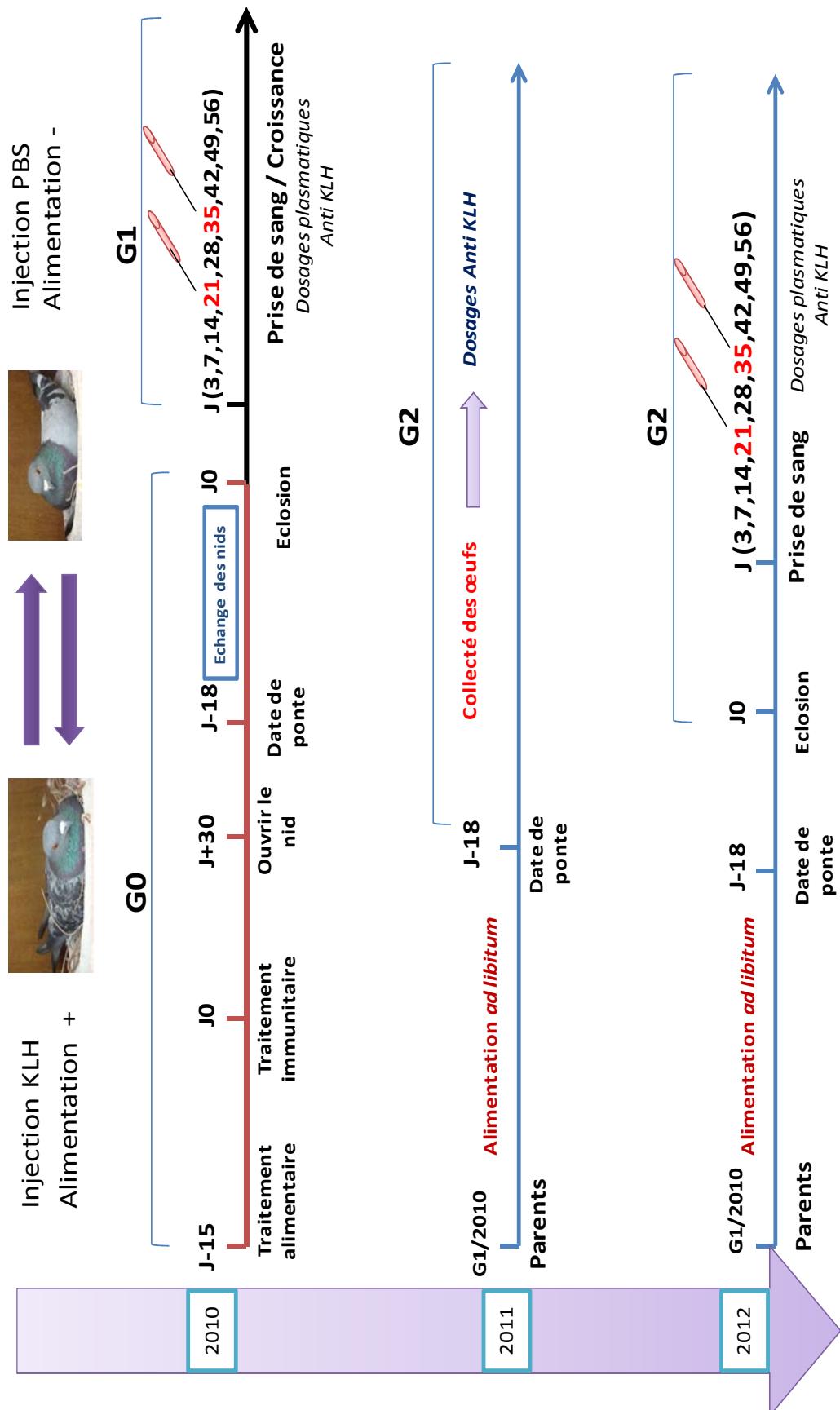


Figure 3. Protocoles expérimentaux

3.1. Traitement des parents en 2010 (génération G0)

3.1.1 Traitement alimentaire

Le traitement alimentaire a commencé environ deux semaines avant le traitement immunitaire. 120 pigeons bisets capturés dans la région parisienne ont été placés en captivité. 60 individus étaient bien nourris [groupe bien nourri : mélange *ad libitum* de maïs, blé, pois (régime riche en protéines et lipides) proposé à volonté]. Tandis que 60 individus étaient mal nourris. Ils ont été alimentés avec 30g de blé par jour et par individu (régime pauvre en protéines et en lipides). Cette dose limitée correspond à la dose minimale requise pour le maintien de pigeons domestiques non reproducteurs en captivité (Hawkins, 2001). Par ailleurs, un supplément en minéraux et vitamines a été donné à tous les individus, afin d'éviter tout effet confondant de carence minérale (Table 1). Ces régimes alimentaires ont un effet significatif sur la reproduction et sur la condition des pigeons adultes (Jacquin *et al.* 2012).

COMPOSANTS Grains	AMIDON	PROTEINES	MATIERES Grasses	CELLULOSE
BLE TENDRE	65	12,5	2	2,5
MAIS	72	10	5	2,5
POIS	50	25	17	7

Table 1. Composition chimique moyenne de différents grains (d'après CETIOM et enquêtes ITCF-ONIC) (% de la matière sèche).

3.1.2 Traitement immunitaire

Au sein de ces groupes, 60 individus (groupe immunisé) étaient injectés avec une dose de 50 µg de KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Le KLH est un antigène naturel utilisé pour sa capacité hautement immunogène sans pour autant être pathogène. Cette protéine provient

d'un mollusque marin, auquel les individus n'ont jamais été exposés auparavant. Ainsi les anticorps anti-KLH présents chez les individus sont en totalité produits par la réponse humorale déclenchée par l'injection. Tandis que 60 autres individus (groupe non immunisé) ont simplement reçu une injection de 50 µg d'une solution saline neutre non immunogène (PBS ou Phosphate Buffered Saline). Le design était croisé : 31 individus étaient mal nourris et immunisés, 29 étaient mal nourris non immunisés, 30 étaient bien nourris immunisés, 30 bien nourris non immunisés (Table 2). La reproduction a commencé environ 30 jours après les injections. Le taux d'anticorps anti-KLH a été mesuré chez la mère le jour de la ponte. Les individus d'un même couple appartiennent tous les deux au même groupe expérimental et ont reçu le traitement 30 jours avant la ponte.

		Traitement Immunitaire	
		Immunisés (injection de KLH)	Non-immunisés (injection de tampon PBS)
Traitement alimentaire	Mal nourris (-)	31	29
	Bien nourris (+)	30	30

Table 2: Design expérimental de l'étude

3.1.3. Echange des nids

Au moment de la ponte, afin de comparer les niveaux de transmission d'anticorps dans les œufs par rapport au taux circulant d'anticorps, les deux œufs des pontes ont été échangés entre les nids. Les poussins ont donc été élevés par des parents adoptifs différents de leurs parents biologiques. Cela va permettre d'étudier l'influence respective des traitements subis par les parents biologiques par rapport aux traitements subis par les parents adoptifs sur l'immunité et la croissance des poussins.

3.2. Traitement des juvéniles en 2010 (génération G1) :

Afin de voir si les traitements des parents biologiques et adoptifs avaient un impact sur la réponse humorale (production d'anticorps) des poussins, nous avons réalisé deux séries d'injection. Les poussins ont reçu une première injection de KLH au 21^{ème} jour, puis un rappel au 35^{ème} jour. Nous avons ensuite fait des prises de sang sur tous les poussins aux 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème}, 28^{ème}, 35^{ème}, 42^{ème}, 49^{ème} et 56^{ème} jours de vie des poussins dans la veine brachiale (Figure 4A) pour d'une part mesurer le transfert et la persistance d'anticorps (Annexe I), et d'autre part, étudier la dynamique de la réponse humorale (production d'anticorps d'anti-KLH en réponse) et la croissance (Annexe II).

3.2.1. Mesure de la croissance des juvéniles (G1)

En parallèle des mesures de la réponse immunitaire, le poids de poussins a été mesuré tous les jours jusqu'au 35^{ème} jour de vie de poussins, et puis une fois par semaine jusqu' au 56^{ème} jour. La pesée est effectuée sur une balance électronique 200 g de l'éclosion à l'âge de deux semaines. A partir du 14^{ème} jour de vie de poussins, la pesée est effectuée sur le terrain. Le poussin est placé dans un sac en tissu de dimensions 30 x 22 cm. Le sac contenant un poussin est suspendu par son anse au crochet situé à l'extrémité d'un peson, de capacité maximale de 600g et précision ± 5g.

La longueur de tarse est mesurée par un pied à coulisse. Une extrémité du réglet est placée juste à l'arrière du talon en face palmaire et la valeur est lue à l'extrémité de la griffe de l'orteil central (Figure 4B). La longueur de demi-aile était mesurée tous les jours à l'aide d'un réglet métallique (Figure 4C).

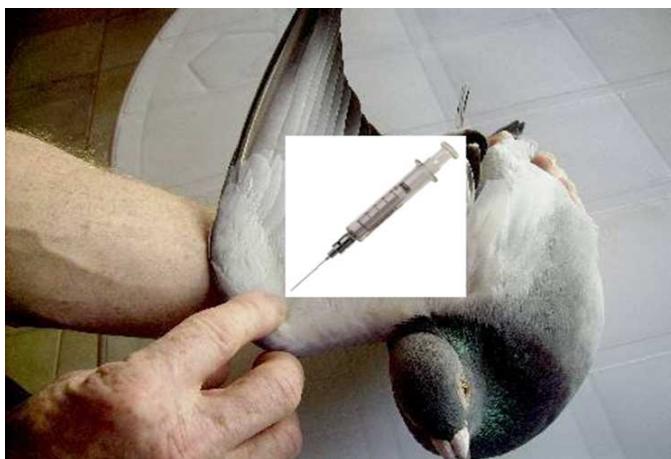


Figure 4 A: Prise de sang via la veine brachiale sur un pigeon biset

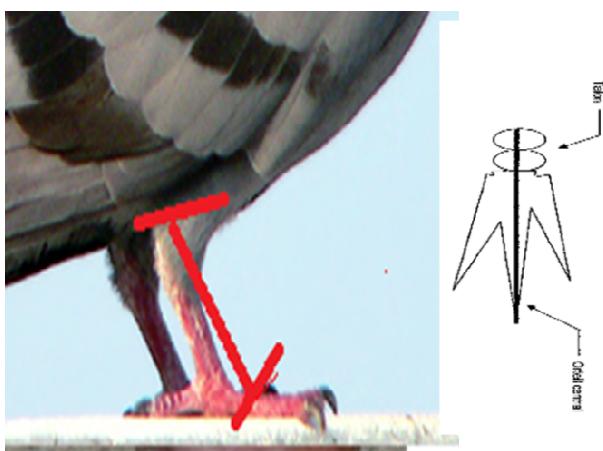


Figure 4 B: Mesure de la longueur du tarse en millimètres en utilisant le pied à coulisse



Figure 4 C: Une méthode utilisée afin de mesurer la demi-aile de pigeons en millimètres

Figure 4. Prise de sang et mesures morphologiques

3.3 Collecte et traitement des œufs en 2011 (contenant des embryons de la génération G2)

Les 25 couples formés en 2011 de la génération G1 ont pondu 143 œufs (contenant des embryons de la génération G2). Dès la ponte du deuxième œuf, les deux œufs étaient retirés et immédiatement congelés. Puis ils ont été laissés à décongeler pendant une minute, essuyés et pesés. Le jaune a été séparé du blanc pour l'analyse des anticorps. 92 œufs étaient issus de grand-mères bien nourries dont 29 œufs ayant des grand-mères qui ont subi une injection au KLH et 63 œufs ayant des grand-mères qui ont subi une injection au PBS. 51 œufs étaient issus des grand-mères mal nourries dont 22 œufs ayant des grand-mères faisant partie du groupe "vacciné" et 29 œufs ayant des grand-mères faisant partie du groupe contrôle .

3.4. Traitement des petits-enfants en 2012 (génération G2)

Au total, sur les 80 œufs qui ont été pondus en 2012, 69 œufs ont éclos. Ce qui donne un taux d'éclosion de 86.25%. A la fin des manipulations, 35 poussins ont survécu jusqu'à leur 56^{ème} jour. Tous les poussins nés en 2012 ont tous été nourris de manière *ad libitum*. Tous les poussins ont reçu une première injection de KLH au 21^{ème} jour, puis un rappel de vaccin au 35^{ème} jour. Nous avons ensuite fait des prises de sang sur tous les poussins toutes les semaines (aux 28^{ème}, 35^{ème}, 42^{ème} et 49^{ème} jours) afin de mesurer la production d'anticorps en réponse au vaccin. Les échantillons prélevés du 28^{ème} au 35^{ème} jours nous permettent de mesurer la réponse humorale primaire, tandis que les échantillons des 42^{ème} et 49^{ème} jours nous permettent de doser la réponse humorale secondaire déclenchée par le rappel. Par ailleurs, des prises de sang ont été faites sur tous les poussins avant l'injection au 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème} jours de vie de poussin) pour tester la transmission d'anticorps de la grand-mère aux poussins (G2).

3.5. Dosage d'anticorps anti-KLH par la technique ELISA

L'analyse s'effectue à partir de l'extraction au chloroforme des anticorps situés dans le jaune d'œuf (Mohammed *et al.* 1986), le surnageant contenant les anticorps est collecté pour le dosage. Pour les échantillons sanguins, ils sont centrifugés à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes pour obtenir le plasma qui va être analysé pour doser les anticorps anti-KLH.

La méthode ELISA est un test qui, grâce à la réaction enzymatique colorée des anticorps secondaires marqués, permet de détecter et de quantifier la présence de certains anticorps ou antigènes dans un produit. Le but de l'analyse immunologique de cette étude est de détecter les anticorps anti-KLH présents dans le plasma. Un test ELISA direct en Sandwich a donc été utilisé car l'anticorps anti-KLH est pris en sandwich entre un antigène KLH et un anticorps secondaire marqué.

La première étape de la manipulation consiste à fixer l'antigène KLH. Pour cela 100 µL de l'antigène KLH à 40 µL/ml de tampon est fixé au fond des 96 puits des plaques ELISA. Une étape de lavage au tampon phosphate (PBS) est effectuée. Puis, après avoir saturé les sites non spécifiques avec 250 µL de tampon PBS contenant 5% de lait pendant deux heures, puis les puits sont lavés avec du tampon. 100 µL du plasma ou de l'extrait d'œuf obtenu précédemment sont introduits dans les puits afin que les anticorps anti-KLH se fixent sur l'antigène KLH. Afin d'enlever tous les anticorps non spécifiques à la KLH, il faut procéder à une nouvelle étape de lavage. Par la suite, afin de pouvoir doser les anticorps anti-KLH, 100 µL d'anticorps secondaires anti-pigeon marqués à la peroxydase sont ajoutés dans les puits. Ces derniers vont se fixer aux anticorps de pigeons eux-mêmes fixés aux molécules de KLH. Une dernière étape de lavage est réalisée. Finalement, 100 µL d'OPD (substrat de la peroxydase) sont ajoutés, puis la réaction colorée est stoppée 15 minutes plus tard avec 50 µL d'Hcl. Les plaques sont ensuite lues avec un spectrophotomètre à 492 nm. Une gamme de

dilution allant du 1/32000 au 1/250 a été mise systématiquement en référence sur chaque plaque. Ceci permet ensuite d'obtenir une valeur relative de la concentration de KLH pour chaque individu. Ceci m'a permis de mesurer une réponse immunitaire humorale primaire (concentration à 28 ou 35 jours) et une réponse immunitaire humorale secondaire (concentration à 42 ou 49 jours).

CHAPITRE I

EFFETS MATERNELS

&

TRANSFERT D'ANTICORPS

MATERNELS

1. Effets maternels et l'immunité

Depuis une vingtaine d'années, l'étude des effets maternels a pris une ampleur importante dans de nombreux domaines de recherches (écologie évolutive, génétique, physiologique,..etc). De toute cette ferveur et de nombreux débats sur la terminologie des effets maternels est née une définition concise: on parle d'effet maternel pour tout ce qui concerne une influence du génotype et/ou du phénotype de la mère sur le développement et le phénotype de la future génération (Mosseau & Fox, 1998; Wolf & Wade, 2009). Un effet maternel constitue donc la part du phénotype de la descendance qui ne résulte pas de l'action de ses propres gènes (y compris l'effet direct des gènes de la mère) et de leur interaction avec l'environnement.

Des effets maternels ont été décrits chez divers vertébrés, et en particulier la plupart des études ont été effectuées chez les oiseaux, les lézards et les mammifères. Chez ces derniers, les effets maternels sont, a priori, plus évidents, étant donnés les échanges nombreux qui se font entre la mère et les jeunes par la voie placentaire lors de la gestation. De plus, après la naissance, les jeunes continuent à dépendre de leur mère pour les soins et la nourriture.

Les effets maternels peuvent se manifester à différents stades du développement de la progéniture (Figure 5), modifiant ainsi sa trajectoire ontogénique dont souvent les effets perdurent et se répercutent aussi à l'âge adulte (Wade, 1998)

1. Effets maternels prézygotiques où le phénotype de la mère et spécialement sa condition nutritionnelle vont affecter la taille et la qualité du gamète.
2. Au stade postzygotique-prénatal où la relation plus ou moins intime avec l'embryon va agir essentiellement sur des phénomènes de nutrition mais pas seulement (anticorps, biopeptides actifs, pathogènes, toxines...).

3. Effets maternels post-zygotiques postnataux où essentiellement le comportement et la compétitivité de la mère vont influencer sur le devenir des jeunes (Bernardo, 1996).

EFFETS MATERNELS

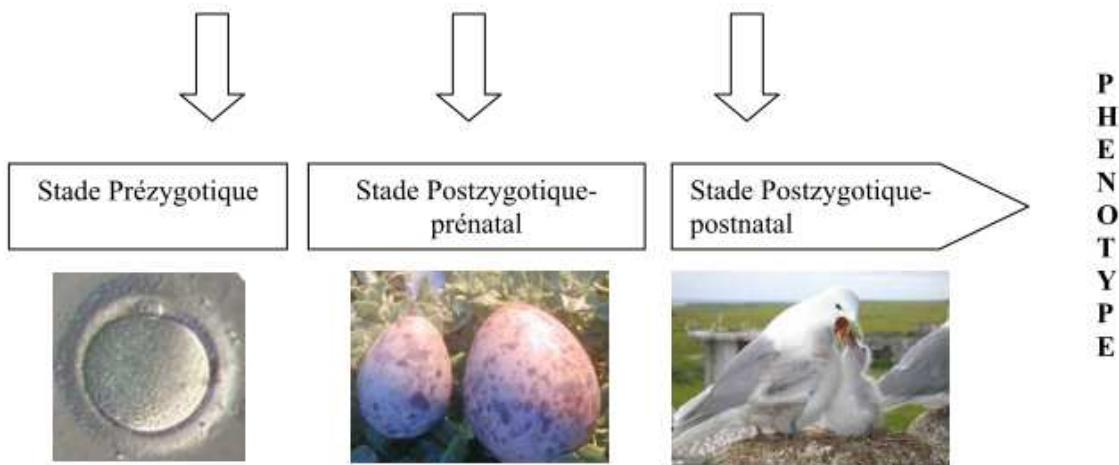


Figure 5: Les effets maternels se manifestent à différents stades du développement de la progéniture (Repris de Gasparini 2004 et d'après Mousseau & Fox, 1998)

On peut aussi tenter de classer les différents effets maternels selon les différents niveaux d'organisation biologique (Bernardo, 1996; Lacey, 1998) :

- ❖ Au niveau nucléaire: via l'empreinte génomique qui sont des modifications épigénétiques de l'expression des gènes via des modifications structurelles de l'ADN. En l'état actuel des connaissances, ces modifications semblent reposer essentiellement sur des méthylations/déméthylation de l'ADN et des modifications locales de la condensation nucléosomale (Reik, 2001).

- ❖ Au niveau physiologique : quantité de jaune d'oeuf, taille de l'endosperme (réserve), niveaux d'hormones, d'ARNm, hérédité d'organites par la mère (mitochondrie, chloroplaste)..etc.
- ❖ Au niveau de l'individu : par des comportements de distraction ou de défense contre la prédation, par le rang social (e.g. les babouins femelles dominantes influencent le rang et le sex-ratio de sa progéniture).

En effet, le jeune est sujet à l'environnement maternel durant les premières étapes de son ontogénie et cela influence les valeurs phénotypiques de nombreux caractères quantitatifs même lorsqu'ils sont mesurés chez l'adulte, entraînant des ressemblances chez les progénitures d'une même mère. Le caractère maternel est, par un degré plus ou moins important, déterminé par le génotype de la mère. De ce fait, les effets maternels sont souvent une source de confusion dans la détermination précise des paramètres utilisés en génétique quantitative dans l'optique de décortiquer le trait phénotypique de la progéniture influencé par un ou plusieurs effets maternels, et en particulier, pour déterminer la base génétique des traits d'intérêt (Falconer, 1974). Pour rendre compte des effets maternels, dans la variance phénotypique (VP) chez la descendance, on est alors obligé d'ajouter 2 sources de variation : VEm la variance due aux effets maternels, et VGxEm la variance due à l'interaction entre le génotype et ces effets maternels.

$$\begin{array}{c}
 \text{Plasticité phénotypique} \quad \text{Effet maternels} \\
 \hline
 \text{VP} = \text{VG} + \text{VE} + \text{VGxE} + \text{Verreur} + \text{VEm} + \text{VGxEm}
 \end{array}$$

VP est la variance phénotypique (ou variance totale), VG la part de la variance totale attribuable aux différences de génotype, VE la part attribuable aux changements d'environnement et qui constitue la première composante de la plasticité phénotypique, VGxE

mesure la variance due à l'interaction entre génotype et environnement ce qui correspond au fait que les génotypes peuvent ne pas répondre de la même façon à un changement d'environnement et constitue la deuxième composante de la plasticité nommée composante génétique de la plasticité.

De plus, chez les oiseaux, les effets parentaux agissent avant et après l'éclosion via, entre autres la qualité de l'œuf ou le lieu de ponte choisi par les parents (Saino *et al.* 2010). Les effets maternels peuvent influencer de nombreux paramètres (Figure 6), tels que la survie de la progéniture, son taux de croissance, et ont donc des effets sur la démographie, en modifiant la structure en âge d'une population, sa structure en taille, le sex-ratio, le transfert d'anticorps maternels et la réponse immunitaire des juvéniles. Les effets maternels sont des traits d'histoire de vie et il est donc important d'en comprendre leurs variabilités et leurs conséquences évolutives.

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement à la transmission de substances lors du développement embryonnaire. Ce stade représente une étape cruciale dans la formation d'un individu puisque c'est à ce moment là que s'impriment en grande partie les systèmes physiologiques et comportementaux. La mère pourrait donc disposer de plusieurs possibilités pour moduler le phénotype du jeune via l'investissement dans les œufs. Les anticorps sont de telles substances qui ont fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Depuis les travaux de Sheldon & Verhulst (1996), l'immunité est devenue l'un des champs disciplinaires importants en écologie (Sadd & Schmid-Hempel, 2007). Le transfert d'anticorps et son rôle dans la protection du jeune contre les maladies est l'un des premiers mécanismes à avoir été étudié comme un effet maternel (Ehrlich, 1892). En effet, dans les premiers jours de sa vie les nouveau-nés sont beaucoup plus vulnérables puisque leur système immunitaire n'est pas complètement développé (Grindstaff *et al.* 2003). Les anticorps, contenus dans le jaune sous forme d'immunoglobulines (Rose *et al.* 1974), sont donc un effet

maternel crucial pendant les premiers jours après l'éclosion (Staszewski *et al.* 2007) et un moyen par lequel la mère peut augmenter la survie de sa descendance (Buechler *et al.* 2002). En effet, le jeune, encore protégé par les anticorps de sa mère, peut allouer l'énergie économisée dans sa croissance (Pihlaja *et al.* 2006 ; Grindstaff *et al.* 2008). Et grâce à un meilleur nourrissage, les jeunes issus de mère de bonne qualité ont une croissance plus rapide comme l'a démontré une étude chez le Carouge à tête jaune (*Xanthocephalus xanthocephalus*) (Newbrey & Red, 2009). De plus, le phénotype de la mère peut influencer la réponse immunitaire du petit via la transmission d'anticorps maternels (Grindstaff *et al.* 2003).

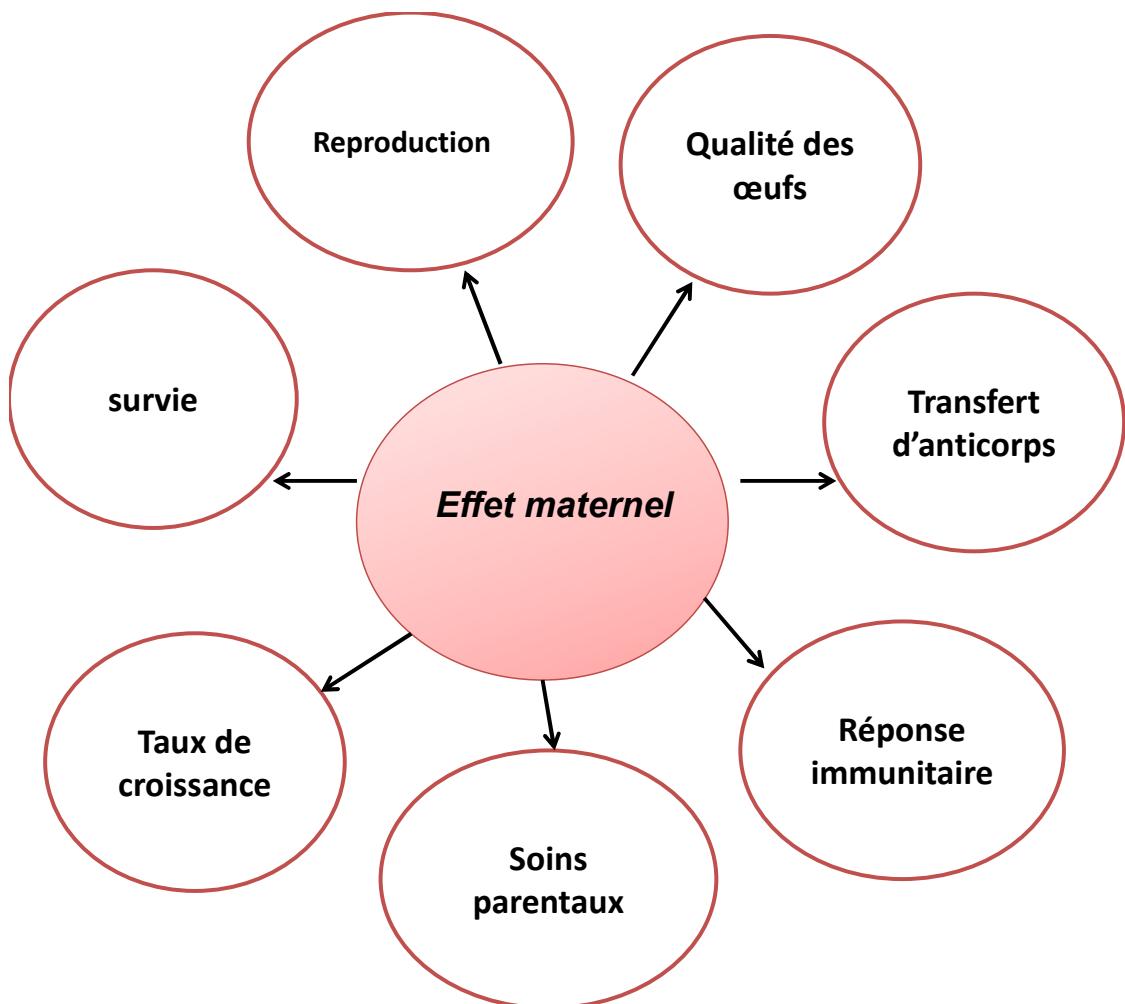


Figure 6: Des nombreux paramètres influencés par les effets maternels.

2. La transmission d'anticorps maternels

Transférer des anticorps maternels aide à protéger la progéniture jusqu'à ce que les réponses immunitaires adaptatives deviennent complètement efficaces. Ce fut d'abord décrit par Felix Klemperer (1893), qui a observé que chez les oiseaux l'immunité contre la bactérie du téton est transmise par le jaune d'œuf. Il a ensuite été abordé par Brierley et Hemmings,

(1956), qui ont démonté le transfert sélectif des anticorps à partir du jaune vers la circulation sanguine de l'embryon et des poussins éclos. Ces études et d'autres ont posé les fondements de l'idée que les anticorps maternels chez les oiseaux sont déposés dans l'œuf et par la suite absorbés par l'embryon lors de son développement (Brambell, 1970).

Les anticorps peuvent être transmis de deux manières : de façon prénatale via le placenta chez les mammifères et via l'œuf chez les oiseaux. Le transfert des anticorps maternels à la descendance via le jaune d'œuf est présent chez toutes les espèces aviaires étudiées jusqu'à présent (Rose *et al.* 1974; Dohms *et al.* 1978b; Liu et Higgins, 1990; Engberg *et al.* 1992).

Les oiseaux sont donc de bons modèles pour étudier ce type de transfert qui se font au travers de l'œuf facilement accessible (Fig 7). De plus, la mère a la capacité de transférer dans l'œuf des anticorps spécifiques aux parasites qu'elle a déjà rencontrés (Gasparini *et al.* 2001). Le jeune serait alors très dépendant de ces anticorps maternels qui pourraient lui offrir une protection transitoire durant les premiers jours de sa vie à un moindre coût énergétique (Pihlaja *et al.* 2006; Grindstaff, 2008). En général, la quantité d'anticorps transférée dans le jaune d'œuf ou dans le plasma des descendants est corrélée à la concentration contenue dans le sang de la mère au moment de la ponte (Annexe I). Cependant, certaines espèces ont développé des voies supplémentaires pour protéger leurs nouveau-nés de manière postnatale; le meilleur exemple est celui du pigeon (Goudswaard *et al.* 1979). Des oiseaux comme les pigeons, les manchots et les flamants roses produisent une sécrétion spécifique (**lait de jabot**) qui est régurgitée pour nourrir les poussins dans les premiers jours de leur vie (Johnston & Janiga, 1995). Ce dernier est sécrété par l'épithélium du jabot, sous forme de cellules desquamées gorgées de protéines et de lipides (Engberg *et al.* 1992; Eraud *et al.* 2008). Ce liquide pourrait permettre également une transmission de l'immunité parentale de manière postnatale. Mais leur rôle sur le phénotype des petits est totalement inconnu. Le lait de jabot, contrairement à celui des mammifères, ne contient pas de lactose. Par contre il est riche en

IgA avec des concentrations dans l'intervalle de 1,5 mg / ml, mais il ne contient que peu d'IgY. L'absorption des IgA du lait de jabot conduit à l'accumulation des IgA dans l'intestin, où il pourrait fournir une protection contre les pathogènes intestinaux. Très peu (Engberg *et al.* 1992), ou pas (Goudswaard *et al.* 1979) d'IgA sont transférés à travers la paroi intestinale dans la circulation et par conséquent, cela représente une immunité locale de l'intestin. Donc, les anticorps maternels postnataux pourraient être transférés et jouer un rôle protecteur pour le jeune (Gustafsson *et al.* 1994, Annexe I). A l'inverse chez les mammifères, l'exposition aux parasites des parents peut augmenter le niveau d'anticorps transféré après la naissance via le lait à ses descendants (Halliday, 1955; Garnier *et al.* 2013). Notre modèle d'étude (Pigeons biset) et notre approche expérimentale d'échange croisé d'œufs nous permettent de confirmer que le transfert d'anticorps via le lait de jabot (mère adoptive) n'affecte pas le taux d'anticorps circulant dans le sang du poussin et que celui-ci n'est affecté que par le taux d'anticorps transmis via le jaune d'œuf (mère biologique).

Par ailleurs, les anticorps sont classés selon leur poids moléculaire, leur structure et leur fonction. On distingue chez les oiseaux trois classes d'anticorps: **IgM**, **IgY** et **IgA**. Les IgYs sont sélectivement sécrétées dans le jaune d'œuf (Patterson *et al.* 1962a,b). Alors que, les IgMs ne peuvent pas passer à travers la membrane du jaune d'œuf et donc restent dans l'albumine (Hamal *et al.* 2006; Davison *et al.* 2008). La quantité d'IgY transférée à travers l'épithélium folliculaire dans le jaune est proportionnelle aux concentrations d'IgY dans le plasma des mères (Kramer and Cho, 1970; Loeken and Roth, 1983; Al-Natour *et al.* 2004; Hamal *et al.* 2006). La concentration d'IgY dans le jaune d'œuf chez le pigeon est d'environ 5,4 mg/ml (Engberg *et al.* 1992). Le mécanisme de transfert IgY n'est pas encore connu, mais est susceptible d'être médié par un récepteur (Loeken and Roth, 1983). Récemment, ce récepteur a été cloné et nommé FcRY (West *et al.* 2004). De plus, la quantité totale des IgY absorbée par l'embryon ne représente que 10% de celle déposée dans le jaune d'œuf. Le sort

des 90% restants n'est pas connu, mais le plus probable c'est qu'ils sont digérés avec le contenu du jaune d'œuf résiduel (Kowalczyk *et al.* 1985). Alors que les IgYs ne se trouvent que dans le jaune, mais pas l'albumine, l'inverse est vrai pour les IgM et IgA. Seules des quantités infimes de ces deux isotypes peuvent être détectées dans le jaune (Yamamoto, 1975), dont la plupart sont sécrétées dans le blanc d'œuf (Rose *et al.* 1981), concentrations atteignant de 0,15 et 0,7 mg / ml pour les IgM et IgA, respectivement (Rose *et al.* 1974). Par contre, les IgA et IgM sont sécrétées dans le tractus intestinal, et elles jouent un rôle important dans la protection précoce de l'intestin.

1. **IgY:** présentes dans le sang et le vitellus. Elles sont les homologues aviaires des IgG et IgE des mammifères, sauf que chez les oiseaux la chaîne de molécule H est plus longue que chez les mammifères.
2. **IgA:** responsables de l'immunité locale, sont présentes dans les muqueuses et le lait de jabot.
3. **IgM:** sont structurellement et/ou fonctionnellement homologues chez l'oiseau et ne diffèrent pas par rapport à leur homologue des mammifères. Invariablement, les IgM apparaissent rapidement dans le sérum sanguin juste après l'infection ou la vaccination et disparaissent aussi rapidement.

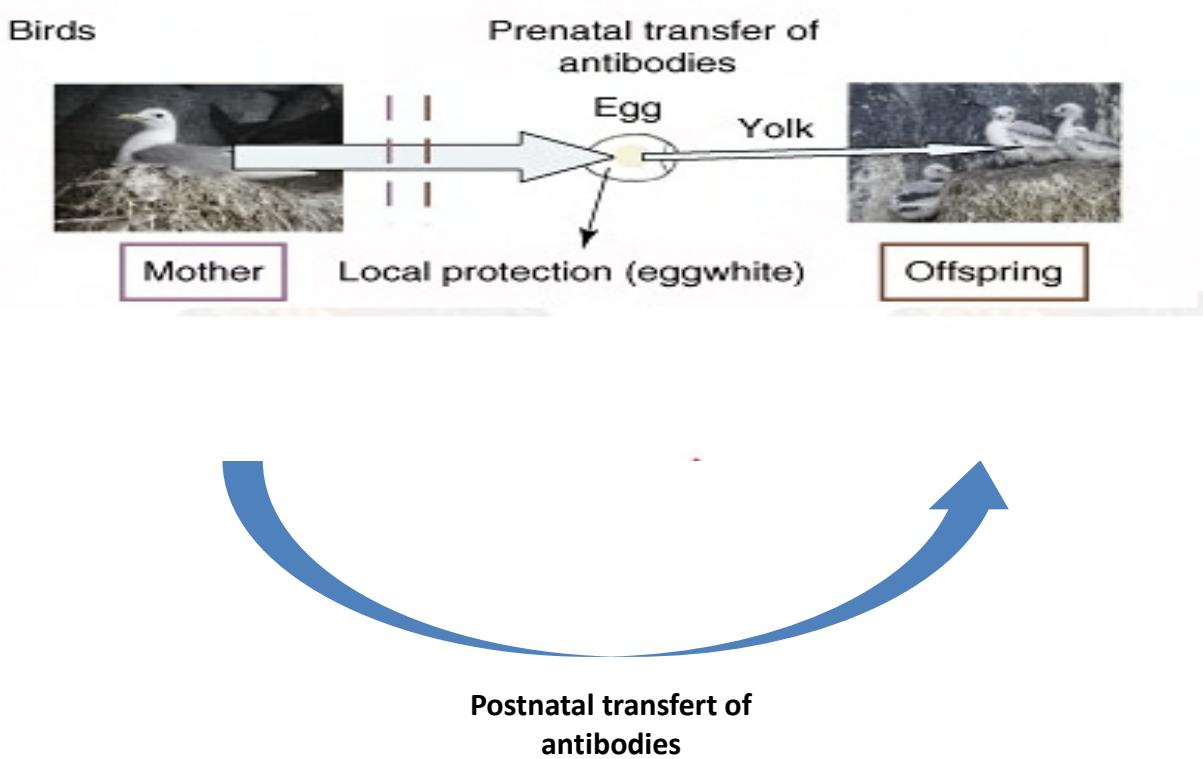


Figure 7: Transfert pré-*et* post-natal d'anticorps chez les oiseaux (tiré de Boulinier & Staszewski, 2008).

3. Rôle de la nutrition dans le transfert et la persistance des anticorps maternels

La nutrition est un important régulateur du système immunitaire. L'équilibre et la quantité appropriée de nutriments sont importants pour le développement, le maintien et la réponse immunitaire des petits. La transmission d'anticorps maternels peut être affectée par la nutrition des femelles (Table 1). Par exemple, chez le rat (*Rattus norvegicus*), les femelles nourries par un régime alimentaire pauvre en protéines produisent du colostrum avec des niveaux d'IgG deux fois inférieurs à ceux des femelles témoins (Michalek *et al.* 1975). Chez les mammifères, une restriction protéique chez la mère peut diminuer la production d'anticorps par les mères et l'absorption des anticorps par la descendance (Roulin & Heeb, 1999). La disponibilité alimentaire rencontrée en début de vie a des effets importants sur le développement du système immunitaire (Gasparini *et al.* 2006).

Dans cette partie de thèse, je me suis focalisé sur la transmission et la persistance d'anticorps dans le plasma des oisillons en fonction de la restriction alimentaire. Certaines études ont montré que la nutrition peut avoir un effet positif sur la transmission d'anticorps et certaines ont montré un effet négatif (Table 3). Par exemple, chez la mouette tridactyle (*Rissa tridactyla*), les mères transfèrent des niveaux plus élevés d'anticorps maternels dans leurs œufs lorsque leur consommation de nourriture a été expérimentalement réduite (Gasparini *et al.* 2007). De même, chez la pyrale indienne de la farine (*Plodia interpunctella*), les mères en mauvais état nutritionnel augmentent le transfert de la résistance maternelle aux petits (Boost *et al.* 2012). En revanche, chez la caille japonaise (*Coturnix japonica*), la manipulation des protéines n'a eu aucun effet sur le transfert des anticorps maternels dans des œufs (Grindstaff *et al.* 2005). Chez de nombreux vertébrés, on peut donc s'attendre à ce que les femelles en bonnes conditions (i.e. disponibilité de nourriture abondante) transmettent plus d'anticorps à leurs petits que les femelles en mauvaises conditions. De même, si le transfert d'anticorps maternel est coûteux, les mères en mauvais état nutritionnel peuvent être moins capables de transférer des anticorps maternels à leur progéniture. Pour tester cette hypothèse, une étude a été menée chez le pigeon biset (Annexe I). Nos résultats montrent que, à 3 jours, la concentration en anticorps anti-KLH est plus grande chez les poussins dont les mères ont reçu une alimentation illimitée que chez les poussins dont les mères ont été restreintes (Figure 8; Annexe I).

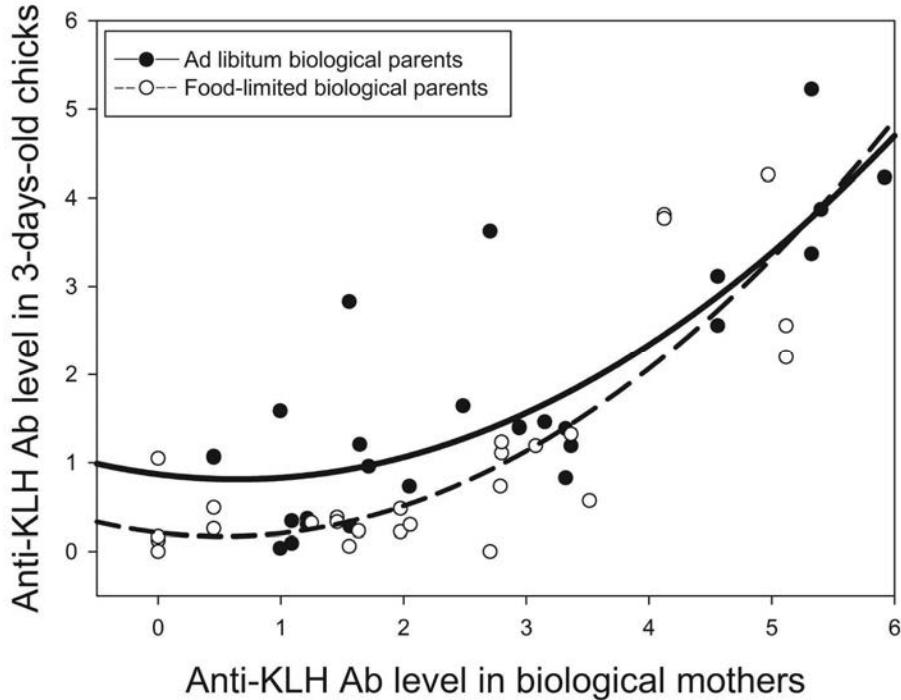


Figure 8. Relation quadratiques positives entre les niveaux d'anticorps anti-KLH des poussins à 3 jours et celui de leurs mères biologiques. Les points de couleur indiquent le traitement alimentaire (blanc = nourriture limitée, noir = nourriture non limitée).

4. Décroissance des anticorps maternels

Les anticorps maternels sont transmis soit passivement par la mère à travers le vitellus au cours de l'oviposition (Kowalczyk *et al.* 1985) (c'est l'immunité maternelle), soit par la vaccination (immunité active artificielle), soit à la suite d'une infection récente (immunité active naturelle). Le rôle protecteur direct d'anticorps maternels doit être limité à une période assez courte dans les premiers jours de la vie des poussins. En général, les anticorps maternels disparaissent dans les premières semaines de vie (Davison *et al.* 2008). Quelques études montrent que la persistance des anticorps maternels est variable entre les différentes espèces (e.g. Graczyk *et al.* 1994; Gibbs *et al.* 2005; Chang *et al.* 2007; Nemeth *et al.* 2008; King *et al.* 2010). Par exemple, des études montrent que les anticorps maternels peuvent être prédominants chez la progéniture jusqu'à 14 jours d'âge chez les oiseaux d'élevage (Apanius, 1998; Nemeth & Bowen, 2007), 9-12 mois pour un nourrisson après sa naissance (Albrecht *et*

al. 1977; Nicoara *et al.* 1999), 1-3 semaines chez les souris (Takemori and Rajewsky, 1984; Okatomo *et al.* 1989; Anderson, 1995). Des études récentes montrent que la variabilité de la persistance des anticorps maternels entre espèces chez les oiseaux pourrait être liée à la longévité des espèces (Garnier *et al.* 2012). En effet, les anticorps maternels persistent plus chez un oiseau longévif comme le puffin cendré (*Calonectris diomedea*) que dans une espèce d'oiseau à durée de vie plus courte comme la mouette tridactyle (*Rissa tridactyla*) (Gasparini *et al.* 2002; Garnier *et al.* 2012). De plus, un déclin rapide de l'immunité avec l'âge a été détecté chez les oiseaux à courte durée de vie (réponse à la PHA : Lozano & Lank, 2003; Cichon *et al.* 2003; Haussmann *et al.* 2005b; niveaux d'anticorps naturels : Parmentier *et al.* 2004). Par contre le taux de déclin d'anticorps est beaucoup plus faible chez les oiseaux longévifs (Haussmann *et al.* 2005b).

De plus, la persistance temporelle d'anticorps maternels dans le plasma chez les poussins est connue pour être affectée par la quantité initiale reçue (Grindstaff, 2010; Annexe I), qui est elle-même directement liée au niveau d'anticorps circulant chez la mère (Gasparini *et al.* 2002). Parce que les descendants ont la capacité de cataboliser l'anticorps maternel et d'affecter ainsi leur persistance temporelle, la condition de l'environnement qui affecte les processus physiologiques sont susceptibles de jouer un rôle important dans l'immunité de la progéniture. En conséquence, la persistance des anticorps maternels peut être façonnée par des forces évolutives agissant à la fois sur le phénotype des parents et des petits. Toutefois, on connaît peu les facteurs qui influent sur la capacité de transfert et la persistance temporelle des anticorps maternels chez les juvéniles et les coûts énergétiques pour les femelles et la progéniture.

Les résultats de l'annexe I suggèrent que la persistance des anticorps anti-KLH maternels n'a été affectée que par le niveau initial d'anticorps maternels présents chez les poussins à 3 jours d'âge (Figure. 9). Les poussins avec des niveaux plus élevés en anticorps anti-KLH à 3 jours

(correspondant à ceux qui circulent chez les mères biologiques; voir la Figure 8) ont montré une décroissance plus forte des niveaux l'anticorps anti-KLH au fil du temps (Figure. 9). En conséquence, chez les poussins en provenance de mères biologiques immunisées, nous avons trouvé des corrélations positives entre les anticorps anti-KLH à 3 et 7 jours ($N = 30$, $r = 0,95$, $p <0,0001$), 3 et 14 jours ($n = 30$, $r = 0,85$, $p <0,0001$), et 3 et 21 jours ($N = 30$, $r = 0,78$, $p <0,0001$, Figure 10). De plus, nous n'avons pas trouvé d'effet du traitement des aliments sur cette persistance, ce qui suggère qu'il n'est pas coûteux en énergie de maintenir les anticorps maternels pour les nouveau-nés et que l'apport alimentaire n'augmente pas la capacité des jeunes à cataboliser ces anticorps maternels (Annexe I). Nos résultats confirment d'autre part que les anticorps maternels transmis par le lait de jabot n'affectent pas la concentration en anticorps circulant chez le jeune poussin (absence d'effet des mères adoptives).

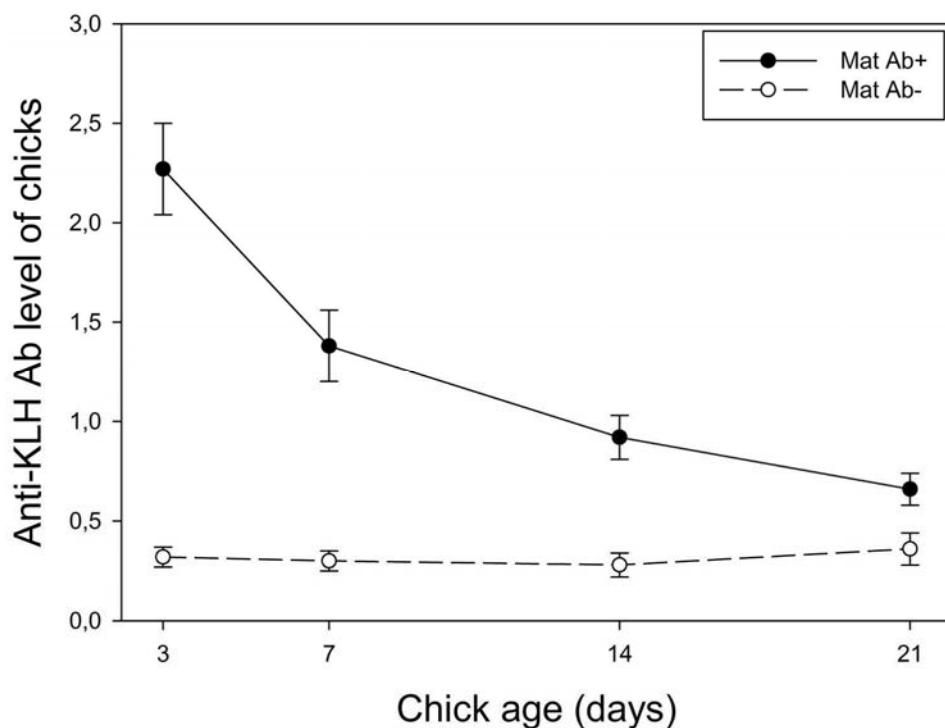


Figure 9. Persistance des Anticorps anti-KLH maternels chez les poussins en fonction de l'âge. A titre d'illustration, nous avons divisé les poussins en deux catégories sur la base du niveau anticorps maternels anti-KLH médian à 3 jours d'âge: les poussins qui ont reçu des niveaux élevés d'anticorps maternels anti-KLH (Mat Ab +; au-dessus de la médiane) sont représentés par des points noirs et les poussins qui ont reçu de faibles niveaux d'anticorps maternels anti-KLH (Mat Ab-; en dessous de la médiane) sont représentés par des points blancs.

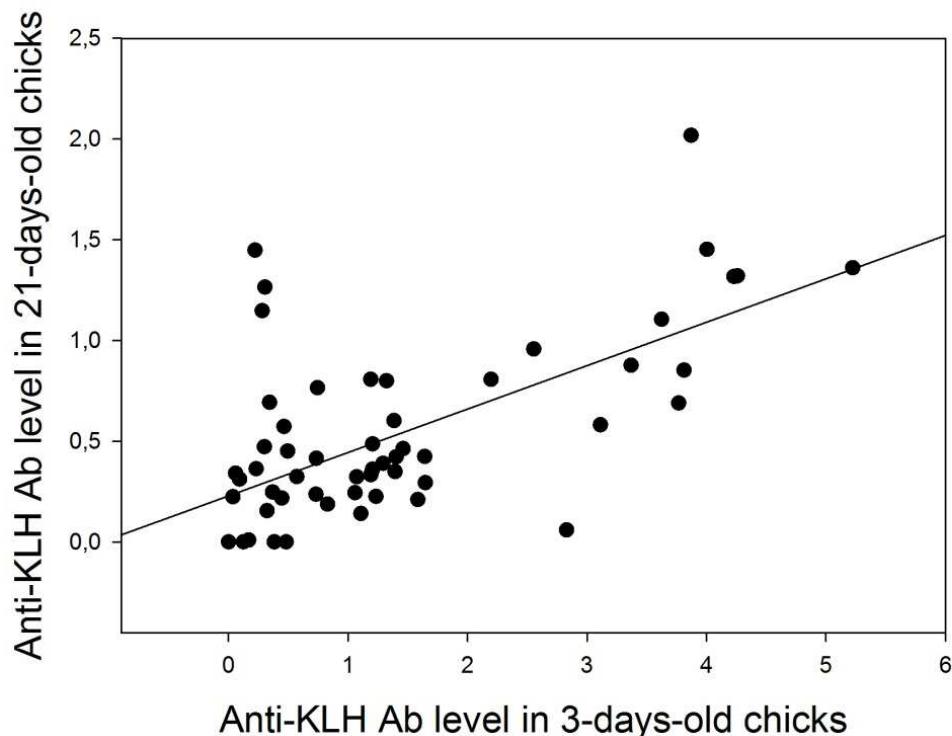


Figure 10. Relation positive entre le taux d'anti-KLH entre le 3^{ème} et le 21^{ème} jours de vie du poussin.

Espèce	Régime alimentaire	Transfert d'anticorps maternel	Référence
Lesser black-backed gull (<i>Larus fuscus</i>)	+ caroténoïde	Effet négatif	Blount <i>et al.</i> 2002b
Quail Japonaise (<i>Coturnix japonica</i>)	± protéines avec nutrition ad libitum	Pas d'effet	Grindstaff <i>et al.</i> 2005
<i>Magpie (Pica Pica)</i>	nutrition ad-libitum avec oeuf cru	Effet positif	Pihlaja <i>et al.</i> 2006
Kittiwake (<i>Rissa tridactyla</i>)	nutrition ad-libitum vs food restricted	Effet positif de la nutrition restreinte	Gasparini <i>et al.</i> 2007
Ural owl (<i>Strix uralensis</i>)	nutrition ad-libitum avec éclos mort (<i>Gallus gallus</i>)	Effet positif	Karell <i>et al.</i> 2008
Pigeon feral (<i>columbia biset</i>)	(nutrition ad-libitum vs food restricted)	Effet positif de la nutrition ad libitum	Ismail <i>et al.</i> 2013 (Annexe I)

Table 3. Effet du régime alimentaire sur le transfert d'anticorps maternels.

CHAPITRE II

*DIVERSITE DES EFFETS DES
ANTICORPS MATERNELS*

1. La fonction immunitaire comme un trait d'histoire de vie

Les traits d'histoire de vie sont l'ensemble des caractéristiques d'un organisme (d'un génotype) qui ont un impact sur sa valeur sélective. Dans le contexte de l'immuno-écologie, les variations immunologiques entre espèces et individus sont partiellement expliquées par la variation d'un trait d'histoire de vie (Martin *et al.* 2006b; French *et al.* 2009). Dans certaines conditions environnementales, il y a des coûts et des trades-offs (compromis) associés à la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique. Par exemple, l'allocation des ressources pour chaque trait d'histoire de vie va définir une stratégie. Cette stratégie peut changer au cours du temps (la proportion de ressources allouée à un trait d'histoire de vie va varier), en fonction des conditions environnementales et des pressions de sélection exercées sur les individus. Il existe une très grande variabilité (entre individus et entre espèces) dans la force, l'efficacité et la rapidité de la réponse immunitaire (Schmidt-Hempel, 2003). Cette variabilité est expliquée par l'existence de coûts de l'immunité. Cette notion de coûts découle de la théorie des traits d'histoire de vie (Roff, 1992; Stearns, 1992). Cette théorie se base plus spécifiquement sur les caractères ayant un lien direct avec la reproduction ou la survie, tels que la taille à la naissance, la taille et l'âge à la maturité sexuelle, le nombre de descendants produits, leur capacité à survivre. De plus, la fonction immunitaire est considérée dans le contexte des traits d'histoire de vie comme un investissement qui doit être confronté avec les autres composantes du cycle de vie (Norris et Evans, 2000).

Le système immunitaire des oiseaux a deux composantes principales: **l'immunité innée** (non spécifique) et **l'immunité acquise** (spécifique) (Roitt *et al.* 1998; Glodsbys *et al.* 2000). **L'immunité non spécifique (innée)** encore appelée naturelle ou naïve, correspond à une réponse constitutive d'action immédiate, non spécifique de l'agent pathogène, **non adaptative**. Elle repose sur une distinction globale du soi et du non-soi, elle permet à l'organisme de mener à bien des premiers mécanismes de défense contre un agent infectieux

et est donc considérée efficace à court terme (Fearon et Locksley, 1996; Babiuk *et al.* 2003).

On distingue tout d'abord les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes Natural Killer, ainsi que la sécrétion de cytokines et de protéines solubles comme les protéines du complément. L'activité des **cellules Natural Killer** (NK: plus proches du phénotype lymphocytaire T) varie en fonction de l'âge chez les oiseaux: elle est faible pendant les premières semaines de la vie et augmente ensuite progressivement. L'immunité **innée** fournit une réponse immédiatement recrutable en attendant que l'immunité acquise devienne opérationnelle. L'immunité innée a aussi de particulier qu'elle ne développera pas de mémoire à l'égard des agents pathogènes. Le système immunitaire inné est plus coûteux en termes de nutriments (Klasing & Leshinsky, 1999) et d'énergie (Raberg *et al.* 2002) que le système immunitaire acquis spécifique. Néanmoins, lors d'une inflammation (Lochmiller et Deerenberg, 2000; Schmidt Hempel & Ebert, 2003), les anticorps naturels sont considérés comme faisant partie du système immunitaire inné et il a été suggéré que, chez les mammifères, ils coopéreraient avec le système du complément en tant que première ligne de défense (Thornton *et al.* 1994) et augmenteraient la défense immunitaire de la progéniture. Les mécanismes immunitaires innés semblent être pleinement fonctionnels dans les réponses immunitaires adaptatives des nouveau-nés mais ne se développent de manière optimale qu'après les premières semaines après l'éclosion seulement. Classiquement, les réponses innées sont considérées comme importantes lors des premières phases de l'invasion microbienne en limitant la propagation de l'agent pathogène jusqu'à ce que les réponses adaptives (Lymphocytes B et T) se mobilisent pour éliminer l'infection. **L'immunité spécifique (acquise)** ou adaptative, prend le relais de l'immunité innée lorsque celle-ci n'est pas suffisamment efficace. L'immunité **adaptative** ou **acquise** est apparue il y a environ 500 millions d'années chez les premiers vertébrés. Cette réponse est **spécifique** de l'antigène du fait que les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes, portent un seul type de

récepteur (immunorécepteurs spécifiques de l'antigène (TCR/BCR)) capable de reconnaître un déterminant antigénique (encore appelé épitope). De plus, cette immunité se caractérise par la mise en place d'une mémoire immunologique qui permet de protéger l'organisme contre les antigènes déjà rencontrés. Elle repose sur une distinction très fine du non-soi parce qu'au cours de leur fabrication dans les **organes lymphoïdes primaires**, la majeure partie des cellules de l'immunité adaptative reconnaissant des antigènes du soi sont éliminées. **L'immunité adaptative** est plus lente mais est spécifique du pathogène. Les cellules de l'immunité acquise sont **les lymphocytes B et T**. Ils sont respectivement responsables de l'immunité humorale et cellulaire. Les **lymphocytes T** représentent 60 à 70 % des lymphocytes, sont responsables des réponses cellulaires (régulation ou cytotoxicité). Les précurseurs des cellules T migrent de la moëlle osseuse vers le **thymus** où ils prolifèrent et se différencient avant de gagner la périphérie. Les **lymphocytes B** originaires de la **Bourse de Fabricius** chez les oiseaux sont responsables de la réponse humorale (production d'anticorps) appartenant à la catégorie moléculaire des **immunoglobulines** (Ig). L'immunité acquise implique la réponse suivante ciblée spécifique et la reconnaissance des activateurs spécifiques de la fonction immunitaire (lors d'un premier contact antigénique, l'organisme développe une **réponse primaire**). La réponse acquise a généralement un effet minime sur les besoins énergétiques et nutritionnels de l'oiseau, car la qualité de nutriments utilisés pour la production d'anticorps et l'expansion des populations de cellules B est minime (Henken et Brandsma, 1982; Henken *et al.* 1982, 1983; Klasing et Calvert, 1999). Donc, une partie de cette réponse immunitaire acquise se traduit par la production de composés immunoactifs, les anticorps ou immunoglobulines, qui vont pouvoir être en partie transférés à la génération suivante et ainsi fournir une protection temporaire aux jeunes durant la phase critique de maturation de leur propre système immunitaire (Wallach *et al.* 1992; Smith *et al.* 1994;

Carlier & Truyens, 1995; Al-Natour *et al.* 2004; Kariyawasam *et al.* 2004; Pravieux *et al.* 2007) avant d'être éliminés du système circulatoire du juvénile par le métabolisme.

2. Rôle des anticorps sur la réponse immunitaire des poussins à court terme

Le jeune est très dépendant des anticorps maternels qui lui offrent une protection transitoire durant les premiers jours de sa vie à un moindre coût énergétique (Pihlaja *et al.* 2006; Grindstaff *et al.* 2008). Le système immunitaire joue un rôle central dans la survie d'un organisme car il lui permet de limiter l'impact négatif des pathogènes. Cependant, il existe une grande variabilité de qualité de réponse immunitaire entre les individus qui peut s'expliquer par plusieurs facteurs. En effet, le système immunitaire est très flexible et est très influencé par les conditions environnementales (présence de pathogènes, ressources alimentaires disponibles). De plus, le phénotype de la mère peut influencer la réponse immunitaire du petit via la transmission d'anticorps maternels (Grindstaff *et al.* 2003). Le poussin commence à développer ses propres mécanismes de défense au cours de la vie embryonnaire, mais l'immunocompétence apparaît seulement quelques jours après l'éclosion (Mast et Goddeeris, 1999). D'un point de vue immunologique, la période post-éclosion est cruciale car le poussin est brutalement exposé aux antigènes sur une large gamme et l'immunité maternelle n'est pas ajustée comme elle l'est chez les mammifères par le colostrum.

Ces dernières années, un nombre croissant d'études se sont penchées sur le transfert d'anticorps de la mère au poussin via le jaune d'œuf qui dépend de la présence de parasites dans l'environnement maternel (Gasparini *et al.* 2001, 2002, Annexe I) et a des effets inhibiteurs et/ ou potentiellement éducateurs des défenses immunitaires (Gasparini *et al.* 2006, Jacquin *et al.* 2012). Bien que des éléments du système immunitaire inné, comme des lysozymes (protéines antibactériennes), puissent être transmis de la mère aux petits (Saino *et*

al. 2002b), nous nous focaliserons ici sur la transmission d'éléments du système immunitaire acquis, en particulier la transmission d'anticorps (réponse humorale). Le système humorale (production d'anticorps) des jeunes met un certain temps avant d'être opérationnel : 10-14 jours pour certains oiseaux (Gasparini *et al.* 2006; Grindstaff *et al.* 2006), plusieurs semaines pour les poulets et rongeurs, et plusieurs mois à années pour les humains (Apanius 1998, Grindstaff *et al.* 2003). Ce laps de temps laisse le jeune sensible aux attaques d'éléments pathogènes pendant les premiers moments de sa vie. En effet, malgré un intérêt certain porté sur les effets à court terme du transfert d'anticorps maternels sur la réponse immunitaire des jeunes, peu d'attention a été portée sur l'influence que ceux-ci peuvent avoir à long terme (Staszewski *et al.* 2007). Deux scenarios proposés montrent comment le transfert d'anticorps maternels peut impacter la réponse humorale chez les petits.

2.1. Les anticorps maternels inhibent la réponse humorale des poussins

Les anticorps transmis dans l'œuf peuvent avoir un effet négatif à court terme sur le développement du système immunitaire des poussins (« effet bloquant »), et inhiber la réponse humorale du jeune (Boulinier & Staszewski, 2008; Grindstaff *et al.* 2003; Hasselquist & Nilsson, 2009; Staszewski & siitari, 2010). L'effet bloquant se traduit par une interférence entre les anticorps maternels et la production d'anticorps par le jeune lui-même. Ceci induit une baisse significative du taux d'anticorps produits par le jeune. Les anticorps transmis par la mère bloqueraient la réponse immunitaire du poussin en diminuant l'efficacité de l'antigène (Al Natour *et al* 2004). Cependant le mécanisme à l'origine de cet effet inhibiteur n'est pas bien connu. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition de la réponse du poussin par les anticorps maternels: **(i)** les anticorps maternels neutralisent rapidement les agents antigéniques, rendant la charge antigénique trop faible pour impliquer une réponse des

cellules B et T; **(ii)** le complexe immun « Anticorps maternel: Antigène » se lie aux récepteurs des lymphocytes B, les empêchant de s'activer et de produire des anticorps; **(iii)** les complexes immuns « Anticorps Maternel: Antigène » sont éliminés par des phagocytes, réduisant les niveaux d'antigène présentés aux lymphocytes B, mais n'empêchant pas la présentation d'épitopes aux lymphocytes T, permettant ainsi la mise en mémoire de l'antigène; et enfin **(iv)** les anticorps maternels se lient aux épitopes spécifiques les masquant aux lymphocytes B (Staszewski *et al.* 2007; Revue: Hasselquist & Nilsson, 2009). Un tel phénomène peut être adaptatif en limitant l'énergie dépensée par le jeune pour sa réponse immunitaire, permettant ainsi de l'allouer à d'autres composantes du budget énergétique (e.g. la croissance, Grindstaff, 2008). Dans cette étude, nos résultats montrent que les anticorps prénataux bloquent la réponse immunitaire primaire et secondaire du jeune contre la KLH de manière spécifique (Figure 11), ce qui est couramment trouvé chez les oiseaux (Staszewski *et al.* 2007; Jacquin *et al.* 2012), mais il est intéressant car cet effet inhibiteur n'interagit pas avec la disponibilité de la nourriture. Ces données renforcent l'idée que l'anticorps maternel est vraiment crucial dans l'élaboration de l'immunité humorale en début de vie et ne dépend pas d'un autre facteur important de l'environnement tel que la quantité de ressources disponibles dans l'habitat (disponibilité en nourriture).

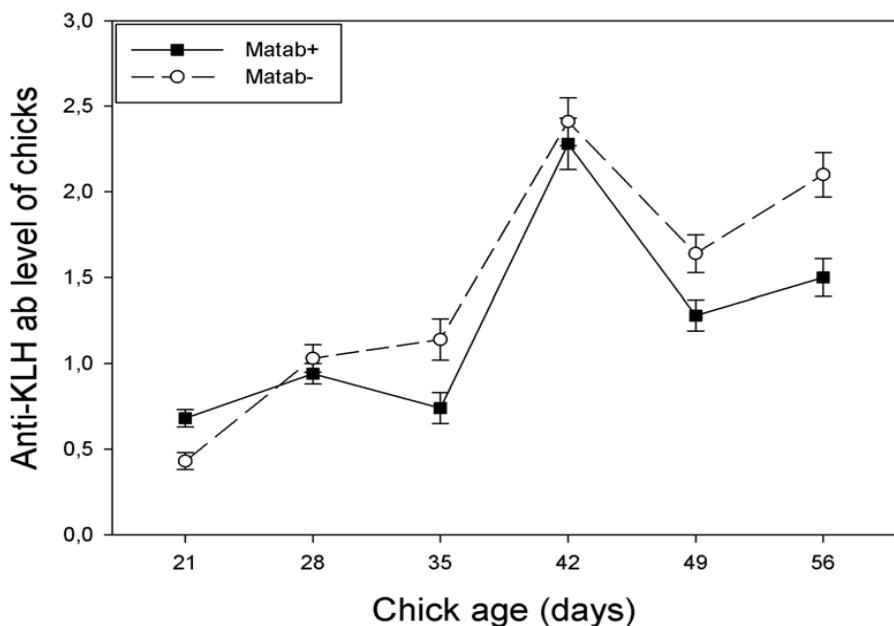


Figure 11: Réponse immunitaire humorale des poussins au cours du temps, mesurée par le niveau anti-KLH en fonction du niveau d'anticorps maternels anti-KLH mesuré chez les poussins à 3 jours de vie du poussin. À titre d'illustration, nous avons divisé les poussins en deux catégories sur la base du niveau maternel médian d'anti-KLH à trois jours d'âge: les poussins qui ont reçu des niveaux élevés d'anti-KLH (MatAb +; au-dessus de la médiane) sont représentés par des carrés noirs et les poussins qui ont reçu de faibles niveaux d'anti-KLH (MatAb-; au-dessous de la médiane) sont représentés par des points blancs.

2.2. Les anticorps maternels éduquent la réponse humorale des poussins

Les anticorps maternels transférés à la descendance ne fournissent pas seulement une protection passive dans la vie précoce du jeune, mais peuvent avoir des effets positifs à long terme sur le développement du système immunitaire. Par exemple, après la disparition des anticorps maternels, la réponse immunitaire du jeune face à un antigène spécifique se trouve améliorée s'il a reçu des anticorps maternels spécifiques à cet antigène. C'est ce que l'on appelle un «effet éducateur» (Gasparini *et al.* 2006). Les anticorps maternels augmenteraient la capacité du jeune à former une réponse humorale en présence d'un antigène via un effet sur la formation du répertoire immunitaire (Lawrence *et al.* 1981). De tels effets ont été suggérés chez des modèles humains (Anderson, 1995), souris (Lemke *et al.* 2003; 2004), et oiseaux

(Gasparini *et al.* 2006; Reid *et al.* 2006). Des observations chez la souris, ont montré que la réponse des jeunes souriceaux était de type secondaire (réponse de grande amplitude médiée par des lymphocytes B et T mémoires), dès la première injection, s'ils avaient reçu des anticorps maternels (Okamoto *et al.* 1989). Cependant, ces effets sont encore mal définis et les mécanismes sous-jacents mal connus. Lemke & Lange (1999), ont proposé un mécanisme en expliquant comment l'anticorps maternel pourrait jouer un rôle éducatif dans le développement de l'immunité humorale des descendants. Ils ont suggéré que les immunoglobulines et les récepteurs d'antigènes des cellules B forment un réseau d'interaction d'idiotypes qui est fonctionnellement relié au compartiment des cellules T. Dans ce contexte, la fonction des immunoglobulines comme antigène interne dans le réseau pourrait donc influencer directement le développement du système immunitaire du nouveau-né (Anderson, 1995).

3. Nutrition maternel et le développement des nouveau-nés

Le taux de croissance est un trait d'histoire de vie souvent lié à divers composants de fitness, y compris la survie, l'âge de première reproduction et la fécondité (Hofer and East, 1993; McAdam and Millar, 1999; Lochmiller *et al.* 2000; Dobson and Oli, 2001; Johnson, 2003). Après l'éclosion, le poussin croît jusqu'à atteindre sa taille adulte, sur une période qui varie entre espèces. Par exemple, dans notre modèle d'étude, le jeune pigeonneau est élevé par ses parents et prend son envol environ 20 jours après l'éclosion. Les petits sont nourris durant la première semaine environ par le lait de jabot (que les deux parents régurgitent ; Levi 1969; Johnston and Janiga, 1995). Le lait de jabot améliore la croissance des poussins (Meagan *et al.* 2012). La nutrition est peut-être le facteur non génétique le plus déterminant pour le développement du juvénile. La disponibilité des nutriments est fonction de la

composition corporelle, des réserves nutritionnelles et du régime de la mère de leur bon acheminement via le placenta (Phillips, 2006), ou via l'œuf chez les oiseaux (Johnston et Janiga, 1995). Des études mettent en évidence des liens entre la nutrition et la croissance. La nutrition prénatale influence la croissance et le développement physiologique des nouveau-nés (Morgane *et al.* 2006). Le stress parental comme la limitation des ressources peut déprimer le taux de croissance des juvéniles (Ricklefs *et al.* 1968; Dijkstra *et al.* 1990; Cook *et al.* 1991, Dawson & Bidwell., 2005), Ainsi, chez le Carouge à tête jaune (*Xanthocephalus xanthocephalus*), les jeunes issus de mère de bonne qualité ont une croissance plus rapide via un meilleur nourrissage (Newbrey, 2009). Du point de vue de la mère, cette production a un coût important en termes d'énergie et de nutriments car elle utilise ses réserves accumulées avant la conception et ses ressources sont consommées pendant la formation de l'œuf (Nager, 2006; Costantini, 2010). Par conséquent, la condition physiologique des femelles détermine la qualité des œufs (Verboven *et al.* 2003), et donc des futurs poussins car leur croissance dépend de la qualité des soins maternels qu'ils vont recevoir (protection, nourrissage ...).

Les parents sont ainsi capables d'ajuster le phénotype des jeunes ce qui leur permet d'obtenir un phénotype optimal en fonction des conditions environnementales (Pihaja *et al.* 2006). De plus, la nutrition maternelle peut affecter la croissance du squelette de l'oisillon en modifiant la qualité des œufs. En effet, le jaune d'œuf constitue la principale source d'énergie et de nutriments disponibles pour l'embryon (Johnston et Janiga, 1995; et selon Christians, 2002), et il existe une relation positive entre la taille de l'œuf et la qualité du poussin. Dans ce cas, il a été proposé que le phénotype des parents, influencé par les conditions environnementales rencontrées (nourriture, pathogène), en particulier par la mère, va donc fortement modifier le phénotype de la génération suivante mais également de nombreux autres traits qui vont affecter leur valeur adaptative (Mousseau & Fox, 1998), à la fois au niveau de sa réponse immunitaire, via les anticorps maternels par exemple, et au niveau de sa

croissance, par un effet indirect des anticorps maternels (**effet prénataux**), ou par un effet direct via le lait de jabot et les soins parentaux (qualité du nourrissage, protection contre les prédateurs) (**effets postnataux**). Cependant, le rôle relatif des conditions rencontrées par les parents avant et après la naissance est encore mal compris. Dans ce contexte, nos premiers résultats obtenus ont montré que les croissances de masse corporelle, d'aile et de tarse étaient significativement plus élevées chez les poussins issus de mères adoptives bien nourris en comparaison avec celles des poussins issus de mères adoptives mal nourries (tableau 1. Annexe II).

4. Effet des anticorps maternels transmis aux poussins sur leur croissance

Dans les premiers jours de vie de poussin, le jeune, étant protégé par les anticorps de sa mère, pourrait allouer l'énergie économisée dans sa croissance (Soler *et al.* 2003; Pihlaja *et al.* 2006; Grindstaff *et al.* 2008). Une étude de Heeb *et al.* (1998) a montré l'effet positif sur le taux de croissance et le recrutement de poussins de mésanges charbonnières (*Parus major*) dont la mère avait été exposée à un ectoparasite. Chez la pie bavarde (*Pica pica*), en revanche, les immunoglobulines maternelles n'affectaient pas significativement la taille des poussins mais il y avait cependant une relation négative entre la production d'immunoglobulines par le poussin et sa croissance pendant les dix premiers jours, indiquant l'existence d'un compromis entre ces deux traits et donc le rôle possible (et indirect, du moins dans ce cas) du transfert d'anticorps maternels sur la croissance des jeunes (Pihlaja *et al.* 2006). Il est clair que le transfert d'anticorps maternels est fondamental pour la survie des poussins dans les premiers stades de développement, mais actuellement on ne sait pas précisément dans quelle mesure ils peuvent continuer à agir indirectement sur les divers traits phénotypiques même après avoir été catabolisés. Certaines études mettent en doute un rôle des anticorps maternels sur la

croissance des petits à court terme (Grindstaf *et al.* 2006; Staszewski *et al.* 2007). Nos résultats montrent tout d'abord que la croissance de la masse corporelle est significativement affectée par la quantité d'anti-KLH et le traitement alimentaire comme indiqué par l'interaction entre les niveaux anticorps maternels et le traitement alimentaire (tableau 1. Annexe II). Dans le groupe « bien nourris », les poussins ayant reçu des quantités plus faibles d'anticorps maternels (MatAb-), étaient plus lourds que les poussins ayant reçu une plus grande quantité d'anticorps maternels (MatAb +; Figure 12, modèle mixte, $F_{1,255} = 3,76$, $P = 0,05$). Cette différence n'a pas été trouvée pour le groupe « mal nourris » ($F_{1,254} = 0,00$, $P = 0,98$). En outre, quel que soit le traitement alimentaire, les poussins ayant reçu des quantités plus faibles d'anticorps maternels (MatAb-), ont tendance à avoir un tarse plus long que les poussins ayant reçu une plus grande quantité d'anticorps maternels (MatAb +) (Figure 2b; tableau 1 Annexe II). Nos résultats suggèrent plutôt que la réception d'anticorps maternels entraîne certains coûts pour les poussins en termes de croissance et ne permettent pas d'économiser l'énergie à partir d'une réponse immunitaire coûteuse. Ceci est cohérent avec une étude précédente sur les pigeons dans laquelle nous avons trouvé, sur un échantillon de taille plus petite, que les anticorps maternels postnataux pourraient nuire à la croissance (Jacquin *et al.* 2012). Ensemble, nos résultats suggèrent également que lorsque la disponibilité alimentaire est faible, les poussins d'un pigeon pourraient limiter sa croissance en faveur de l'immunité. En effet, nous avons trouvé que le traitement alimentaire n'affectait que la croissance et pas l'immunité. De plus, nos résultats renforcent l'idée que l'anticorps maternel joue un rôle central chez le nouveau-né par la modulation de la réponse immunitaire, et appellent à des études à long terme pour élucider les conséquences précoce de ce facteur environnemental sur la condition physique des adultes et des stratégies d'histoire de vie.

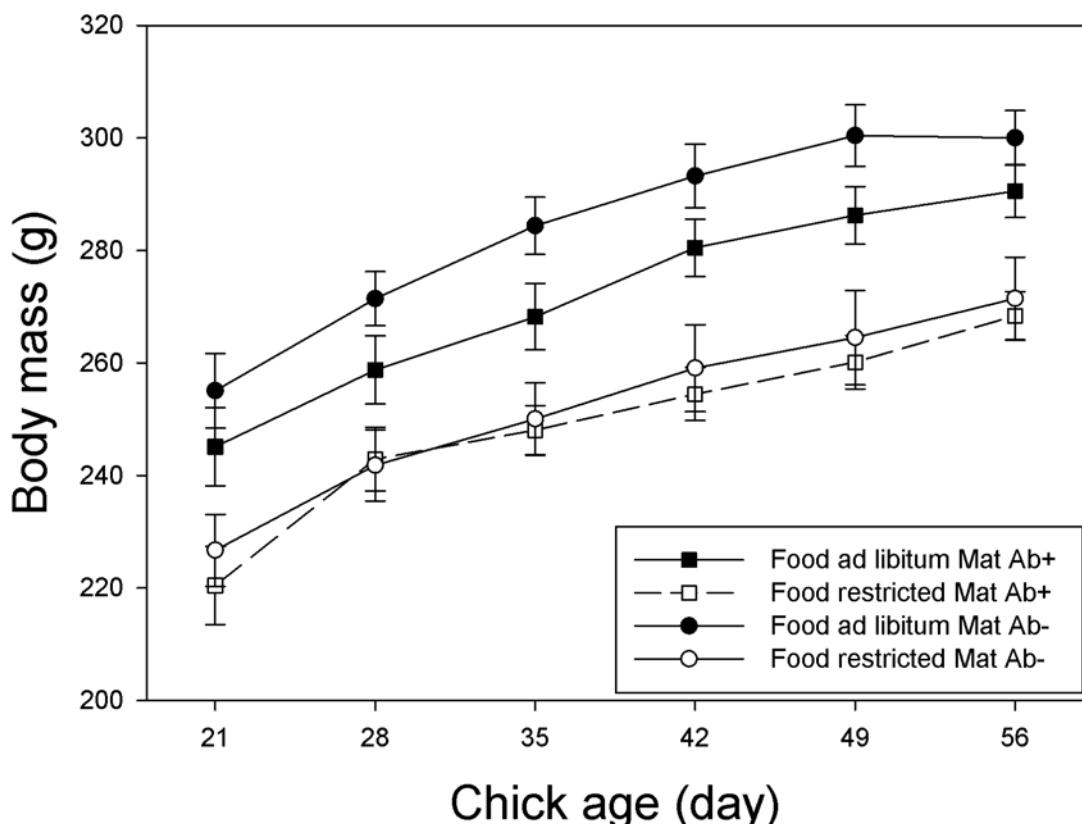
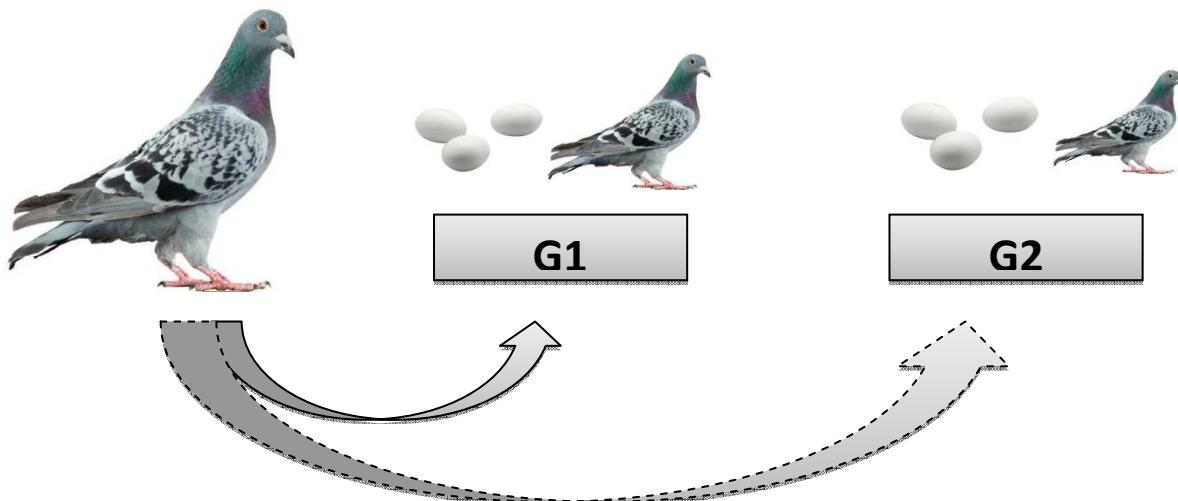


Figure 12: Masse corporelle au cours du temps (âge) en fonction du niveau d'anticorps maternels anti-KLH et le traitement alimentaire. À titre d'illustration, nous avons divisé les poussins en deux catégories sur la base du niveau d'anticorps maternels médian anti-KLH à 3 jours d'âge: les poussins qui ont reçu des niveaux élevés d'anticorps maternels anti -KLH (MatAb+; au-dessus de la médiane) et du traitement restreint sont représentés par des carrés blancs, les poussins qui ont reçu des niveaux élevés d'anticorps maternels anti-KLH (MatAb+) et du traitement alimentaire *ad libitum* sont représentés par des carrés noirs, les poussins qui ont reçu de faibles niveaux d'anticorps maternels anti-KLH (MatAb-; au-dessous de la médiane) et du traitement restreint sont représentés par des points blancs et les poussins qui ont reçu de faibles niveaux d'anticorps maternels anti-KLH (MatAb-) et du traitement *ad libitum* sont représentés par des points noirs.

CHAPITRE III

*LES ANTICORPS COMME
MESSAGER DE L'IMMUNITÉ
SUR PLUS D'UNE
GÉNÉRATION*



1. Effets grand-maternels

Si les effets maternels peuvent apporter un avantage en terme de fitness à la génération suivante, il est qualifié dans ce cas d'effet maternel adaptatif. La nature de l'environnement maternel peut être perçue par ces dernières qui ajustent ainsi le phénotype de leur descendant au milieu où ils devront vivre (Bernardo, 1991). Une question reste néanmoins peu étudiée qui est de savoir si cet effet maternel, qui modifie le phénotype de la première génération sans modifier le génotype, se maintient à la deuxième génération. Autrement dit est-ce que l'environnement rencontré par les grand-mères se répercute sur les petits-enfants ? En effet, tous les effets maternels précédemment décrits peuvent affecter de manière indirecte les petits-enfants. On parle dans ce cas d'effet grand-maternel. Cet effet existe quand une partie du phénotype du descendant (petit-enfant) n'est pas le résultat de l'action de ses propres gènes et de l'interaction de ses gènes avec l'environnement, mais est le résultat d'un phénomène d'hérabilité non-génétique. L'effet grand-maternel est donc l'influence indirecte du phénotype de la grand-mère génération G0 sur le phénotype de ses petits-enfants génération G2 qui passe obligatoirement par l'intermédiaire du phénotype de la mère génération G1 qui a subi un effet maternel. Ces effets grand-maternels constituent un bon exemple de mécanismes épigénétiques.

2. Facteurs épigénétiques

L'hérabilité génétique entre une grand-mère et ses descendants ne fait pas de doute. Cependant d'autres mécanismes d'hérabilité comme une transmission épigénétique existent et sont encore assez mal connus. **L'épigénétique** est l'étude des changements mitotiquement stables et potentiellement méiotiquement héritables de l'expression des gènes qui ne peuvent être expliqués par des changements de la séquence d'ADN (Richards, 2006; Bird, 2007).

Chez les organismes pluricellulaires, on reconnaît deux types de cellules: **les cellules germinales et les cellules somatiques**. Les cellules germinales sont responsables de la transmission de l'information génétique aux générations suivantes tandis que les cellules somatiques constituent l'organisme lui-même et sont fonctionnellement et structurellement hétérogènes. En outre, la quantité d'anticorps transmis à l'œuf et la capacité des mères à transmettre des anticorps peut être affectée par des variations épigénétiques acquises en début de la vie à travers des processus multi-générationnels. En effet, l'environnement maternel peut affecter plusieurs générations consécutives, comme par exemple chez les mammifères (voir Curley *et al.* 2011). Ces mécanismes épigénétiques peuvent jouer un rôle in utero et/ou dans l'enfance. Par exemple, les traitements médicamenteux, le vieillissement et l'alimentation sont des facteurs qui peuvent agir sur l'épigénome qui est l'état épigénétique de la cellule. Parmi les processus de transmission épigénétique, il y a le transfert d'anticorps. Récemment, des études chez les rats ont montré que les anticorps maternels peuvent être transmis sur plusieurs générations (Lemke *et al.* 2004). Les résultats de ces études démontrent l'existence d'un effet grand-maternel et proposent que le phénotype, mais pas le génotype, de résistance aux parasites des individus est affecté par un messager intergénérationnel: l'anticorps maternel. La plupart des recherches sur les effets épigénétiques chez les oiseaux sur une première génération s'est focalisé sur les effets des expositions à des stress environnementaux sur les traits de comportement, l'expression des gènes et la méthylation d'ADN dans la progéniture (Lindqvist *et al.* 2007; Goerlich *et al.* 2012). Frésard *et al.* (2013) ont montré que l'environnement parental a un effet sur la génération G1 et cela est particulièrement évident chez les mammifères, puisque la mère élève les petits du stade zygote jusqu'à la naissance. Ces effets se produisent également dans la génération G2, étant donné que la génération G1 porte les cellules germinales primordiales qui vont se différencier en cellules précurseurs de gamètes et éventuellement former un animal G2. De cette manière, l'environnement maternel

peut affecter les deux générations suivantes (Figure 13). En effet, L'environnement maternel peut avoir un impact sur les individus G1 et G2 (Frésard *et al.* 2013). Chez les oiseaux, l'environnement maternel a un impact sur les individus de la génération (G1) via le contenu de l'œuf. Cependant, il peut aussi avoir un impact sur les individus de la génération G2, puisque la progéniture porte les cellules germinales primordiales (PGC) qui se différencient plus tard en cellules précurseurs des gamètes et conduisent finalement à des individus de la génération G2.

La transmission épigénétique transgénérationnelle peut être rare, mais elle a déjà été signalée dans différentes espèces de mammifères. Par exemple, chez l'homme, Pembrey (2010) a indiqué que la disponibilité alimentaire du grand-père paternel a affecté le taux de mortalité des petits-fils, mais pas la mortalité des petites-filles, alors que la disponibilité alimentaire de la grand-mère paternelle a affecté le taux de mortalité des petites-filles mais pas des petits-fils (Kaati *et al.* 2007). À notre connaissance, aucune transmission transgénérationnelle des marques épigénétiques n'a été étudiée chez des oiseaux avant l'étude rapportée par Jablonka & Raz (2009) et Ho & Burggren (2010). Les variations épigénétiques au cours de la petite enfance jouent un rôle dans la production des différences inter-individuelles dans les phénotypes. Par conséquent, l'analyse de la diversité phénotypique inter-individuelle doit considérer à la fois les variations épigénétiques et génétiques (Szyf *et al.* 2009).

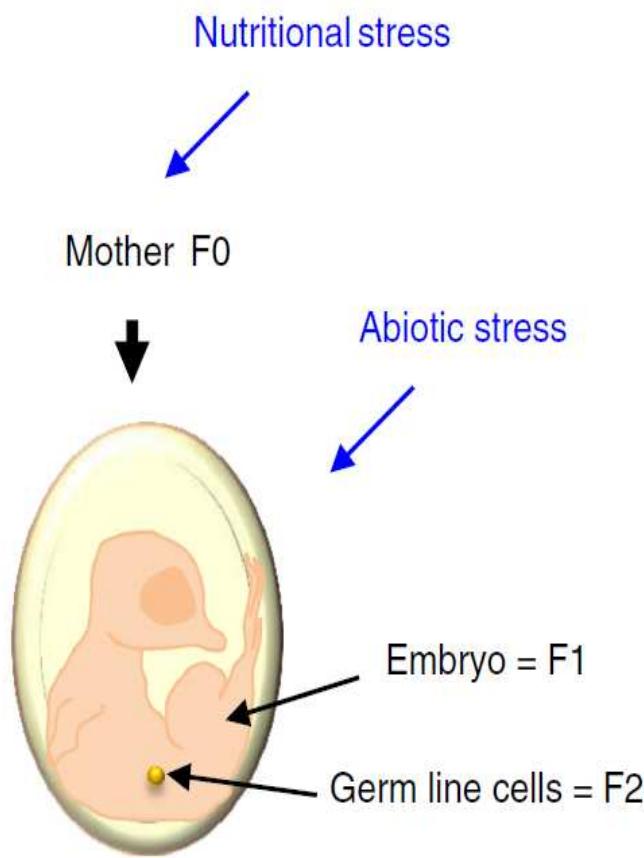


Figure 13: L'environnement maternel a un effet sur la génération G1 & G2 (tirée de Frèsard et al., 2013).

D'ailleurs, l'**hypothèse de bénéfice à long terme** propose qu'un important transfert d'anticorps maternels soit l'effet à long terme sur le système immunitaire de la progéniture. (Lemke & Lange, 1999; Lemke et al. 2004; Hasselquist and Nilsson, 2009). Récemment, plusieurs études ont montré que les effets épigénétiques pouvaient persister 3-4 générations chez les mammifères (Gluckman et al. 2007; Jablonka et Raz, 2009), 10-15 générations ont été rapportées chez les insectes et même jusqu'à 10-40 générations chez les nématodes *Caenorhabditis elegans* (Jablonka et Raz, 2009).

La relation entre l'environnement, les phénomènes épigénétiques et les effets transgénérationnels a été un pilier de la recherche génétique de ces dernières années et a récemment reçu une grande attention de la part des chercheurs écologues (Bossdorf et al.

2008) et évolutifs (Pigliucci, 2007). Du coup, le transfert transgénérationnel épigénétique est l'un des sujets les plus explorés. Néanmoins, l'effet de dépôt maternel de substances physiologiques dans l'œuf reste très peu étudié. Les physiologistes ont étudié la façon dont le transfert maternel de ces facteurs physiologiquement actifs pourrait influencer le phénotype physiologique de la progéniture. Chez les espèces ovipares comme les reptiles, les amphibiens, les oiseaux et certains poissons, le développement de l'embryon se produit dans un environnement d'œuf autonome, dont les caractéristiques sont la conséquence directe de la situation de la mère au moment de la formation de l'œuf (McNabb, 1988; Janzen *et al.* 2002; Poisbleau *et al.* 2009).

Dans cette thèse, l'expérience a été réalisé pour mettre en évidence l'existence d'une transmission épigénétique d'anticorps de la génération G0 jusqu'à la génération G2 et l'impact de cette transmission épigénétique sur la réponse immunitaire des individus.

3. Transfert d'anticorps grand-maternels

D'après l'étude menée par Lemke *et al.* (2004), les anticorps maternels peuvent être transmis sur plusieurs générations et peuvent être un messager transgénérationnel non génétique. Dans cette thèse, pour tester cette hypothèse, les grand-mères ont été soumises à deux traitements immunitaires (voir méthodes) et nous avons regardé comment ce traitement affectait la capacité des futures mères à transmettre des anticorps dans le jaune d'œuf contenant la génération G2. Si l'anticorps maternel constitue un messager intergénérationnel sur plusieurs générations, nous pouvons prédire que la concentration en anticorps anti-KLH dans le jaune d'œuf serait plus importante dans les œufs issus des grand-mères maternelles injectées au KLH en comparaison des grand-mères injectées avec le sérum physiologique. Cependant, dans cette étude, notre résultat montre que la concentration en anticorps anti-KLH

dans le jaune d'œuf n'est pas significativement affectée par les traitements des grand-mères (Figure 14 ; modèle mixte: $F_{1,117}=0.58$, $P=0.45$; Annexe III).

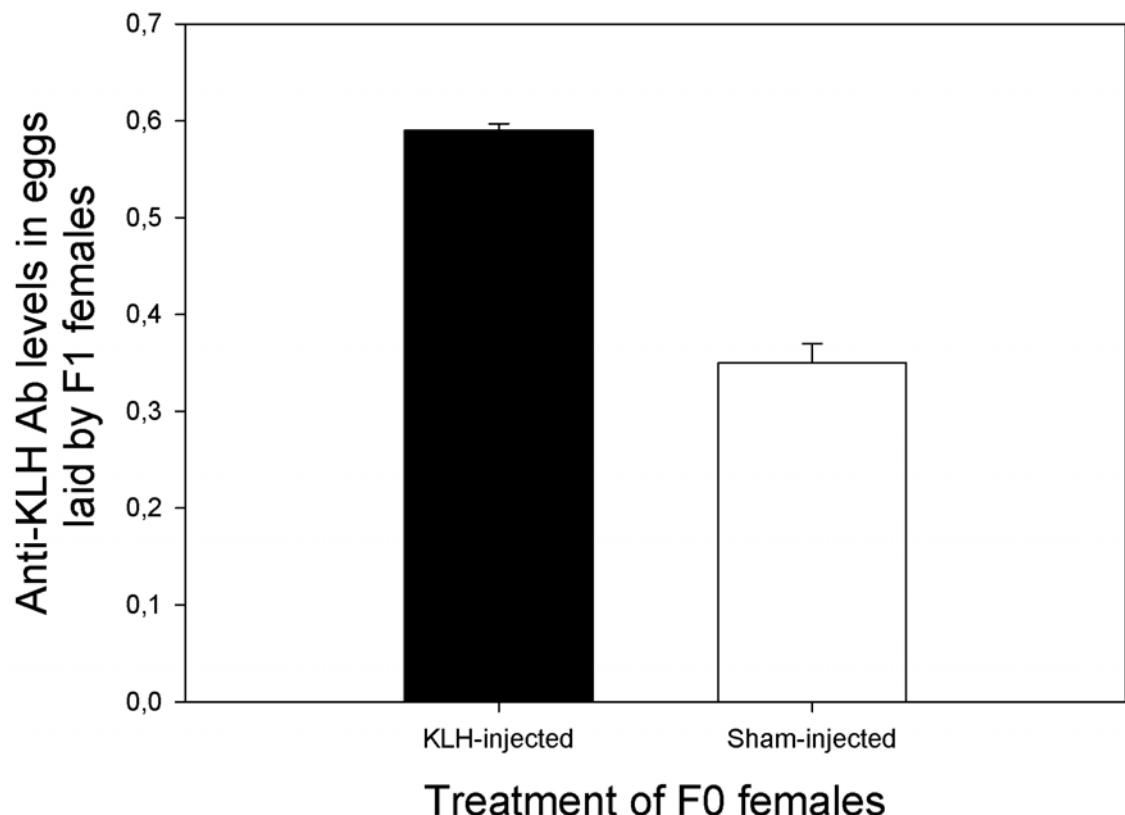


Figure 14: Moyenne \pm erreur standard (SE) des niveaux anti-KLH d'anticorps dans le jaune d'œuf des grand-mères injectées par l'antigène KLH et des grand-mères injectées par la solution saline PBS.

4. Réponse humorale de la génération G2

Nos connaissances sur les coûts de la réponse immunitaire à long terme sont très limitées, même si le stress oxydatif et les pathologies immunitaires sont des facteurs ayant le potentiel de réduire l'espérance de vie (Hanssen *et al.* 2004; Hasselquist & Nilsson, 2009). En outre, on sait peu sur les effets synergiques ou antagonistes possibles entre les différents investissements maternels dans l'œuf, par exemple, les anticorps maternels, les hormones et

les caroténoïdes (Blount *et al.* 2002), qui peuvent affecter l'équilibre entre les coûts et les avantages du transfert d'anticorps maternels dans des conditions différentes.

- La transmission transgénérationnelle des immunoglobulines, qui ont le potentiel de modifier le phénotype de la descendance et dont la transmission peut donc être considérée comme un processus épigénétique (Lemke *et al* 2004; Poulin et Thomas, 2008), est intéressante et stimulant et mérite une étude plus approfondie.
- Le mécanisme de protection des anticorps transgénérationnels serait particulièrement important pour la qualité et la survie du nouveau-né, même si cela peut être troqué contre les coûts potentiels à long terme sur la progéniture.

Dans cette thèse, nous avons analysé la concentration en anticorps anti-KLH dans le plasma des poussins G2 en relation avec le traitement immunitaire des grand-mères maternelles (voir chapitre I). La réponse immunitaire secondaire des poussins est significativement affectée par le traitement immunitaire des grand-mères biologiques comme le montre l'interaction significative entre la vaccination des grand-mères biologiques et l'âge du poussin (Modèle mixte: $F_{8,248}= 2,89$; $P= 0,004$). A 21 et 35 jours, les poussins ont reçu une injection en KLH. Une réponse immunitaire primaire apparaît à 28 jours et une réponse immunitaire secondaire à 49 jours. Lors de la réponse secondaire (49^{ème} jour), les poussins issus de grand-mères biologiques ayant reçu une injection en KLH ont une concentration en anticorps anti-KLH supérieure aux poussins descendant de grand-mères ayant reçu une injection en PBS (Figure 15 ; Annexe III).

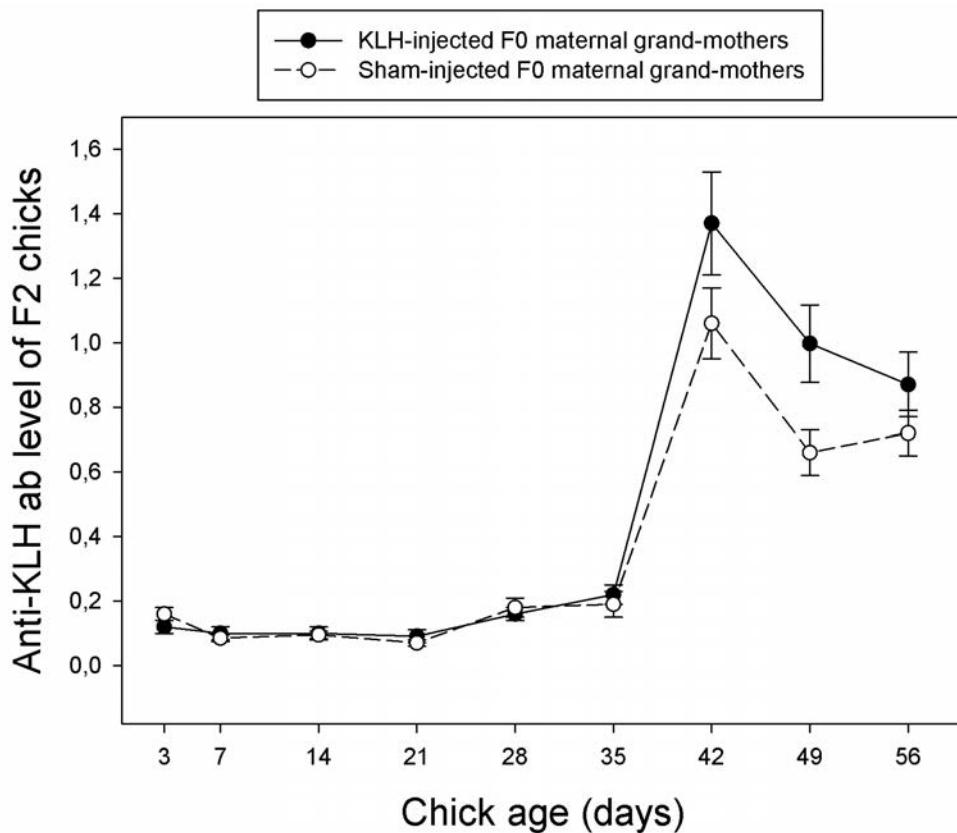


Figure 15 : Réponse immunitaire humorale des poussins G2 suite à l'injection de KLH à 21 et 35 jours, mesurée par le niveau d'anti-KLH en fonction de l'âge pour les poussins G2 qui avaient une grand-mère maternelle injectée avec le KLH (points noirs) et les poussins G2 qui avaient une grand-mère maternelle injectée avec le PBS (points blancs).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le pigeon biset s'est révélé être un modèle d'étude extrêmement riche en enseignements. Sa proximité avec l'homme et leurs caractéristiques écologiques et comportementales, ainsi que la facilité de leur élevage présentent de grandes potentialités pour la compréhension des effets maternels et grand-maternels. De plus, depuis longtemps le pigeon est un modèle en immunologie et en physiologie.

1- transfert des anticorps maternels et leurs persistances

Tout d'abord, l'étude (I) nous montre que le transfert d'anticorps maternels n'est pas seulement affecté par l'environnement antigénique des mères mais également par la disponibilité en nourriture, suggérant un coût du transfert d'anticorps pour les mères. La persistance d'anticorps maternels n'était, quant à elle, pas affectée par la disponibilité en nourriture.

Par ailleurs, nos résultats renforcent l'idée qu'il n'existe pas de transfert postnatal d'anticorps maternels en tout cas pas d'IgY. En conséquence, ce résultat suggère soit que le lait de jabot ne contient pas d'anticorps ou soit que ces anticorps ne traversent pas la barrière intestinale du poussin pour atteindre la circulation sanguine, en accord avec le travail de Jacquin *et al.* 2012.

D'un point de vue physiologique, la nutrition joue ainsi un rôle central dans la régulation du système immunitaire. Les résultats de nos études ont montré que la limitation de la nourriture semble être un facteur important qui diminue le transfert d'anticorps maternels (Boulinier & Staszewski, 2008). Ce résultat est en désaccord avec des études précédentes (Gasparini *et al.* 2007; Boost & Robert, 2012) où la mère avec une limitation de nourriture transférait plus d'anticorps maternels à ses petits. Les résultats de notre étude (Annexe I) suggèrent que la persistance des anticorps anti-KLH maternels semble n'être affectée que par le niveau initial

d'anticorps maternels présents dans les poussins à 3 jours d'âge. Ce résultat est en accord avec le travail de Grindstaff *et al.* 2010 où le taux initial des anticorps maternels des jeunes est important pour la persistance de ces anticorps. De plus, nous n'avons pas trouvé d'effet du traitement alimentaire sur cette persistance, ce qui peut suggérer qu'il n'est pas coûteux en énergie de maintenir les anticorps maternels pour les nouveau-nés et que l'apport alimentaire n'augmente pas la capacité des jeunes à cataboliser les anticorps maternels.

2. Effet des anticorps maternels dans la résoltution du trade-off entre la réponse immunitaire et la croissance.

Nos travaux (Annexe II) ont montré que la croissance des poussins était positivement corrélée avec la disponibilité en nourriture. De plus, nous avons pu montrer l'importance des anticorps maternels en interaction avec la disponibilité en nourriture dans la mise en place des résistances immunitaires. Nos résultats obtenus suggèrent que les anticorps prénataux bloquent la réponse immunitaire du jeune contre la KLH de manière spécifique, ce qui est couramment trouvé chez les oiseaux (Staszewski *et al.* 2007; Jacquin *et al.* 2012). Mais cet effet inhibiteur n'aurait pas de répercussion positive sur la croissance des poussins comme prédict par la théorie des trade-offs.

En effet, contrairement à nos prédictions, nous avons trouvé que les anticorps maternels entraînaient des répercussions négatives sur la croissance (Annexe II). Nos résultats suggèrent plutôt que la réception d'anticorps maternels entraînerait certains coûts pour les poussins en termes de croissance et ne permettrait pas d'économiser l'énergie d'une réponse immunitaire coûteuse. Ceci est cohérent avec une étude précédente sur les pigeons dans laquelle nous avons trouvé, sur un échantillon de taille plus petite, que l'anticorps maternel postnatal pourrait nuire à la croissance (Jacquin *et al.* 2012).

3- Transfert de l'immunité sur plusieurs générations

L'évolution d'un mécanisme de transfert multi-transgénérationnel d'immunité est très peu étudiée dans des populations naturelles (en particulier dans le cas du transfert d'anticorps). Les anticorps constituent un support de l'information phénotypique qui peut être transmis à travers les générations, c'est-à-dire que les modifications héritables de l'expression des gènes ne sont pas dues à des variations génétiques (Richards, 2006). Cette résistance aux parasites est héritée de manière non-génétique et a ensuite été transmise sur plusieurs générations, ce phénotype serait donc peut-être la résultante d'un phénomène épigénétique dans le cadre d'une interaction écologique (interaction hôte-parasite) et on pourrait donc avancer l'existence d'un phénomène microévolutif par le biais de l'hérabilité inclusive (Danchin & Wagner, 2010).

L'annexe III amène des résultats originaux dans ce contexte. Bien que nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence que la concentration en anticorps anti-KLH dans le jaune d'oeuf est affectée par les traitements immunitaires des grand-mères, nous trouvons des résultats intéressants de l'impact de l'exposition des grands-mères maternelles sur les petits-enfants. En effet, les poussins issus de grands-mères biologiques ayant reçu une injection en KLH ont une concentration en anticorps anti-KLH supérieure aux poussins descendant de grand-mères ayant reçu une injection en PBS. Notre étude mettrait donc en évidence l'existence d'effets grand-parentaux sur l'immunité qui peut avoir d'importantes implications en écologie et en évolution des traits d'histoire de vie et des interactions hôtes-parasites.

PERSPECTIVES

L'hérabilité génétique entre une grand-mère et ses descendants ne fait pas de doute. Cependant d'autres mécanismes d'hérabilité comme une transmission épigénétique existent et sont encore assez mal connus. Des études supplémentaires seront nécessaires pour montrer l'existence d'une transmission épigénétique des anticorps anti-parasitaires d'une femelle (génération G0) jusqu'à la génération G2 ou à la génération G3. Cependant ce mécanisme d'hérabilité est encore récent et demande à être approfondi. Il serait intéressant d'apporter plus d'informations sur l'effet de transfert d'anticorps maternels à long terme en interaction avec un autre effet maternel sur la maturité du système immunitaire chez les descendants. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'intérêt du transfert d'anticorps maternels à long terme sur la protection et la qualité des petits poussins.

D'un point de vue immunologique, certaines hormones telles que la testostérone ou les corticostérones peuvent inhiber la réponse immunitaire (Muller, 2004; Rubolini *et al.* 2005). Du coup, il serait aussi intéressant de mettre en évidence le rôle de différents effets maternels de la mère et/ou grand-mère qui peuvent, en interaction, s'annuler l'un l'autre (testostérone ou les corticostérones / anticorps), ou se renforcer. Une étude supplémentaire sur l'effet des grand-mères est nécessaire pour mettre en évidence un réel effet bénéfique sur la reproduction, la survie de la progéniture, son taux de croissance ou le sex-ratio. Récemment, les travaux de Graham *et al.* (2010) ont montré que le système immunitaire est un facteur très important pour la survie en populations naturelles pour les juvéniles qui sont souvent exposés aux parasites. Cette hypothèse postule que les mères ayant une concentration plasmatique plus forte en ANA (acides anti-nucléique) produisent moins de jeunes mais alloueraient préférentiellement leur énergie pour mieux survivre (Graham *et al.* 2010). Des études

supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre l'impact des effets maternels sur la valeur sélective des jeunes et sur l'évolution des effets parentaux.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- Albrecht, P. Ennis, F.A., Saltzman, E.J., et al. 1977. Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: mechanism of measles vaccine failure. *J Pediatr*; 91:715-718.
- Al-Natour, M.Q., Ward, L.A., Saif, Y.M., Stewart-Brown, B. and Keck, L.D. 2004. Effect of different levels of maternally-derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 48: 177–182.
- Anderson, R. W. 1995. On the maternal transmission of immunity: a ‘molecular attention’ hypothesis. *Bio Systems*, 34: 87–105.
- Apanius,V. 1998. Ontogeny of immune function. In *Avian growth and development: Evolution within the altricial-precocial spectrum* (eds. Starck, J.M., Ricklefs, R.E.). pp: 203-222.Oxford. Oxford University Press.
- Babiuk, L.A. & Gomis, S & Hecker, R. 2003. "Molecular approaches to disease control".*Poult.Sci*, vol. 82, p.870-87.
- Badyaev, A.V., Hamstra, T.L., Oh, K. P. & Acevedo Seaman, D.A. 2006. Sex-biased maternal effects reduce ectoparasite-induced mortality in passerine bird. *PNAS*, 103: 14406-14411
- Bernardo, J. 1991. Manipulating egg size to study maternal effects on offspring traits. *TREE*, 6:1-2.
- Bernardo, J. 1996. Maternal effects in animal ecology. *Amer. Zool*, 36: 83-105.
- Bird, A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396-398.
- Blanco, G., Martínez-Padilla, J., Serrano, D., Davilla, J. A. & Viñuela, J. 2003. Mass provisioning to different-sex eggs within the laying sequence: consequences for adjustment of reproductive effort in a sexually dimorphic bird. *J. Anim. Ecol*, 72: 831-838.
- Blount, J. D., Surai, P. F., Nager, R. G., Houston, D. C., Møller, A. P., Trewby, M. L. et Kennedy, M. W. 2002. Carotenoids and egg quality in the lesser black-backed gull *larus fuscus*: A supplemental feeding study of maternal effects. *Proc R Soc Lond B, Biol Sci*, 269: 29-36.

- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Fairve, B. and Sorci, G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. Am. Natur, 161, 367–379
- Boost, M. & Robert, K.E. 2012. Maternal effects in disease resistance: poor maternal environment increases offspring resistance to insect to an insect virus. P Roy Soc B Biol Sci, 279: 4009-4014.
- Bosendorf, O., Richards, C. L. and Pigliucci, M. 2008. Epigenetics for ecologists. Ecol. Lett, 11: 106-115.
- Boulinier T & Staszewski V 2008. Maternal transfer of antibodies: raising immunology issues. Trends Ecol Evol, 23: 282-288.
- Brambell, F.W.R. 1970. The Transmission of Immunity in Birds. Vol. 18. Elsevier, New York.
- Brierley, J. and Hemmings, W.A. 1956. The selective transport of antibodies from yolk to the circulation of the chicken. J. Embryol. Exp. Morphol, 4: 34–41.
- Buechler, K., Fitze, P.S., Gottstein, B., Jacot, A. & Richner, H. 2002. Parasite-induced maternal response in a natural bird population. J Anim Ecol, 71: 247-252.
- Burley, N. 1977. Parental investment, mate choice and mate quality. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 3476-3479
- Carlier, Y. & Truyens, C. 1995 Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. Parasitol Today, 11: 94–99.
- Chang G, J.J., Davis, B.S., Stringfield, C. & Lutz, C. 2007. Prospective immunization of the endangered California condors (*Gymnogyps californianus*) protect this species from lethal West Nile virus infection. Vaccine, 25: 2325-2330.
- Christians J.K. 2002. Avian egg size: variation within species and inflexibility within individuals. Biological Reviews, 77: 1-26.
- Cichón, M., Sendecka, J. and Gustafsson, L. 2003. Age-related decline in humoral immune function in collared flycatchers. J Evol Biol, 16: 1205–1210.
- Cook, M.E. 1991. Nutrition and the immune response of the domestic fowl. Crit. Rev. Poult. Biol, 3:167–189.

- Costantini D. 2010. Complex trade-offs in the pigeon (*Columba livia*): egg antioxidant capacity and female serum oxidative status in relation to diet quality. *Journal of Comparative Physiology B*, 180: 731–739.
- Curley, J.P., Mashoodh, R., Champagne, F.A. 2011. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm. Behav.*, 59: 306–314.
- Danchin, É., et Wagner, R. H. 2010. « Inclusive Heritability: Combining Genetic And Nongenetic Information To Study Animal Culture ». *Oikos*, 119: 210-218.
- Davies, W.L. 1939. The composition of the crop milk of pigeons. *Biochem. J.*, 33: 898-901.
- Davison, F., Magro, K.E., Kaspers, B. 2008. Structure and evolution of avian immunoglobulines. In: Davison, F., Kaspers, B. & Schat, K.A. (eds). *Avian immunology* Academic press, London, PP: 107-128.
- Dawson, R.D., Bidwell, M.T. 2005. Dietary calcium limits size and growth of nestling tree swallows *Tachycineta bicolor* in a non-acidified landscape. *Journal of Avian Biology*, 36: 127–134.
- Dijkstra, C., S. Daan, and J. B. Bakker. 1990. Adaptive seasonal variation in the sex ratio of kestrel broods. *Functional Ecology*, 4: 143-147.
- Dobson, F. S., and M. K. Oli. 2001. Demographic basis of population regulation in Columbian ground squirrels. *American Naturalist*, 158: 236-247.
- Dohms, J.E., Saif, Y.M. and Bacon, W.L. 1978b. Metabolism and passive transfer of immunoglobulins in the turkey hen. *Am. J. Vet. Res.*, 39: 1472–1481.
- Dorzhiev, Ts. Z. 1991. *Ekologiya simpatricheskikh populyatsii golubei*. Nauka, Moscow.
- Dubiec, A., Cichoń, M. & Deptuch, K. 2006. Sex-specific development of cell-mediated immunity under experimentally altered rearing conditions in blue tit nestlings. *Proc. R. Soc. B* 273: 1759-1764
- Ehrlich, P. 1892. Ueber immunität durch Vererbung und Säugung. *Med Microbiol Immunol*, 12: 183-203.
- Eising, C. M., Eikenaar, C., Schwabl, H. et Groothuis, T. G. G. 2001. Maternal androgens in blackheaded gull (*Larus ridibundus*) eggs: Consequences for chick development. *Proc R Soc Lond B, Biol Sci*, 268, 839-846.

- Engberg, R.M., Kaspers, B., Schranner, I., Kösters, J. and Lösch, U. 1992. Quantitation of the immunoglobulin classes IgG and IgA in the young and adult pigeon (*Columba livia*). Avian Pathol, 21: 409–420.
- Eraud, C., Dorie, A., Jacquet, A. & Faivre, B. 2008. The crop milk: a new route for carotenoid-mediated effects. Journal of Avian Biology, 39: 247-251.
- Falconer, D. S. 1974. Introduction à la génétique quantitative, Masson et Cie Eds).
- Fearon, D.T.& Locksley, R.M. 1996. "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response". Science, vol. 272: 50-53.
- Frank, S.A. 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- French, S.S., Moore, M.C, Demas G E. 2009. Eeological immunology:the organism in context. Integrative and Comparative Biology, 49 (3): 246-253.
- Frésard, L., Morisson, M., Brun, J-M., Collin, A., Pain, B., Minvielle, F. and Pitel, F. 2013. Epigenetics and phenotypic variability: some interesting insights from birds. Gene Select. Evol, 45: 16.
- Garnier, R., Ramos, R., Staszewski, V., Militão, T., Lobato, E., Gonzalez-Solis, J., Boulinier T. 2012. Maternal antibody persistence: a neglected life history trait with implications from albatross conservation to comparative immunology. Proc R Soc B, 279: 2033-2041.
- Garnier, R., Boulinier, T. and Gandon, S. 2013. Evolution of the temporal persistence of immune protection. Biol Lett, 9: 20130017.
- Gasparini, J., McCoy, K.D., Haussy, C., Tveraa, T. & Boulinier, T. 2001. Induced maternal response to the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi sensu lato* in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*. Proc R Soc Lond B, 268: 647-650.
- Gasparini, J., McCoy, K.D., Tveraa, T. & Boulinier, T. 2002. Related concentrations of specific immunoglobulins against the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi sensu lato* in eggs, young and adults of the kittiwake (*Rissa tridactyla*). Ecol Lett, 5: 519-524.
- Gasparini, J. 2004. Rôle des effets maternels dans l'écologie des interaction hôte-parasite : Etud de la mise en palce des défenses immunitaires chez un oiseaux de mer

colonial, la mouette tridactyle, *Rissa tridactyla*.thèse de doctoral.Univerité Pierre et Marie curie.

- Gasparini, J., McKoy, K.D., Staszewski, V., Haussy, C., Boulinier T. 2006. Dynamics of anti-Borrelia antibodies in Black legged Kittiwake chicks suggest maternal educational effect. Canadian Journal of Zoology, 84: 623-627.
- Gasparini, J., Boulinier, T., Gill, V.A., Gil, D., Hatch, S.A. & Roulin, A. 2007. Food availability affects the maternal transfer of androgens and antibodies into eggs of a colonial seabird. J. Evol. Biol, 20: 874-880.
- Gasparini, J., Piault, R., Bize, P. & Roulin, A. 2009. Pre-hatching maternal effects inhibit nestling humoral immune response in the tawny owl. J. Avian. Biol. 40:, 271-278.
- Gibbs, S.E.J., Hoffman, D.M., Stark, L.M., Marlenee, N.L., Blitvich, B.J., Beaty, B.J., Stallknecht, D.E. 2005. Persistence of antibodies to West Nile Virus in naturally infected Rock pigeons (*Columba livia*). Clin Diagn Lab Immunol, 12: 665-667.
- Glodsbys, R.A., Kindt, T. J., Osborn, B.A. 2000. Kuby immunology, 4th ed. New York: W. H. Freeman.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Beedle, A. S. 2007. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. BioEssays, 29: 145–154.
- Glutz von Blotzheim, U.N. and K.M. Bauer. 1980. Handbuch der Vogel Mitteleuropas vol.9. Akademische. Verlag, Wiesbaden.
- Gmelin, J. F. 1789 Pigeon biset sauvage *Columba livia*
- Goerlich, V.C., Nätt, D., Elfwing, M., Macdonald, B., Jensen, P. 2012. Transgenerational effects of early experience on behavioral, hormonal and gene expression responses to acute stress in the precocial chicken. Horm Behav, 61:711–718.
- Goudswaard, J., Van Der Donk, J.A., Van Der Gang, I. and Noordzij, A. 1979. Peculiar IgA transfer in the pigeon from mother to squab. Dev. Comp. Immunol, 3: 307–319.
- Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Shaw, M.L. & Craig, L.E. 1994. Maternal antibodies against Plasmodium spp. in African black footed penguin (*Sphenicus demersus*) chicks. J. Wildl Dis, 30: 365-371.
- Graham A.L., Hayward A.D., Watt K.A., Pilkington J.G., Pemberton J.M. & Nussey D.H. 2010. Fitness correlates of heritable variation in antibody responsiveness in a wild mammal. Science, 330: 662-665.

- Grindstaff, J.L., Brodie, III, E.D. et Ketterson, E.D. 2003. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transfer. *Proceedings the Royal Society B*, 270: 2309-2319.
- Grindstaff, J.L., Demas, G.E & Ketterson, E.D. 2005. Dietary protein restriction affects egg size and number but does not reduce maternal antibody transfer in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J Anim Ecol*, 74: 1051-1058.
- Grindstaff, J.L., Hasselquist, D., Nilsson, J-A., Sandell, M., Smith, H.G. & Stjernman, M. 2006. Transgenerational priming of immunity: maternal exposure to a bacterial antigen enhances offspring humoral immunity. *Proceedings of the Royal Society B*, 273: 2551-2557.
- Grindstaff, J.L. 2008. Maternal antibodies reduce costs of an immune response during development. *J Exp Biol*, 211: 654-660.
- Grindstaff J.L. 2010. Initial levels of maternally derived antibodies predict persistence time in offspring circulation. *J Ornithol*, 151: 423-428.
- Gustafsson E., Mattsson A., Holmdahl R. & Mattsson R. 1994. Pregnancy in B-cell deficient mice - postpartum transfer of immunoglobulins prevents neonatal runting and death. *Biol Reprod*, 51: 1173-1180.
- Haag, D. 1995: « Regulation of the street pigeon in Basel ». *Wildlife Society Bulletin*, Vol.23 (2) :256-260
- Halliday, R. 1955. Prenatal and postnatal transmission of passive immunity to young rats. *Proc R Soc Lond B*, 144: 427-430.
- Hamal, K.R., Burgess S.C., Pevzner, I.Y. & Erf, G.F. 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult Sci*, 85: 1364-1372.
- Hanssen, S. A., Hasselquist, D., Folstad, I. & Erikstad, K. E. 2004. Cost of immunity:immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proc. R. Soc. B*, 271: 925–930.
- Haq, A., Bailey, C.A. & Chinnah, A. 1996. Effect of β-carotene, canthaxanthin, lutein and vitamin E on neonatal immunity of chicks when supplemented in broiler diets. *Poult. Sci*, 75: 1092–109.
- Hasselquist, D. & Nilsson, J.A. 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: transgenerational effects on offspring immunity. *Phil Trans R Soc B*, 364: 51-60.
- Haussmann, M.F., Winkler, D.W., Huntington, C.E., Vleck, D., Sanneman, C.E., Hanley, D.

- and Vleck, C.M. 2005. Cell-mediated immunosenescence in birds. *Oecologia*, 145: 270–275.
- Hawkins P, Morton, D.B, Cameron, D, Cuthill, I, Francis, R. et al. 2001. Laboratory birds, refinements in husbandry and procedures. *Lab Anim* 35:109-115.
- Heeb, P., Werner, I., Kölliker, M., Richner, H. 1998. Benefits of induced host responses against an ectoparasite. *Proceedings of the Royal Society B*, 265: 51-56.
- Henken. A. M., Brandsma, H.A. 1982. The effect of environmental temperature on immune response and metabolism of the young chicken. 2. Effect of the immune response to sheep red blood cells on energy metabolism. *Poult. Sci.* 61:1667–1673.
- Henken, A.M., Kleinhout, G.R., van der Hel, W. 1982. "The effect of environmental temperature on immune response and metabolism of the young chicken. 1. Effect of intramuscular injection on heat production". *Poult. Sci*, vol. 61:.503-509.
- Henken, A.M.& Nieuwland, M.G.B.& Wensink, G. 1983. "The effect of environmental temperature on immune response and metabolism of the young chickens. 5. Effect of low environmental temperature on the humoral immune response to sheep red blood cells in relation to energy metabolism", *Poult. Sci.*, vol. 62, p.1069-1074.
- Ho, D.H., Burggren, W.W. 2010. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *J Exp Biol*, 213: 3–16.
- Hofer, H., East, M.L.1993. The commuting system of Serengeti spotted hyenas: how a predator copes with migratory prey. III. Attendance and maternal care. *Anim Behav* 46: 575–589.
- Horseman, N.D., Buntin, J.D. 1995. Regulation of crop milk secretion and parental behaviors by prolactin. *Annu. Rev. Nutr*, 15: 213-38.
- Ismail, A., Jacquin L, Haussy C, Legoupi J, Perret S & Gasparini J. 2013. Food availability and maternal immunization affect transfer and persistence of maternal antibodies in nestling pigeons. *PLOS One* 8: e79942
- Jablonka, E., Raz, G. 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol*, 84:131–176.

- Jacquin, L., Blottière, L., Haussy, C., Perret, S. & Gasparini, J. 2012. Prenatal and postnatal parental effects on immunity and growth in ‘lactating’ pigeons. *Functional Ecology*, 26: 866 –875.
- Janzen, F. J., Wilson, M. E., Tucker, J. K. and Ford, S. P. 2002. Experimental manipulation of steroid concentrations in circulation and in egg yolks of turtles. *J. Exp. Biol.*, 293: 58-66.
- Johnson SE. 2003. Life history and the competitive environment: trajectories of growth, maturation, and reproductive output among chacma baboons. *Am J Phys Anthropol*, 120: 83–98.
- Johnston R. F., Janiga M. 1995. *Feral pigeons*. Oxford University Press, Oxford.
- Kaati, G., Bygren, L. O., Pembrey, M. & Sjostrom, M. 2007. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. *European journal of human genetics : EJHG*, 15: 784-790.
- Kariyawasam, S., Wilkie, B.N., Gyles, C.L. 2004. Construction, characterization, and evaluation of the vaccine potential of three genetically defined mutants of avian pathogenic Escherichia coli. *Avian Dis*, 48:287-99.
- Kautz, J. 1985. Effects of harvest on feral pigeon survival, nest success and population size. Ph.D. dissertation, Cornell University Ithaca.NY.
- Kelly, M.A. 1979. The pigeon of Elsinore Tower. *The explorer*. 1: 5-11.
- Kilpimaa, J., Alatalo, R. V. & Siitari, H. 2007. Pre-hatching maternal investment and offspring immunity in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *J. Evol. Biol.*, 20:717-24.
- King, M.O., Owen, J.P. & Schwabl, H.G. 2010. Are maternal antibodies really that important? Patterns in the immunologic development of altricial passerine House sparrows (*Passer domesticus*). *Plos One*, 5. (3):e9639.
- Klasing, K.C, Calvert, C.C. 1999. The care and feeding of an immune system: an analysis of lysine needs. In: Lobley, G.E, White MacRae, A. editor. *Protein Metabolism and Nutrition*. Wageningen Press; pp. 253–264.

- Klasing, K. C. & Leshchinsky, T. V. 1999. Functions, costs, and benefits of the immune system during development and growth. In Proc. 22 Int. Ornithological Cong. (eds N. J. Adams & R. H. Slotow), pp. 2817–2835. Durban, South Africa: BirdLife South Africa.
- Klemperer, F. 1893. Über naturliche immunität and iher verwerthung fur die immunisierungstherapie. Arch. Exp. Path. Pharmak., 31: 356-382.
- Korpimäki, E., May, C. A., Parkin, D. T., Wetton, J. H. & Wiehn J. 2000. Environmental- and parental condition-related variation in sex ratio of kestrel broods. Journal of Avian Biology 7: 128-134.
- Kowalczyk, K., Daiss, J., Helpern, I. and Roth, T.F. 1985. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. Immunology, 54: 755–762.
- Kramer, T.T. and Cho, H.C. 1970. Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg. Immunology, 19: 157–167.
- Lacey, E. P. 1998. What is an adaptative environmentally induced parental effect? In Maternal effects as adaptations, T. A. Mousseau, and C. W. Fox, eds.
- Lawrence, E. C., Arnaud-Battandier, F., Grayson, J., Koski, I. R., Dooley, N. J., Muchmore, A. V. & Blaese, R. M. 1981. Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spn, lungs and intestine.Clin. Exp. Immunol. 43, 450–457.
- Lee, K.A. 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. Integrative and Comparative Biology, 6: 1000-1015.
- Lemke, H. & Lange, H. 1999. Is there a maternally induced immunological imprinting phase a la Konrad Lorenz? Scand. J. Immunol. 50, 348–354.
- Lemke, H., Hansen, H. & Lange, H. 2003 Non-genetic inheritable potential of maternal antibodies. Vaccine 21, 3428–3431.
- Lemke, H., Coutinho, A. & Lange, H. 2004. Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes. Trends Immunol, 25: 180–186.
- Levi, W.M. 1969. The Pigeon. Levi Publishing, Sumter, SC.
- Lindqvist, C., Janczak, A.M., Nätt, D., Baranowska, I., Lindqvist, N., Wichman, A., Lundeberg, J., Lindberg, J., Torjesen, P.A., Jensen, P. 2007. Transmission of stressinduced learning impairment and associated brain gene expression from parents to offspring in chickens. PLoS One. 2:e364.

- Liu, S.S. and Higgins, D.A. 1990. Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*). Comp. Biochem. Physiol, 97B: 637–644.
- Lochmiller, R.L. & Deerenberg, C. 2000. Trade-offs in evolutionary ecology: just what is the cost of immunity? Oikos, 88: 87-89.
- Loeken, M.R. and Roth, T.F. 1983. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. Immunology, 49: 21–28.
- Lozano, G.A. and Lank, D.B. 2003. Seasonal tradeoffs in cell-mediated immunosenescence in ruffs (*Philomachus pugnax*). Proc. Roy. Soc. Lond. B, 270: 1203–1208.
- Lundin, B. S., Dahlman-Höglund, A., Pettersson, I., Dahlgren, U. I. H., Hansson, L. A & Telemo, E. 1999. Antibodies given orally in the neonatal period can affect the immune response for two generations: evidence for active maternal influence on the newborn's immune system. Scand. J. Immunol. 50, 651–656.
- Martin, L.B., Hasselquist, D., Wikelski, M. 2006. Investment in immune defense is linked to pace of life in house sparrows. Oecologia, 147: 565-575.
- Mast, J., Goddeeris, B. 1999. Development of immunocompetence of broiler chickens. Veterinary Immunol Immunopathol, 70: 245-256.
- McAdam AG, Millar JS 1999. Dietary protein constraint on age at maturity: an experimental test with wild deer mice. J Anim Ecol, 68:733–740.
- McNabb, F. M. 1988. Peripheral thyroid hormone dynamics in precocial and altricial avian development. Am. Zool, 28: 427-440.
- Meagan, J. G., Dragana, S., Honglei, C., John, A, D., Kevin, R, N., Robert, J, M., Tamsyn, M., C. 2012. Functional Similarities between Pigeon ‘Milk’ and Mammalian Milk: Induction of Immune Gene Expression and Modification of the Microbiota. PLoS ONE, 7(10): e48363.
- Michalek, S.M. Rahman, A.F. and McGhee, J.R. 1975. Rat immunoglobulins in serum and secretions: comparison of IgM, IgA and IgG in serum, colostrum, milk and saliva of protein malnourished and normal rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 148: 11114-1118.
- Mohammed, H.O., Yamamoto, R., Carpenter, T.E. & Ortmayer, H.B. 1986. Comparison of egg yolk and serum for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis., 30, 398–408.

Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., et al. 2006. "Cancer Regression in Patient After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes". *Science*, 314 (5796): 126-129.

Mousseau, T. A. & Fox, C. W. 1998. Maternal effects as adaptations. Oxford, UK: Oxford University Press.

Müller, W., Eising, C., Dijkstra, C. & Groothuis, T.G.G. 2002. Sex differences in yolk hormones depend on maternal social status in Leghorn chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 2249–2256.

Müller, W., Dijkstra, C., Groothuis, T.G.G., Siitari, H. & Alatalo, A.V. 2004b. Maternal antibody transmission and breeding densities in the black-headed gull (*Larus ridibundus*). *Funct. Ecol.* 18: 719–724.

Müller, W., Groothuis, T. G. G., Kasprzak, A., Dijkstra, C., Alatalo, R. V. et Siitari, H. 2005. Prenatal androgen exposure modulates cellular and humoral immune function of black-headed gull chicks. *Proc R Soc Lond B, Biol Sci*, 272, 1971-1977.

Nager, R.G. 2006. The challenges of making eggs. *ARDEA*, 94(3): 323-346.

Nemeth, N.M. & Bowen, R.A. 2007. Dynamics of passive immunity to West Nile Virus in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Am J Trop Med Hyg*, 76: 310-317.

Nemeth N.M., Oesterle P.T., Bowen R.A. 2008 Passive Immunity to West Nile Virus provides limited protection in a common passerine species. *Am J Trop Med Hyg* 79: 283-290.

Newbrey, L.J. & Reed, W.L. 2009. Growth of yellow-headed blackbird *Xanthocephalus xanthocephalus* nestlings in relation to maternal body condition, egg mass, and yolk carotenoids concentrations. *Journal of Avian Biology*, 40: 419-429.

Nicoara, C, Zäch K, Trachsel D, Germann D, and Matter L. 1999. Decay of Passively Acquired Maternal Antibodies against Measles, Mumps, and Rubella Viruses. *Clin. Diag. Lab. Immunol*, 6: 868-871.

Norris, K., Evans, R. 1999. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology*, 11: 19-26.

- Okamoto, Y., Tsutsumi, H., Kumar, N.S., Ogra, P.L. 1989. Effect of breast feeding on the development of anti-idiotype antibody response to F glycoprotein of respiratory syncytial virus in infant mice after post-partum maternal immunization. *J.immunol*, 142: 2507-2512.
- Parmentier, H.K., Lammers, A., Hoekman, J.J., De Vries Reilingh, G., Zaanen, I.T. and Savelkoul, H.F. 2004. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. *Dev. Comp. Immunol*, 28: 39–49.
- Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O. and Dixon, F.J. 1962a. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol*, 89: 272–278.
- Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O. and Dixon, F.J. 1962b. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. *J. Gen. Physiol*, 45: 501–513.
- Pembrey, M.E: Male-line transgenerational responses in humans. 2010. *Hum Fertil*, 13:268 271.
- Pigliucci, M. 2007. Do we need an extended evolutionary synthesis? *Evolution*, 61: 2743-2749.
- Pihlaja, M., Siitari, H. & Alatalo, R.V. 2006. Maternal antibodies in a wild altricial bird effects on offspring immunity growth and survival. *J Anim Ecol*, 75: 1154-1164.
- Pikula, J., M. Beklova and V. Kubik. 1982. The nidobiology of *feral Columba livia* f. *domestica* I. *Acta Sci. Nat Brno* 16: 1- 44.
- Poisbleau, M., Demongin, L., Trouve, C. and Quillfeldt, P. 2009. Maternal deposition of yolk corticosterone in clutches of southern rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome chrysocome*). *Horm. Behav*, 55: 500-506.
- Poulin, R. & Thomas, F. 2008. Epigenetic effects of infection on the phenotype of host offspring: parasites reaching across host generations. *Oikos*, 117: 331-335.
- Pravieux JJ, Poulet H, Charreyre C, Juillard V. 2007. Protection of newborn animals through maternal immunization. *J Comp Pathol*, 137. 1:S32- 4.
- Raberg, L., Vestberg, M., Hasselquist, D., Holmdahl, R., Svensson, E. & Nilsson, J.-A. 2002. Basal metabolic rate and the evolution of the adaptive immune system. *Proc. R. Soc. B*, 269: 817–821.
- Ravazzi, G. 2002 : « Le pigeon voyageur ». Ed° de Vecchi.

- Reid, J. M., Arcese, P., Keller, L. F. & Hasselquist, D. 2006 Long-term maternal effect on offspring immune response in song sparrows *Melospiza melodia*. *Biol. Lett.*, 2: 573–576.
- Reik, W., and Walter, J. 2001. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nature Genetics*, 2: 21-32.
- Richards, E.J. 2006. Inherited epigenetic variation revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7: 395–401.
- Ricklefs, R.E. 1968 Patterns of growth in birds. *Ibis*, 110: 419–451.
- Ricklefs, R.E., Wikelski, M. 2002. The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology and Evolution*. 17: 462-468.
- Riddel, G. 1971. The breeding season in a rural colony of feral pigeons. *Scot. Birds*, 6: 321–329.
- Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. K. 1998. *Immunology*, 5th edn. London, UK: Mosby.
- Roff, D.A., 1992. *The Evolution of Life Histories: Theory and Analysis*. Chapman and Hall, New- York, USA.
- Rose, M.A., Orlans, E. and Buttress, M. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg:their separation in yolk and white. *Eur. J. Immunol*, 4: 521–523.
- Rose, M. E. & Orlans, E. 1981. Immunoglobulins in the egg, embryo, and young chick. *Dev. Comp. Immunol*, 5:15–20.
- Roulin, A. & Heeb, P. 1999. The immunological function of allosuckling. *Ecol Lett*, 2, 319–324.
- Royle, N. J., Surai, P. F. & Hartley, I. R. 2003. The effect of variation in dietary intake on maternal deposition of anti oxidants in zebra finch eggs. *Funct. Ecol.* 17: 472-481.
- Rubolini, D., Romano, M., Martinelli, R. et Saino, N. 2005. Effects of elevated testosterone levels on survival, growth and immunity of male and females yellow legged gull chicks. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 344-352.
- Sadd, B.M. & Schmid-Hempel, P. 2007. Facultative but persistent trans-generational immunity via the mother's egg in bumblebees. *Curr Biol*, 17: R1046-R1047.

- Saino, N., Dall'ara, P., Martinelli, R. and Møller, A.P. 2002b. Early maternal effects and antibacterial immune factors in the eggs, nestlings and adults of the barn swallow. *J. Evol. Biol.*, 15: 735-743.
- Saino, N. 2010. Food supplementation affects egg albumen content and body size asymmetry among yellow-legged gull siblings. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64: 1813–1821.
- Schmidt-Hempel, P., Ebert, D. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 27-32.
- Sheldon, B.C. & Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defense and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol*, 11: 317-321.
- Smith, N.C., Wallach, M., Miller, C.M., Braun, R. and Eckert, J. 1994. Maternal transmission of immunity to *Eimeria maxima*: western blot analysis of protective antibodies induced by infection. *Infect. Immun*, 62: 4811–4817.
- Soler, J.J., de Neve, L., Perez-Contreras, T., Soler, M., Sorci, G. 2003. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proc R Soc Lond B*, 270: 241-248.
- Staszewski, V., Gasparini, J., McCoy, K.D., Tveraa, T. & Boulinier, T. 2007. Evidence of an interannual effect of maternal immunization on the immune response of juveniles in a long-lived colonial bird. *Journal of Animal Ecology*, 76: 1215–1223.
- Staszewski, V. & Siitari, H. 2010. Antibody injection in the egg yolk: maternal antibodies affect humoral immune response of the offspring. *Functional. Ecology*, 24: 1333-1341.
- Stearns, R.C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Szyf, M. 2009. The early life environment and epigenome. *Bioch. Biophys. Acta*, 1790: 878-885.
- Takemori, T., Rajewsky, K. 1984. Specificity, duration and mechanism of idiotype suppression induced by neonatal injection of monoclonal anti-idiotope antibodies into mice *Eur J. Immunol*, 14: 656-667.

Thornton, B.P., Vetvicka, V. and Ross, G.D. 1994. Natural antibody and complement mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *J. Immunol.* 152: 1727–1737.

Tschirren, B., Saladin, V., Fitze, P. S., Schwabl, H. & Richner, H. 2005. Maternal yolk testosterone does not modulate parasite susceptibility or immune function in great tit nestlings (*Parus major*). *J. Anim. Ecol.* 74: 675-682.

Verboven N., Monaghan P., Evans, D.M., Schwabl H., Evans N., Whitelaw C. et Nager R.G. 2003. Maternal condition, yolk androgens and offspring performance: a supplemental feeding experiment in the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). The Royal Society, 270: 2223-2232.

Wade, M.J. The evolutionary genetics of maternal effects. 1998. In: Mousseau, T., Fox, C., editors. *Maternal effects as adaptations*. Oxford University Press; Oxford, UK: pp. 5 2.

Wallach, M., A. Halabi, G. Pillemer, O. Sar-Shalom, D. Mencher, M. Gilad, U. Bendheim, H. D. Danforth, and P.C. Augustine. 1992. Maternal immunization with gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against *Eimeria maxima* in chickens. *Infect. Immun.*, 60: 2036-2039.

West A.P., Herr A.B. & Bjorkman P.J. 2004. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. *Immunity*, 20, 601-610.

Wolf, J.B. & Wade, M.J. 2009. What are maternal effects (and what are they not)? *Phil Trans R Soc B*, 364, 1107-1115.

Yamamoto, H. 1975. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Jpn. J. Vet. Res.*, 23. 117.

Yasuda, M., Furusawa, S., Matsuda, H., Taura, Y., Urano, T., Yokomizo, Y. & Ekino, S. 1998. Development of maternal IgG-free chick obtained from surgically bursectomized hen. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 21: 191–200.

ARTICLES

ANNEXE 1

Food availability and maternal immunization affect transfer and persistence of maternal antibodies in nestling pigeons

Publié dans PLOS ONE

November 05, 2013 Volume: 8, Issue: 11 DOI: 10.1371/journal.pone.0079942

Ismail A.¹, Jacquin L.^{1,2}, Haussy C.¹, Legoupi J.¹, Perret S.³, & Gasparini J.¹

¹ Université Pierre et Marie Curie CNRS ENS, Laboratoire Ecologie & Evolution UMR 7625, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France

² McGill University, Department of Biology & Redpath Museum, 859 Sherbrooke Street West Montréal, Québec, Canada

³ Centre d'Ecologie Expérimentale et Prédictive CEREEP-Ecotron Ile-De-France CNRS ENS, UMS 3194, Ecole Normale Supérieure, St-Pierre-lès-Nemours, France

Food Availability and Maternal Immunization Affect Transfer and Persistence of Maternal Antibodies in Nestling Pigeons

Ahmad Ismail¹, Lisa Jacquin^{1,2}, Claudy Haussy¹, Julie Legoupi¹, Samuel Perret³, Julien Gasparini^{1*}

1 Laboratoire Ecologie et Evolution UMR 7625, Université Pierre et Marie Curie CNRS ENS, Paris, France, **2** Department of Biology and Redpath Museum, McGill University, Montréal, Québec, Canada, **3** Centre d'Ecologie Expérimentale et Prédictive CEREEP-Ecotron Ile-De-France CNRS ENS, UMS 3194, Ecole Normale Supérieure, St-Pierre-lès-Nemours, France

Abstract

The ability of mothers to transfer antibodies (Abs) to their young and the temporal persistence of maternal Abs in offspring constitute important life-history traits that can impact the evolution of host-parasite interactions. Here, we examined the effects of food availability and parental immunization on the transfer and persistence of maternal antibodies in nestling pigeons (*Columba livia*). This species can transmit maternal Abs to offspring before hatching through the egg yolk and potentially after hatching through crop milk. However, the role of this postnatal substance in immunity remains elusive. We used a full cross-fostering design to disentangle the effects of food limitation and parental immunization both before and after hatching on the levels and persistence of maternal Abs in chicks. Parents were immunized via injection with keyhole limpet hemocyanin antigens. Using an immunoassay that specifically detected the IgY antibodies that are known to be transmitted via the yolk, we found that the levels of anti-KLH Abs in newly hatched chicks were positively correlated with the levels of anti-KLH Abs in the blood of their biological mothers. However, this correlation was not present between chicks and their foster parents, suggesting limited IgY transfer via crop milk to the chick's bloodstream. Interestingly, biological mothers subjected to food limitation during egg laying transferred significantly fewer specific maternal Abs, which suggests that the transfer of antibodies might be costly for them. In addition, the persistence of maternal Abs in a chick's bloodstream was not affected by food limitation or the foster parents' anti-KLH Ab levels; it was only affected by the initial level of maternal anti-KLH Abs that were present in newly hatched chicks. These results suggest that the maternal transfer of Abs could be costly but that their persistence in an offspring's bloodstream may not necessarily be affected by environmental conditions.

Citation: Ismail A, Jacquin L, Haussy C, Legoupi J, Perret S, et al. (2013) Food Availability and Maternal Immunization Affect Transfer and Persistence of Maternal Antibodies in Nestling Pigeons. PLoS ONE 8(11): e79942. doi:10.1371/journal.pone.0079942

Editor: Tapio Mappes, University of Jyväskylä, Finland

Received April 3, 2013; **Accepted** September 30, 2013; **Published** November 5, 2013

Copyright: © 2013 Ismail et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Ile-de-France Region (Sustainable Development Network R2DS, No. 2008-07, <http://www.r2ds-ile-de-france.com/>) and Damascus University (Syria). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: jgaspari@snv.jussieu.fr

Introduction

The immune systems of newly born offspring are not entirely mature and therefore cannot provide complete protection when pathogens are first encountered in the external environment [1]. The transfer of maternal antibodies (Abs) may thus have evolved as a way to reduce the negative impact of pathogens on immature juveniles [2]. This transgenerational source of immunological plasticity has received growing attention as it is a widespread phenomenon with broad implications [1,3,4]. In vertebrates, maternal Abs can be transferred to young either before birth via the egg yolk or the placenta and/or after birth via the colostrum and milk [1]. Maternal Abs have been shown

to affect juvenile immunity at different time scales [5,6] (but see 7,8), directly participate in a juvenile's immune response to antigens [9–11], impact fitness [3,4] (but see 7), and potentially influence the dynamics of host-parasite interactions [12]. The transfer of maternal Abs might thus be a crucial life-history trait that can shape the evolution of host-parasite interactions at different evolutionary time scales [5–7].

Individuals vary greatly in the amount of maternal Abs they transfer to their offspring, but the evolutionary forces shaping this variability are still poorly characterized [13]. In this study, we focused on two types of variation associated with this important life-history trait: 1) the initial amount of maternal Abs transferred prenatally, and 2) Ab persistence in the offspring's

bloodstream after hatching. Indeed, previous work suggests that females with similar levels of Abs in their bloodstreams may nonetheless differ in their ability to transfer those Abs [13]. Additionally, the temporal persistence of maternal Abs in the offspring's bloodstream has recently been shown to be highly variable among species, with a higher level of persistence being associated with a longer period of time during which protection may be conferred to nestlings [14]. Maternal Ab persistence, as well as the rate of initial transfer, might thus be under selective pressure. The temporal persistence of Abs in an offspring's bloodstream is known to be affected by the initial amount of maternal Abs it receives [15], which is itself directly linked to the Ab level in maternal blood [16]. Furthermore, because offspring have the ability to catabolize maternal Abs and thus affect their temporal persistence, environmental conditions that affect physiological processes are likely to play an important role in offspring immunity. As a consequence, the persistence of maternal antibodies might be shaped by selective forces acting on both parental and offspring phenotypes, while the ability of mothers to transfer Abs might be shaped by selective forces acting on adult females alone [3]. However, little is known about the factors affecting the ability to transfer maternal Abs, the temporal persistence of maternal Abs in juveniles, and the energetic costs for females and offspring.

Our study focused on two environmental factors that may affect maternal Ab transfer and persistence: variation in food availability and parental exposure to parasites. If transferring Abs is costly, mothers in poor nutritional condition may be less capable of transferring maternal Abs to their offspring. Similarly, Abs may persist for shorter time periods in juveniles in poor nutritional condition if Ab maintenance incurs costs. In contrast, if poor food availability means that future residual reproductive value is diminished, individuals in poorer condition may invest more heavily in current reproductive efforts and thus transfer larger amounts of maternal Abs that will persist longer. Support for this idea comes from a study in which kittiwake (*Rissa tridactyla*) mothers transferred higher levels of maternal Abs into their eggs when their food intake was experimentally reduced [17]. Likewise, in the Indian meal moth (*Plodia interpunctella*), mothers in poor nutritional condition increased the transfer of maternal resistance to juveniles [18]. In contrast, in the Japanese quail (*Coturnix japonica*), protein manipulation had no effect on the transfer of maternal Abs into eggs [19]. However, nothing is known about the effect of food availability on the persistence of maternal Abs in juveniles. We alternatively expect that increased food intake could increase the ability of young to catabolize maternal Abs and may thus decrease the persistence of maternal Abs. Also, young in better condition may show higher growth rates, which could dilute their maternal Ab levels and thus decrease their persistence.

In bird species that are able to transmit postnatal immune substances through crop milk, postnatal parental exposure to parasites may increase the level of parental Abs transferred via crop milk, which, in turn, could contribute to the persistence of parental Abs in the offspring's blood. Indeed, in many mammal species (such as rodents) postnatal Abs enter neonatal blood

circulation after being transported across the intestinal epithelium [20]. In humans, in contrast, colostrum and milk are mainly composed of immunoglobulins A (IgAs), which are believed to play a central role in protecting the gut against local infections but do not cross the intestinal epithelium to reach neonatal circulation [20]. It is therefore possible that parental Abs transferred after birth by those bird species able to produce crop milk may significantly increase the levels of maternal Abs circulating in juveniles and prolong Ab presence as juveniles age, a phenomenon that is known to occur in certain mammal species [21,22].

To test these hypotheses, we used a cross-fostering experiment to test the effect of food supplementation and parental immunization on Ab transfer and persistence in feral pigeons (*Columba livia*). These columbid birds feed their chicks crop milk [23], a lipid-rich substance produced in their crops that is known to contain nutritive and growth factors [24] as well as carotenoids [25] and immunoglobulins [26], and that may have a role in offspring immunity [6]. This bird model thus offers us a unique opportunity to investigate the relative effects of pre- and postnatal variation in food availability and parental immunization on initial Ab levels in offspring blood and the persistence of maternal Abs over time. We have previously shown that parental immunization before egg laying can affect the juvenile immune response after hatching and the total immunoglobulins present in crop milk in this species [6]. However, it is still unclear how environmental factors such as prenatal and postnatal food availability and parental immunization interact to shape Ab transfer amounts and Ab persistence in young.

Materials and Methods

Study populations

A total of 120 adult feral pigeons (60 females and 60 males) were captured with trap cages at three suburban locations near Paris in 2010 by the SACPA Company (France) with the agreement of local authorities (no specific permission was required). They were kept in 10 outdoor aviaries (2.20 m x 2.20 m) at the CEREEP field station (CEREEP-Ecotron Ile-de-France, UMS 3194, Ecole Normale Supérieure, St-Pierre-les-Nemours). Each aviary contained six males and six females. On the day of clutch completion, the two eggs of each clutch were cross-fostered with another nest with a similar laying date (± 1 day) to create experimental groups of chicks differing in the prenatal and postnatal parental immunization and food availability treatments experienced by biological and foster parents.

Food treatment

The food limitation treatment was initiated two weeks before the immunization treatment. Sixty pigeons (in five aviaries) were food limited ("food-limited group"): they were fed 30 g of wheat per day per individual, which corresponds to the basal food quantity used to maintain non-breeding pigeons [27]. When the chicks in this group hatched, no food was added during their first week of life. During their second week of life, 15 g per chick per day were added. From the third week

onwards, 30 g per chick per day were added. Sixty other pigeons (in five aviaries) were fed a mixture of corn, wheat, and peas *ad libitum* ("ad libitum food group"). All pigeons were provided with mineral grit and vitamin-supplemented water. Such food regimes have previously been shown to significantly affect reproduction and condition in adult feral pigeons [28].

Parental and chick immunization treatment

The immunization treatment started two weeks after the beginning of the food treatment. The antigen-injected group consisted of 60 birds (three breeding pairs chosen randomly in each aviary) that received a subcutaneous injection of a 100- μL solution containing 0.5 mg.mL⁻¹ keyhole limpet hemocyanin (KLH). KLH is a natural protein that birds do not encounter in their natural environment, and it is therefore used to stimulate an immune response to a novel antigen [8,29,30]. It is a copper-containing respiratory protein derived from the keyhole limpet (*Megathura crenulata*) [31]. It stimulates a strong Ab response but does not trigger a severe inflammatory or pyrogenic response as do many other immunogens [32]. The sham-injected group consisted of the 60 remaining birds that were injected with phosphate-buffered saline (PBS). A second injection was performed two weeks later to ensure that blood anti-KLH Ab levels differed between antigen- and sham-injected treatment groups. Then, we monitored the nests daily in order to record laying and hatching dates. Females were captured twice to collect blood samples, once at the time of egg laying (1.6 ± 0.5 days after egg laying) and once at the time of hatching (3.1 ± 0.5 days before hatching). Blood was taken from the brachial vein using a sterile syringe, and the sample was used to assess anti-KLH Ab levels in adult blood at the time of egg laying and hatching. As fathers also fed offspring with crop milk and were thus possibly transferring Abs, we collected blood samples from males to assess their anti-KLH Ab levels at the time of hatching. To examine the persistence of parental anti-KLH Abs in offspring, we collected blood samples from chicks as they aged at 3, 7, 14, and 21 days post-hatching. All blood samples were centrifuged, and the plasma was stored at -20°C until immunological assays could be conducted. It should be noted that clutches were laid 64.46 ± 2.23 days after the beginning of the food treatment and 50.46 ± 2.23 days after the beginning of the immunization treatment. These intervals did not differ significantly between food and immunization treatment groups (all P-values > 0.05).

Anti-KLH antibody assay

Anti-KLH IgY Ab levels in the plasma samples were assayed using the method described in [13]. High-binding plates (96 wells, flat bottom, Microlon® 600; cat. 655101, Greiner Bio-One, Germany) were coated overnight at 5°C with 100 μL of KLH (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6) and then washed five times with PBS (0.1 M, pH 7.4). Wells were blocked with 200 μL of a 3% milk powder-PBS solution (dried milk obtained from Régilait Bio) for two hours at room temperature with agitation. After five washings, 100 μL of plasma (dilution 1/500) diluted in a 0.5% milk powder-PBS solution were added to the wells. Plates were then incubated overnight at 4°C. After washing, 100 μL of rabbit-anti-pigeon

IgG conjugated to horseradish peroxidase (10 mg/ml in PBS, pH 7.2, Nordic Immunology, Netherlands) and diluted in a 0.5% milk powder-PBS solution (dilution 1/5000) were added to the wells; the plates were then incubated for two hours at room temperature. After washing, 100 μL of ortho-phenylenediamine (OPD) (Sigma-Aldrich, USA) were added to the wells. The reaction was stopped after 10 minutes by adding 50 μL of HCl (1 M). Plates were then read at 490 nm using a microplate reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK). A panel of samples from another experiment was used to estimate the repeatability [33] of sample Ab values between plates (N = 56, $F_{53,56} = 55.8$, P < 0.001, r = 0.96) as well as within plates (N = 31, $F_{26,31} = 21.3$, P < 0.001, r = 0.89); the results showed that this method reliably measures anti-KLH Ab levels. A mixture of several pigeon samples was serially diluted and added to all plates to standardize the relative Ab concentrations of all the samples. The relative concentration of anti-KLH Abs in the samples was log transformed and is referred to hereafter as the anti-KLH Ab level.

Ethics statements

This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (revised Appendix A). All experiments were approved by the "Direction Départementale des Services Vétérinaires de Seine-et-Marne" (authorization No. 77-05). This study does not involve endangered or protected species.

Statistical analyses

We obtained blood samples at four different ages for 58 chicks. These chicks came from the 31 biological nests and 29 foster nests for which anti-KLH Ab levels of biological and foster parents were available. To test whether the initial Ab level in newly hatched chicks was affected by food limitation, parental immunization, and parental Ab levels, we performed a generalized mixed model in which the Ab level of 3-day-old chicks was the response variable, the food treatment group of the biological parents was an explanatory variable, and the Ab levels of the biological mothers, foster mothers, and foster fathers were covariates. As sibling chicks are not statistically independent, we included the biological nest, nested within the food treatment group of the biological parents, as a random factor. To test whether the food treatment group and Ab levels of foster parents affected maternal Ab persistence in chicks, we performed a generalized mixed model in which chick anti-KLH Ab level across time was the response variable, the food treatment group of the foster parents and chick age (7, 14, and 21 days old) were explanatory variables, and the anti-KLH Ab levels of 3-day-old chicks (i.e. initial amount of anti-KLH Abs received from biological mothers) and the anti-KLH Ab levels of foster fathers and mothers were covariates. Foster nest, nested within the food treatment group of the foster parents, was included as a random factor. The best-fitting models were chosen using the AIC criterion. All statistical analyses were performed using SAS (version 9.2).

Table 1. Output of the best-fit generalized mixed model that explains anti-KLH Ab levels in 3-day-old chicks.

Effects	DF	F	P-values
Anti-KLH Ab level of the biological mother	1,19	2.29	0.15
(Anti-KLH Ab level of the biological mother) ²	1,19	19.10	0.0003
Food treatment experienced by the biological mother	1,30	5.40	0.03

The quadratic anti-KLH Ab level of the biological mother and the food treatment experienced by the biological mother were significant main effects in this model. All models involving interactions or the anti-KLH Ab levels of the foster parents had higher AICc values (>2) than the model presented here.

doi: 10.1371/journal.pone.0079942.t001

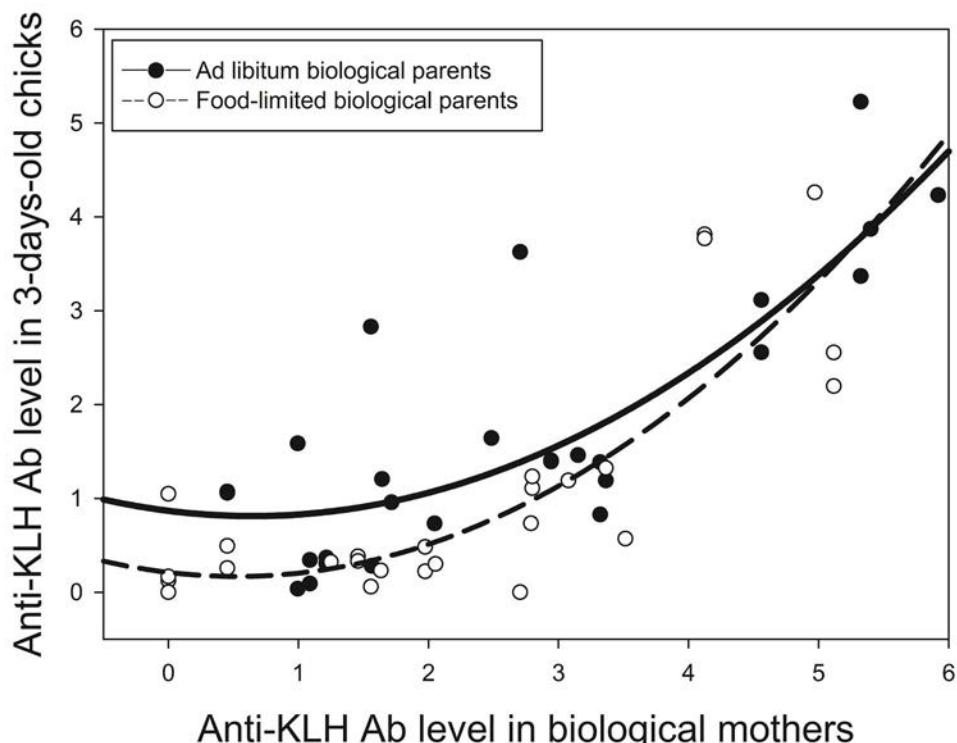


Figure 1. Positive quadratic relationships between anti-KLH Ab levels in 3-day-old chicks and their biological mothers. Dot color indicates food treatment (white = food-limited; black = *ad libitum*).

doi: 10.1371/journal.pone.0079942.g001

Results

KLH-injected adults had higher anti-KLH Ab levels than sham-injected adults at the time of egg laying in the case of biological mothers (*Student's t-test*, $t_{30} = 6.24$, $p < 0.0001$) and at the time of hatching in the case of foster parents (mothers and fathers pooled: $t_{57} = 3.08$, $p = 0.003$), which shows that antigen injection triggered a significant humoral immune response in parents. We found a positive, quadratic relationship between anti-KLH Ab levels in biological mothers and those in 3-day-old chicks (Table 1, Figure 1), which provides evidence that the amount of Abs transferred to offspring was a function of the amount circulating in the mother's blood at laying. In addition, for a given level of circulating maternal Abs, 3-day-old chicks from food-limited

biological mothers had lower Ab levels than chicks from *ad libitum* biological mothers (Table 1, Figure 1). There was no relationship between the Ab levels of foster mothers and fathers and the Ab levels of 3-day-old chicks (Table 1).

The persistence of maternal anti-KLH Abs was only affected by the initial level of maternal Abs found in 3-day-old chicks (Table 2, Figure 2). Chicks with higher anti-KLH Ab levels at 3 days of age (corresponding to those coming from immunized biological mothers; see Figure 1) showed a stronger decline in anti-KLH Ab levels over time but those levels were nonetheless higher at 7, 14, and 21 days of age than those in chicks coming from non-immunized biological mothers (Figure 2). Accordingly, in chicks coming from immunized biological mothers, there were significant positive correlations between chick anti-KLH Ab levels at 3 and 7 days ($N = 30$, $r = 0.95$, $p < 0.0001$), 3 and

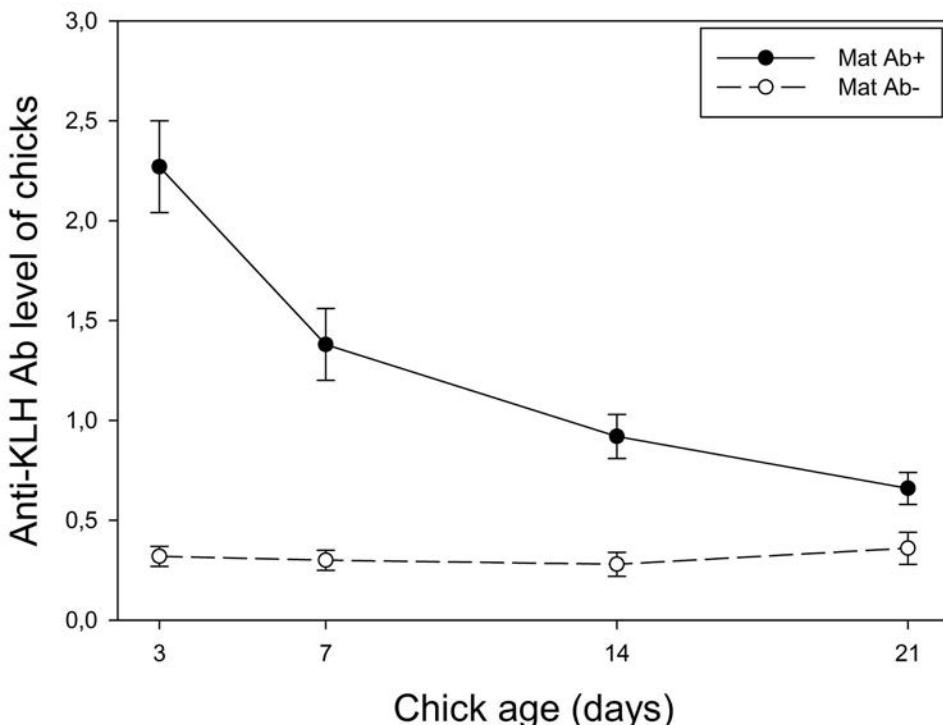


Figure 2. Persistence of maternal anti-KLH Abs in chicks as they age. For illustrative purposes, we split the chicks into two categories on the basis of the median 3-day-old anti-KLH Ab level: chicks that have received high levels of maternal anti-KLH Abs (Maternal Ab+; above the median) are represented by black dots and chicks that have received low levels of maternal anti-KLH Abs (Maternal Ab-; below the median) are represented by white dots.

doi: 10.1371/journal.pone.0079942.g002

Table 2. Output of the best-fit generalized mixed model that explains variation in anti-KLH Ab levels in chicks as they age.

Effects	DF	F	P-values
Initial anti-KLH Ab level at 3 days old	1,113	303.52	< 0.0001
Chick age (7, 14, and 21 days)	2,113	4.30	0.03
Chick age x Initial anti-KLH Ab level at 3 days old	2,113	51.82	< 0.0001

The interaction between chick age and initial anti-KLH Ab levels in 3-day-old chicks was significant in this model. All models involving other interactions, the food treatment, or the anti-KLH Ab levels of foster parents had higher AICc values (>2) than the model presented here.

doi: 10.1371/journal.pone.0079942.t002

14 days ($N = 30$, $r = 0.85$, $p < 0.0001$), and 3 and 21 days ($N = 30$, $r = 0.78$, $p < 0.0001$, Figure 3). Neither the anti-KLH Ab levels nor the food treatment experienced by foster parents affected the persistence of anti-KLH Abs in chicks (main factor or interaction; see Table 2).

Discussion

In this study, we first tested if food availability during egg laying and the immunization of foster parents affected the

maternal transfer of specific Abs to young chicks. As previously reported [16], we found that the level of specific anti-KLH Abs in young chicks was positively correlated with that found in maternal blood during egg laying (Figure 1). Interestingly, the shape of this correlation was quadratic, suggesting that the rate of transfer increases as the level of anti-KLH Abs circulating in mothers increases. Contrary to our prediction, the level of anti-KLH Abs in 3-day-old chicks was not affected by the level circulating in foster parents (mothers and/or fathers). This result suggests either that parental crop milk did not contain Abs or that such Abs did not cross the chick gut barrier to reach the bloodstream. Previous studies have quantified total Abs in the crop milk of pigeons [26]. The crop milk of columbids contains mostly IgAs that are believed to play a local protective role in the gut of young nestlings and only partially reach the bloodstream [26]. In this study, we measured levels of specific anti-KLH IgYs, not IgAs, in young, which may explain why the immunization of foster parents did not affect offspring Ab levels. Another recent study also failed to detect anti-KLH IgYs in pigeon crop milk following immunization [6]. However, the study also found that a parental immune challenge affected the long-term humoral response of one-year-old juveniles [6]. This finding suggests that postnatal transfer of immunity occurred by means other than IgG transfer (likely IgA transfer) and affected the long-term immune responses of nestlings. The next step to

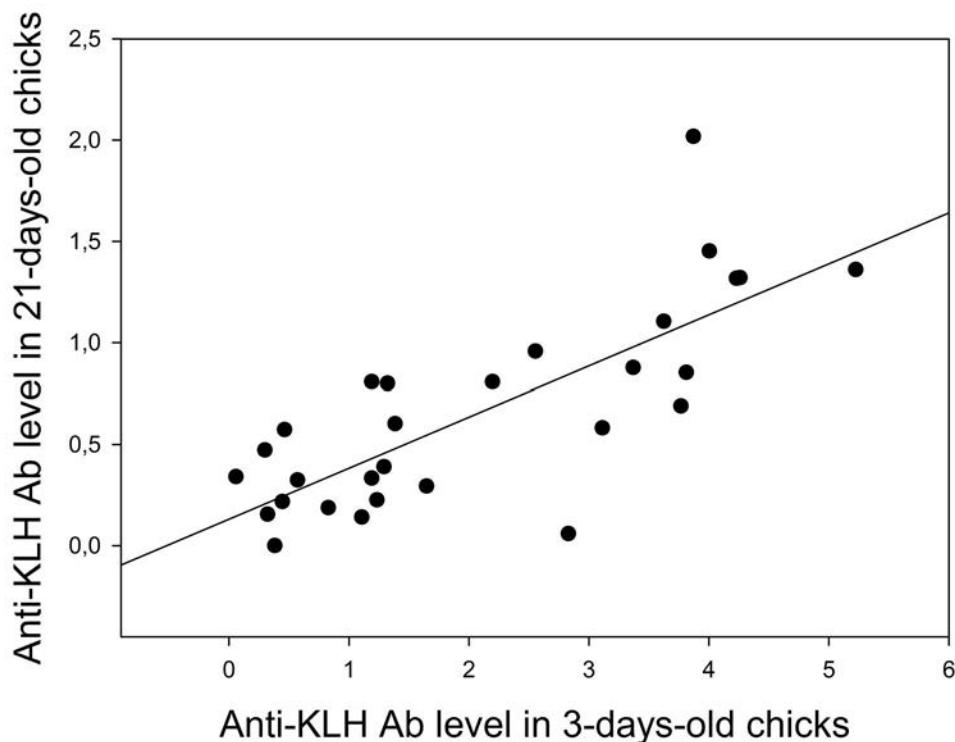


Figure 3. Positive relationship between anti-KLH Ab levels in 3- and 21-day-old chicks from immunized biological mothers.

doi: 10.1371/journal.pone.0079942.g003

validate this hypothetical mechanism would be to quantify IgAs in crop milk and the chick bloodstream.

Controlling for anti-KLH levels in biological mothers, we found that the food treatment experienced during egg laying significantly affected maternal Ab transfer (Table 1); specifically, food limitation during egg laying significantly decreased the amount of Abs transferred. In contrast to previous studies [17,19], food limitation appears here to be an important factor that decreases the maternal transfer of Abs, a crucial life-history trait [1]. This discrepancy may be explained by the fact that we examined specific Abs (anti-KLH) in our study, whereas previous studies focused exclusively on total Abs. Measuring total Abs can yield a different result since both induced and non-induced Abs may be present [19,34,35]. Our study suggests that the transfer of induced Abs might be costly for females, an issue that is still debated. This cost might stem from the accumulation of high levels of maternal antibodies in eggs, which may constitute a significant resource drain for ovulating females [1,36]. As a consequence, trade-offs may occur with other life-history traits and strategic adjustments may have evolved to cope with different environmental factors such as pathogen exposure and food availability, which would explain variation among females in Ab transmission ability. The effect of food availability on the transfer of specific maternal Abs identified in this study could have important consequences for the ecology and evolution of host-parasite interactions. Further experiments involving the manipulation of exposure to natural antigens are now needed to investigate the trade-offs

between maternal transfer ability and other life-history traits [37].

The second objective of this study was to examine the temporal persistence of maternal anti-KLH Abs in growing chicks, which is an oft-neglected life-history trait [14]. To this end, we examined the variation in anti-KLH Ab levels in chicks as they aged (at 3, 7, 14, and 21 days). First, we found that Ab level decreased strongly as a function of nestling age in chicks that had received anti-KLH Abs from immunized parents (Figure 2). As previously shown in the Japanese quail [15], the duration of Ab persistence is predicted by the initial level of maternal anti-KLH Abs received by chicks, as shown by the positive relationship found between anti-KLH Ab levels at 3 and 21 days (Figure 3). As previously discussed, the temporal persistence of Abs in nestlings was not affected by the hypothetical transfer of postnatal Abs by foster parents. In addition, we did not find any effect of the food treatment experienced during growth on this persistence, suggesting that it is not energetically costly to keep maternal Abs for offspring and that food intake does not increase the ability of young to catabolize maternal Abs. Recent studies have underscored the importance of maternal Ab persistence and have shown that it demonstrates interspecific variation that may be linked to species longevity [14]. For instance, maternal Abs persist longer in the longer-lived Cory's shearwater (*Calonectris diomedea*) than in the shorter-lived kittiwake (*Rissa tridactyla*) [14,16]. Our study further emphasizes that studies on maternal

Ab persistence should take into account the initial level of Abs transferred by mothers.

In conclusion, our experimental study shows that although food availability can affect the ability of mothers to transfer Abs via the egg yolk to their chicks, it did not have a detectable effect on the duration of Ab persistence in young chicks. Furthermore, we did not detect a postnatal transfer of circulating IgY Abs by foster parents to the chick bloodstream through crop milk. Our study suggests that Ab transfer could be costly for mothers and that food availability may contribute to variation in the maternal ability to transfer Abs to young. Taken together, these results suggest that the prenatal environment might have a strong effect on an offspring's circulating Ab levels via the prenatal transfer of Abs by biological mothers, whereas postnatal conditions might have less of an effect on this trait. More studies are required to better understand

References

- Boulinier T, Staszewski V (2008) Maternal transfer of antibodies: raising immuno-ecology issues. *Trends Ecol Evol* 23: 282-288. doi: 10.1016/j.tree.2007.12.006. PubMed: 18375011.
- Gasparini J, McCoy KD, Haussy C, Tveraa T, Boulinier T (2001) Induced maternal response to the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*. *Proc R Soc Lond B-Biol Sci* 268: 647-650. doi:10.1098/rspb.2000.1411.
- Grindstaff JL, Brodie ED III, Ketterson ED (2003) Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc R Soc Lond B-Biol Sci* 270: 2309-2320. doi:10.1098/rspb.2003.2485. PubMed: 14667346.
- Hasselquist D, Nilsson JA (2009) Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philos T R Soc B* 364: 51-60. doi:10.1098/rstb.2008.0137. PubMed: 18926976.
- Gasparini J, McCoy KD, Staszewski V, Haussy C, Boulinier T (2006) Dynamics of anti-*Borrelia* antibodies in Black legged Kittiwake (*Rissa tridactyla*) chicks suggest maternal educational effect. *Can J Zool* 84: 623-627. doi:10.1139/z06-024.
- Jacquin L, Blottière L, Haussy C, Perret S, Gasparini J (2012) Prenatal and postnatal parental effects on immunity and growth in 'lactating' pigeons. *Funct Ecol* 26: 866-875. doi:10.1111/j.1365-2435.2012.01988.x.
- Addison B, Ricklefs R, Klasing K (2010) Do maternally derived antibodies and early immune experience shape the adult immune response? *Funct Ecol* 24: 824-829. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01706.x.
- King MO, Owen JP, Schwabl HG (2010) Are maternal antibodies really that important? Patterns in the immunologic development of altricial passerine house sparrows (*Passer domesticus*). *PLOS ONE* 5: e9639. doi:10.1371/journal.pone.0009639. PubMed: 20300173.
- Staszewski V, Gasparini J, McCoy KD, Tveraa T, Boulinier T (2007) Evidence of an interannual effect of maternal immunization on the immune response of juveniles in a long-lived colonial bird. *J Anim Ecol* 76: 1215-1223. doi:10.1111/j.1365-2656.2007.01293.x. PubMed: 17922718.
- Gasparini J, Plaist R, Bize P, Roulin A (2009) Pre-hatching maternal effects inhibit nestling humoral immune response in the tawny owl. *J Avian Biol* 40: 271-278. doi:10.1111/j.1600-048X.2008.04590.x.
- Staszewski V, Siitari H (2010) Antibody injection in the egg yolk: maternal antibodies affect humoral immune response of the offspring. *Funct Ecol* 24: 1333-1341. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01745.x.
- Kallio ER, Begon M, Henttonen H, Koskela E, Mappes T et al. (2010) Hantavirus infections in fluctuating host populations: the role of maternal antibodies. *Proc R Soc Lond B-Biol Sci* 277: 3783-3791. doi: 10.1098/rspb.2010.1022. PubMed: 20591866.
- Jacquin L, Haussy C, Bertin C, Laroucau K, Gasparini J (2013) Darker female pigeons transmit more specific antibodies to their eggs than do paler ones. *Biol J Linn Soc* 108: 647-657. doi:10.1111/bij.12001.
- Garnier R, Ramos R, Staszewski V, Militão T, Lobato E et al. (2012) Maternal antibody persistence: a neglected life history trait with implications from albatross conservation to comparative immunology.
- Proc R Soc Lond B-Biol Sci 279: 2033-2041. doi:10.1098/rspb.2011.2277.
- Grindstaff JL (2010) Initial levels of maternally derived antibodies predict persistence time in offspring circulation. *J Ornithol* 151: 423-428. doi:10.1007/s10336-009-0472-5.
- Gasparini J, McCoy KD, Tveraa T, Boulinier T (2002) Related concentrations of specific immunoglobulins against the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in eggs, young and adults of the kittiwake (*Rissa tridactyla*). *Ecol Lett* 5: 519-524. doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00345.x.
- Gasparini J, Boulinier T, Gill VA, Gil D, Hatch SA et al. (2007) Food availability affects the maternal transfer of androgens and antibodies into eggs of a colonial seabird. *J Evolution Biol* 20: 874-880. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01315.x. PubMed: 17465898.
- Boost M, Robert KE (2012) Maternal effects in disease resistance: poor maternal environment increases offspring resistance to insect to an insect virus. *Proc R Soc Lond B-Biol Sci* 279: 4009-4014. doi:10.1098/rspb.2012.1073.
- Grindstaff JL, Demas GE, Ketterson ED (2005) Dietary protein restriction affects egg size and number but does not reduce maternal antibody transfer in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J Anim Ecol* 74: 1051-1058. doi:10.1111/j.1365-2656.2005.01002.x.
- Van de Perre P (2003) Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* 21: 3374-3376. doi:10.1016/S0264-410X(03)00336-0. PubMed: 12850343.
- Halliday R (1955) Prenatal and postnatal transmission of passive immunity to young rats. *Proc R Soc Lond B-Biol Sci* 144: 427-430. doi: 10.1098/rspb.1955.0068. PubMed: 13280691.
- Garnier G, Gandon S, Chaval Y, Charbonnel N, Boulinier T (in press) Evidence of cross-transfer of maternal antibodies through allo-suckling in a mammal: potential importance for behavioral ecology. *Mamm Biol* (on-line early).
- Johnston RF, Janiga M (1995) Feral pigeons. New York: Oxford University Press.
- Shetty S, Bharathi L, Shenoy KB, Hedge SN (1992) Biochemical properties of pigeon milk and its effects on growth. *J Comp Physiol B* 162: 632-636. doi:10.1007/BF00296644.
- Eraud C, Dorie A, Jacquet A, Faivre B (2008) The crop milk: a new route for carotenoid-mediated parental effects. *J Avian Biol* 39: 247-251. doi:10.1111/j.0908-8857.2008.04053.x.
- Engberg RM, Kaspers B, Schranner I, Kosters J, Losch U (1992) Quantification of the immunoglobulin classes IgG and IgA in the young and adult pigeon (*Columba livia*). *Avian Pathol* 21: 409-420. doi: 10.1080/03079459208418859. PubMed: 18670956.
- Hawkins P, Morton DB, Cameron D, Cuthill I, Francis R et al. (2001) Laboratory birds, refinements in husbandry and procedures. *Lab Anim* 35: 109-115.
- Jacquin L, Récapet C, Bouche P, Leboucher G, Gasparini J (2012) Melanin-based coloration reflects alternative strategies to cope with food limitation in pigeons. *Behav Ecol* 23: 907-915. doi:10.1093/beheco/ars055.
- Hasselquist D, Wasson MF, Winkler DW (2001) Humoral immunocompetence correlates with date of egg-laying and reflects

variation in the transfer and temporal persistence of Abs among individuals and/or species.

Acknowledgements

We are very grateful to Julie Ducorbier, Loic Chauvin, Anne-Caroline Prévôt-Julliard, Gérard Leboucher, Hélène Corbel, Philippe Lenouvel, and the CEREEP station for the help they provided at different stages of the study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LJ AI JG. Performed the experiments: LJ SP. Analyzed the data: AI CH JL. Contributed reagents/materials/analysis tools: AI CH JL. Wrote the manuscript: AI JG.

- workload in female tree swallows. *Behav Ecol* 12: 93-97. doi:10.1093/oxfordjournals.beheco.a000384.
30. Duffy JE, Carlson E, Li Y, Prophete C, Zelikoff JT (2002) Impact of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the immune function of fish: age as a variable in determining adverse outcome. *Mar Environ Res* 54 : 559-563. doi:10.1016/S0141-1136(02)00176-9. PubMed: 12408617.
 31. Dixon FJ, Jacot-Guillarmod H, McConahey PJ (1966) The antibody responses of rabbits and rats to hemocyanin. *J Immunol* 97: 350-355. PubMed: 5925706.
 32. Jurincic-Winkler C, Metz KA, Beuth J, Sippel J, Klippen KF (1995) Effect of keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bacillus Calmette-Guerin (BCG) instillation on carcinoma in situ of the urinary bladder. *Anticancer Res* 15(6B): 2771-2776. PubMed: 8669862.
 33. Lessells CM, Boag PT (1987) Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104: 116-121. doi:10.2307/4087240.
 34. Kilpimaa J, Alatalo RV, Siitari H (2007) Prehatching maternal investment and offspring immunity in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *J Evolution Biol* 20: 717-724. doi:10.1111/j.1420-9101.2006.01239.x. PubMed: 17305837.
 35. Pihlaja M, Siitari H, Alatalo RV (2006) Maternal antibodies in a wild altricial bird: effects on offspring immunity, growth and survival. *J Anim Ecol* 75: 1154-1164. doi:10.1111/j.1365-2656.2006.01136.x. PubMed: 16922851.
 36. Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J, Roth TF (1985) Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* 54: 755-762. PubMed: 3980047.
 37. Zanchi C, Troussard J-P, Moreau J, Moret Y (2012) Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. *Proc R Soc Lond B-Biol Sci* 279: 3223-3230. doi:10.1098/rspb.2012.0493.

ANNEXE II

Food availability modulates the effects of maternal antibodies on growth and immunity in young feral pigeons

En préparation

Ismail A.¹, Jacquin L.^{1,2}, Haussy C.¹, Perret S.³, & Gasparini J.¹

¹ Université Pierre et Marie Curie CNRS ENS, Laboratoire Ecologie & Evolution UMR 7625,
7 quai St Bernard, 75005 Paris, France

² McGill University, Department of Biology & Redpath Museum, 859 Sherbrooke Street West
Montréal, Québec, Canada

³ Centre d'Ecologie Expérimentale et Prédictive CEREEP-Ecotron Ile-De-France CNRS ENS,
UMS 3194, Ecole Normale Supérieure, St-Pierre-lès-Nemours, France

Abstract

It is now widely acknowledged that mothers can transfer their own environmental experience of parasitism to their progeny through the allocation of specific maternal antibodies (hereafter referred as MatAb) that can shape their offspring phenotype and affect their fitness. However, the importance of environmental variability in modulating such effects of MatAb is still elusive. Using an experimental approach, we investigated how food availability interacted with maternal antibodies to solve the trade-off between humoral immunity and growth in young feral pigeons (*Columba livia*). Results show that the inhibitory effect of maternal antibodies on the humoral response of chicks was only detected in food-limited groups, highlighting the importance of food availability in modulating maternal effects on humoral immunity. In addition, body mass growth was higher in chicks receiving lower amounts of maternal antibodies regardless of the food treatment. This contradicts previous studies and suggests that the transfer of MatAb could entail some costs for chicks and reduce their growth. Taken together these results reinforces the idea that MatAb play a central role in shaping host life-history traits but that their adaptive value is highly dependent on the environmental context in which they take place.

Keywords: humoral response, immune-ecology, maternal effects, transgenerational effects, trade-off.

Introduction

The transfer of antibodies from mothers to their offspring has now been well documented in domesticated (Smith et al., 1994) and wild animals (Gasparini et al., 2001; 2002; Boulinier & Staszewski, 2008; Garnier et al., 2012; 2013; Jacquin et al., 2013) and researchers have started to investigate the adaptive significance of such transfer (Grindstaff et al., 2003; Siegrist, 2003; Gasparini et al., 2006). For instance, maternally transferred antibodies (hereafter referred as MatAb) confer passive protection to offspring by binding and participating to the destruction of antigens encountered by the young. Since neonatal vertebrates have limited ability to mount an immune response during the first days of their life, maternal antibodies can provide an important protection against pathogens with beneficial effects on fitness (Heeb et al., 1998; Buechler et al., 2002; Kristan, 2002; Grindstaff, 2008).

A direct effect of this maternal protection is a reduction in the level of specific antigens circulating in offspring blood, which in turn should inhibit the own synthesis of antibodies by the offspring towards the same antigens (inhibitory effect). Therefore, it is possible to indirectly measure the protective role of MatAb by examining the inhibitory effect on the production of specific antibodies in offspring (Boulinier and Staszewski, 2008; Gasparini et al., 2009). Using this approach, several studies confirm this adaptive effect of MatAb in several species (Gasparini et al., 2009, Staszewski et al., 2007; Staszewski & Siitari, 2010; Jacquin et al., 2012; Garnier et al., 2012; 2013). By reducing the intensity of the humoral and innate immune response of the chick, MatAb may also reduce the energy allocated to the immune system (Grindstaff 2008; Rutkowska et al., 2012), and therefore, may positively impact the growth of offspring (e.g. Pihlaja 2006, Grindstaff 2008), constituting an indirect beneficial effect of the inhibitory effect of MatAb (Boulinier & Staszewski, 2008). However, the intensity and adaptive value of such reallocation is likely to depend on the amount of resources available for the chick, so that the effect of maternal antibodies on offspring phenotype is likely to vary with environmental conditions and food availability. However the effect of environmental heterogeneity on the effects of maternal antibodies is still elusive.

Food availability encountered during early life has important effects on the development of the immune system (Gasparini et al., 2006) and offspring growth (Hoi-Leitner et al., 2001), and may affect the trade-offs between these two life-history traits. In particular,

when food availability is low, energy is limited and trade-offs between growth and immunity might be more detectable (Pihlaja et al., 2006). Under food limitation, we therefore expect that juveniles might reduce their investment in their humoral immune response (e.g. Bonneaud et al., 2003). Furthermore, we can also expect that the positive growth consequences of the inhibitory effect of MatAb might be more pronounced under low food availability conditions compared to high food availability conditions.

In this study, we tested these predictions by experimentally manipulating post-hatching food availability and MatAb received by chicks in feral pigeons kept in captivity and examining the chick's immune responses and growth after antigen injection. In a previous study, we showed that limited food availability reduces the transfer of MatAb in mothers (Ismail et al., 2013). Here, we focused on the effects of food availability and MatAb on chicks. We investigated how food availability modulates the inhibitory effects of MatAb on the humoral immune response of chicks and associated costs on growth. To this end, we measured the immune response and growth of chicks injected with KLH antigen (Keyhole Limpet Hemocyanin) in relation to food availability during rearing period (food availability of foster parents) and the level of MatAb transmitted (estimated by the level of anti-KLH antibodies at 3 days-old).

Materials and methods

Study populations

120 adult feral pigeons (60 females and 60 males) were captured with trap cages at three suburban locations near Paris in 2010 by the SACPA Company (France) with the authorization of local authorities. They were kept in 10 outdoor aviaries (2.20 m x 2.20 m) at the CEREEP field station (CEREEP-Ecotron Ile-de-France, UMS 3194, Ecole Normale Supérieure, St-Pierre-les-Nemours). Each aviary contained six males and six females. On the day of clutch completion, the two eggs of each clutch were cross-fostered with another nest with a similar laying date (± 1 day) to obtain experimental groups of chicks differing in prenatal and postnatal parental immunization and food availability experienced by biological and foster parents (see Ismail et al., 2013).

Food treatment

The food limitation treatment was initiated two weeks before the immunization treatment. Sixty pigeons (in five aviaries) were food limited ("food-limited group"): they were fed with

30 g of wheat per day per individual, corresponding to a basal diet necessary to maintain non-breeding captive pigeons (Hawkins et al. 2001). When the chicks in this group hatched, no food was added during their first week of life. During their second week of life, 15 g per chick per day were added. From the third week onwards, 30 g per chick per day were added. Sixty other pigeons (in five aviaries) were fed a mixture of corn, wheat, and peas *ad libitum* (“*ad libitum* food group”). All pigeons were provided with mineral grit and vitamin-supplemented water.

Parental and chicks immunization treatment

The immunization treatment started two weeks after the beginning of the food treatment. 60 birds (three breeding pairs chosen randomly in each aviary) received a subcutaneous injection of a 100- μ L solution containing 0.5 mg.mL⁻¹ Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) (antigen-injected group). The 60 remaining birds were injected with phosphate-buffered saline (PBS) (sham-injected group). A second injection was performed two weeks later to ensure that blood anti-KLH Ab levels differed between antigen- and sham-injected treatment groups. Nests were monitored daily to record laying and hatching dates. In a previous study, we showed that the level of anti-KLH Ab in chicks at 3-days-old was a good proxy of the amount of MatAb transferred to the chicks and that foster parents were not able to transfer anti-KLH IgY antibodies after birth (Ismail et al., 2013). To estimate the amount of MatAb transferred, we therefore collected blood samples from 3-days-old chicks. To examine the primary and secondary humoral immune response, we injected all 21- and 35-days-old chicks subcutaneously with 100- μ L solution containing 0.5 mg.mL⁻¹ of KLH. We collected blood samples from chicks across time, i.e. 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days post-hatching to follow the dynamics of anti-KLH Abs following the injections. To examine growth during this time period, we also measured body mass at each blood collection to the nearest g, and wing size and tarsus size to the nearest mm. Part of the blood was used for sex DNA extraction and sex determination following Griffiths et al. (1998). Blood samples were centrifuged, and the plasma was stored at -20°C for immunological assays. Overall, 104 chicks were sampled.

Anti-KLH antibody assay

Anti-KLH IgY Ab levels in the plasma samples were assayed using the method described in Jacquin et al. (2012). High-binding plates (96 wells, flat bottom, Microlon® 600; cat. 655101, Greiner Bio-One, Germany) were coated overnight at 5°C with 100 μ L of KLH (40 μ g.mL⁻¹

in 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6) and then washed five times with PBS (0.1 M, pH 7.4). Wells were blocked with 200 µL of a 3% milk powder-PBS solution (dried milk obtained from Régilait Bio) for two hours at room temperature with agitation. After five washings, 100 µL of plasma (dilution 1/500) diluted in a 0.5% milk powder-PBS solution were added to the wells. Plates were then incubated overnight at 4°C. After washing, 100 µL of rabbit-anti-pigeon IgG conjugated to horseradish peroxidase (10 mg/ml in PBS, pH 7.2, Nordic Immunology, Netherlands) and diluted in a 0.5% milk powder-PBS solution (dilution 1/5000) were added to the wells; the plates were then incubated for two hours at room temperature. After washing, 100 µL of ortho-phenylenediamine (OPD) (Sigma-Aldrich, USA) were added to the wells. The reaction was stopped after 10 minutes by adding 50 µL of HCl (1 M). Plates were then read at 490 nm using a microplate reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK). A panel of samples from another experiment was used to estimate the repeatability of sample Ab values between plates ($N = 56$, $F_{53,56} = 55.8$, $P < 0.001$, $r = 0.96$) as well as within plates ($N = 31$, $F_{26,31} = 21.3$, $P < 0.001$, $r = 0.89$); the results showed that this method reliably measures anti-KLH Ab levels. A mixture of several pigeon samples was serially diluted and added to all plates to standardize the relative Ab concentrations of all the samples. The relative concentration of anti-KLH Abs in the samples was log transformed and is referred to hereafter as the anti-KLH Ab level.

Statistical analyses

To test the effects of food treatment and MatAb on humoral immune response and growth of chicks, we performed four mixed models with anti-KLH Ab level, body mass, wing and tarsus size of chicks as response variables. We included the food treatment during rearing period and chick age (21, 28, 35, 42, 49 and 56 days) as explanatory variables and the anti-KLH Ab levels in 3-days-old chicks (reflecting the amount of antibodies transferred) as a covariate. We also added the sex of chicks as a cofactor. The foster nest and nestlings identities were included as random factors. The best-fitting models were chosen using the AIC criterion. All statistical analyses were performed using SAS (version 9.2).

Results

Food treatment during rearing period did not affect the dynamics of anti-KLH Ab production in nestlings (Table 1), but anti-KLH MatAb had an inhibitory effect on the primary and secondary immune response of chicks (significant MatAb x age interaction: Table 1) (Fig. 1).

Chicks from the *ad libitum* food treatment had a significant higher body mass, wing and tarsus size than chicks from the restricted food treatment (Table 1). Furthermore, body mass growth was significantly affected by the amount of maternal anti-KLH Ab transferred as shown by the fact that the interaction between MatAb levels and food treatment was kept in the best model according to the AIC criterion (Table 1). Indeed, in the *ad libitum* treatment group, chicks having received lower amounts of MatAb (MatAb-), were heavier than chicks having received higher amount of MatAb (MatAb+; Fig. 2a, Mixed Model, $F_{1,255} = 3.76$, $P = 0.05$). This difference was not found in the food restricted treatment ($F_{1,254} = 0.00$, $P = 0.98$). In addition, whatever the food treatment, chicks having received lower amounts of MatAb (MatAb-), tend to have longer tarsus than chicks having received higher amount of MatAb (MatAb+; Fig. 2b; Table 1)

Discussion

This study aimed at unraveling the role of food variability in modulating the effects of maternal antibodies (MatAb) on life-history traits of young vertebrates. Results show that MatAb had an inhibitory effect on the humoral response of young pigeons, as previously reported in other species (Fig. 1; Staszewski et al., 2010). But interestingly, this inhibitory effect did not interact with food availability. Contrary to previous studies reporting an energetic cost of humoral immune response (*e.g.* Bonneaud et al., 2003), we did not find any effect of food treatment on humoral immune response in young chicks. One potential explanation is that when food availability is low, pigeon chicks might favor immunity rather than body mass and size growth. This interpretation is consistent with the negative effect of food restriction on body mass and wing and tarsus size of growing chicks found in our studies. Overall, our results suggest that the role of MatAb in shaping humoral immunity is really crucial in early life and does not depend of other important environmental factor such as the amount of resources available in the habitat. These data reinforces the idea that MatAb is playing a central role in neonates by modulating the immune response, and call for long term studies to elucidate the consequences of this early environmental factor on adult fitness and life-history strategies.

The second aim of our study was to investigate the effects of MatAb and food availability on the trade-off between immunity and growth. We expected a higher growth of chicks having received a higher amount of MatAb, because MatAb are supposed to save

energy for growth by reducing the humoral immune response of chicks. Contrary to our expectations, we found that body mass was higher in chicks receiving lower amounts of MatAb in the *ad libitum* food treatment and that tarsus size tend to be longer in chicks receiving lower amounts of MatAb whatever the food treatment (Fig. 2). This contrasts with previous studies that either failed to detect an effect of MatAb on growth (Grindstaff et al., 2006; Staszewski et al., 2007) or find positive effects of MatAb on growth (Heeb et al., 1998; Grindstaff, 2008). Our results rather suggest that receiving MatAb entails some costs for chicks in terms of body mass and do not enable to save energy from a costly immune response. This is consistent with a previous study on pigeons in which we found, on a smaller sample size, that postnatal MatAb could impair body mass (Jacquin et al., 2012). This study provides the first experimental evidence of a cost associated with MatAb. As we performed a cross-fostering experiment and swapped eggs between nests, this negative effect of maternal antibodies on growth cannot be explained by differences in postnatal parental care (for instance, differences in feeding rates). Although further studies will be necessary to decipher the underlying mechanisms, this negative effect of MatAb on growth might be explained by differences in nutrients or hormones packed into the eggs. Indeed, in 2008, Boulinier and Staszewski suggested that MatAb transfer might represent a significant energy drain for females since high amounts of antibodies are diverted from blood circulation into the eggs (10 to 20%). This could impact the ability of mother to transfer other substances, such as nutrients or hormones, into the eggs, which could potentially impact offspring growth (Gasparini et al., 2007). For instance, when vaccinated, mothers could transfer higher amounts of MatAb at the expense of other proteins that could alter the growth of offspring. Future experimental studies are required to examine such a trade-off between MatAb and another egg substance impairing chick growth.

In conclusion, our results first show that food availability has the potential to modulate the effects of MatAb on the humoral immune response of young feral pigeons. In addition, results suggest a cost associated with MatAb transfer on offspring growth, although the underpinnings of these costs remain to be determined. Altogether, this study reinforces the idea that fluctuations in resource availability might strongly impact the effects of MatAb on the ontogeny of life-history traits and that these factors might interact to shape the evolution of host-parasite interactions in natural populations.

Acknowledgments

We are very grateful to Julie Ducorbier, Loic Chauvin, Anne-Caroline Prévot-Julliard, Gérard Leboucher, Hélène Corbel, Philippe Lenouvel, and the CEREEP station for the help they provided at different stages of the study. This study was carried out in accordance with the recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (revised Appendix A). All experiments and captures were approved by local authorities and the “Direction Départementale des Services Vétérinaires de Seine-et-Marne” (permit No. 77-05). This work was financed by grants from the région Ile-de-France (Sustainable Development Network R2DS, No. 2008-07). L. Jacquin was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research and a postdoctoral Fyssen fellowship. A. Ismail was supported by a scholarship from Damascus University in Syria.

References

- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B. & Sorci, G.** (2003). Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* **161**, 367–379.
- Boulinier, T. & Staszewski, V.** (2008). Maternal transfer of antibodies: raising immunology issues. *Trends Ecol. Evol.* **23**, 282-288.
- Buechler, K., Fitze, P. S., Gottstein, B., Jacot, A. & Richner, H.** (2002). Parasite-induced maternal response in a natural bird population. *J. Anim. Ecol.* **71**, 247-252.
- Garnier, R., Ramos, R., Staszewski, V., Militão, T., Lobato, E., Gonzalez-Solis, J., Boulinier, T.** (2012). Maternal antibody persistence: a neglected life history trait with implications from albatross conservation to comparative immunology. *Proc. R. Soc. B.* **279**, 2033-2041.
- Garnier, R., Boulinier, T. and Gandon, S.** (2013). Evolution of the temporal persistence of immune protection. *Biol. Lett.* **9**, 20130017.
- Gasparini, J., McCoy, K.D., Haussy, C., Tveraa, T. & Boulinier, T.** (2001). Induced maternal response to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi sensu lato* in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*. *Proc. R. Soc. B.* **268**, 647-650.
- Gasparini, J., McCoy, K.D., Tveraa, T., Boulinier, T.** (2002). Related concentrations of specific immunoglobulins against the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi sensu lato* in eggs, young and adults of the kittiwake (*Rissa tridactyla*). *Ecol. Lett.* **5**, 519-524.
- Gasparini, J., McKoy, K.D., Staszewski, V., Haussy, C. & Boulinier, T.** (2006). Dynamics of anti-*Borrelia* antibodies in Black legged Kittiwake (*Rissa tridactyla*) chicks suggest maternal educational effect. *Can. J. Zool.* **84**, 623-627.
- Gasparini, J., Boulinier, T., Gill, V. A., Gil, D., Hatch, S. A. & Roulin, A.** (2007). Food availability affects the maternal transfer of androgens and antibodies into eggs of a colonial seabird. *J. Evol. Biol.* **20**, 874-880.
- Gasparini, J., Piault, R., Bize, P. & Roulin, A.** (2009). Pre-hatching maternal effects inhibit nestling humoral immune response in the tawny owl. *J. Avian. Biol.* **40**, 271-278.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., Dawson, R.J.G.** (1998). A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* **7**:1071-1075.
- Grindstaff, J.L., Brodie, E.D.III. & Ketterson, E.D.** (2003). Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc. R. Soc. B.* **270**, 2309-2320.

- Grindstaff, J., Hasselquist, D., Nilsson, J-A., Sandell, M., Smith, H. G. & Stjernman, M.** (2006). Transgenerational priming of immunity: maternal exposure to a bacterial antigen enhances offspring humoral immunity. *Proc. R. Soc. B.* **273**, 2551-2557.
- Grindstaff, J. L.** (2008). Maternal antibodies reduce costs of an immune response during development. *J. Exp. Biol.* **211**, 654-660.
- Heeb, P., Werner, I., Ilicher, M. K. & Richner, H.** (1998). Benefits of induced host responses against an ectoparasite. *Proc. R. Soc. B.* **265**, 51-56.
- Hoi-Leitne, M., Romero-Pujante, M., Hoi, H. and Pavlova. A.** (2001). Food availability and immune capacity in serin (*Serinus serinus*) nestlings. *Behav. Ecol. Sociobiolo.* **49**, 333-339.
- Ismail A., Jacquin L., Haussy C., Legoupi J., Perret S. & Gasparini, J.** (2013). Food availability and maternal immunization affect transfer and persistence of maternal antibodies in nestling pigeons. *PLOS. One.* **8**: e79942.
- Jacquin, L., Blottière, L., Haussy, C., Perret, S. & Gasparini, J.** (2012). Prenatal and postnatal parental effects on immunity and growth in 'lactating' pigeons. *Funct. Ecol.* **26**, 866-875.
- Jacquin, L., Haussy, C., Bertin, C., Laroucau, K. & Gasparini, J.** (2013). Darker females transmit more specific antibodies to their eggs than paler ones in feral pigeons. *Biol. J. Linn. Soc.* **108**, 647-657.
- Kristan, D. M.** (2002). Maternal and direct effects of the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* on offspring growth and susceptibility to infection. *J. Exp. Biol.* **205**, 3967-3977.
- Pihlaja, M., Siitari, H. & Alatalo, R.V.** (2006). Maternal antibodies in a wild altricial bird: effects on offspring immunity, growth and survival. *J. Anim. Ecol.* **75**, 1154-1164.
- Rutkowska, J., Martyka, R., Arct, A., Cichón, M.** (2012). Offspring survival is negatively related to maternal response to sheep red blood cells in zebra finches. *Oecologia.* **168**, 355-359.
- Siegrist, C-A.** (2003). Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine.* **21**, 3406-3412.
- Smith, N. C., Wallach, M., Petracca, M., Braun, R. and Eckert, J.** (1994). Maternal transfer of antibodies induced by infection with *Eimeria maxima* partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella*. *Parasitology.* **109**, 551-558.

Staszewski, V., Gasparini, J., McKoy, K.D., Tveraa, T. & Boulinier, T. (2007). Evidence of an interannual effect of maternal immunization on the immune response of juveniles in a long-lived colonial bird. *J. Anim. Ecol.* **76**, 1215-1223.

Staszewski, V. & Siitari, H. (2010). Antibody injection in the egg yolk: maternal antibodies affect humoral immune response of the offspring. *Funct. Ecol.* **24**, 1333-1341.

Table 1. Output of the best-fit generalized mixed models explaining variations in anti-KLH Ab levels, body mass, wing and tarsus size in chicks as they age in interaction with the food treatment during rearing period and the level of maternal anti-KLH Ab levels at egg laying. Sex was added as a cofactor. Non-significant interactions were removed step by step from the final model according to the AIC.

Effects	Anti-KLH Ab level				Body mass				Wing size				Tarsus Size		
	DF	F	P	DF	F	P	DF	F	P	DF	F	P	DF	F	P
Age	5,502	76.10	<0.001	5,514	143.1	<0.001	5,515	2180.4	<0.001	5,515	28.29	<0.001			
Food treatment	1,502	1.58	0.21	1,514	19.18	<0.001	1,515	3.79	0.05	1,515	13.70	0.0002			
MatAb level	1,502	6.77	0.0001	1,514	0.38	0.54	1,515	0.05	0.82	1,515	3.61	0.06			
sex	1,502	2.45	0.12	1,514	14.1	0.0002	1,515	10.69	0.001	1,515	26.33	<0.001			
Age x Maternal Ab level	5,502	7.03	<0.001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MatAb level x Food treatment	—	—	—	—	—	—	1,514	2.60	0.10	—	—	—	—	—	—

Fig. 1. Humoral immune response of chicks over time, measured by anti-KLH Ab level in relation to maternal level of anti-KLH ab measured in chicks at 3 days-old. For illustrative purposes, we split the chicks into two categories on the basis of the median maternal anti-KLH Ab level at 3 days-old: chicks that have received high levels of maternal anti-KLH Abs (MatAb+; above the median) are represented by black squares and chicks that have received low levels of maternal anti-KLH Ab (MatAb-; below the median) are represented by white dots.

Fig. 2. Chicks body mass (a) and tarsus size (b) as they age in relation to maternal level of anti-KLH Ab and the food treatment. For illustrative purposes, we split the chicks into two categories on the basis of the median maternal anti-KLH Ab level at 3 days-old: chicks that have received high levels of maternal anti-KLH Abs (MatAb+; above the median) of the restricted food treatment are represented by white squares, chicks that have received high levels of maternal anti-KLH Abs (MatAb+; above the median) of the *ad libitum* food treatment are represented by black squares, chicks that have received low levels of maternal anti-KLH Abs (MatAb-; below the median) of the restricted food treatment are represented by white dots and chicks that have received low levels of maternal anti-KLH Abs (MatAb-; below the median) of the *ad libitum* food treatment are represented by black dots.

Fig. 1.

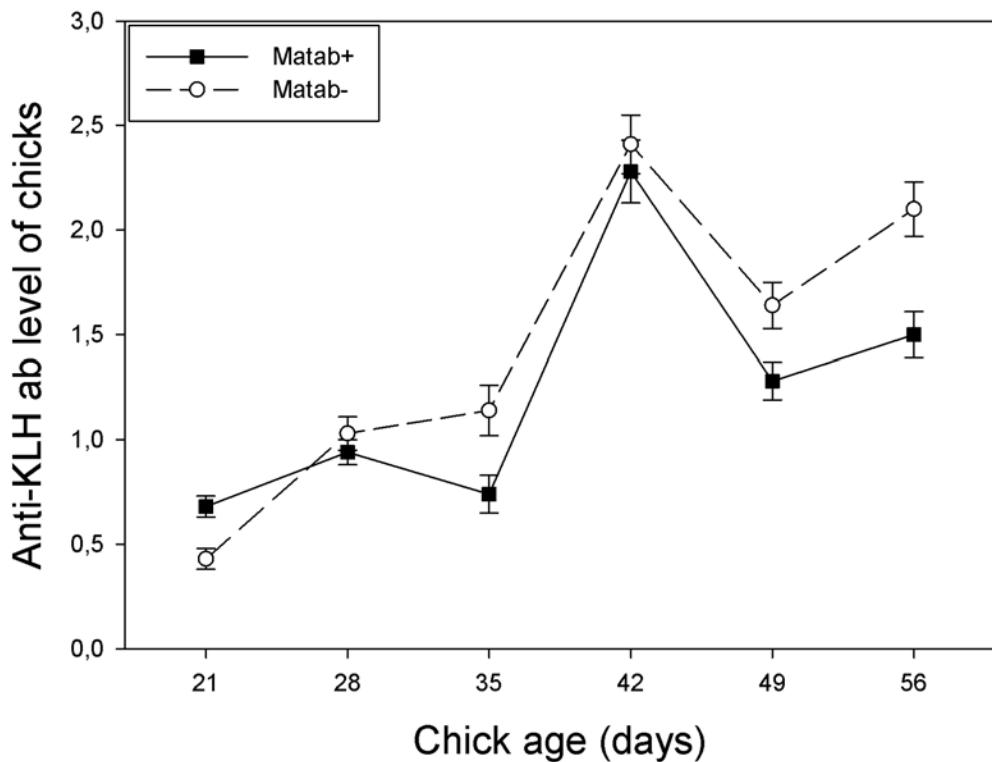


Fig. 2a.

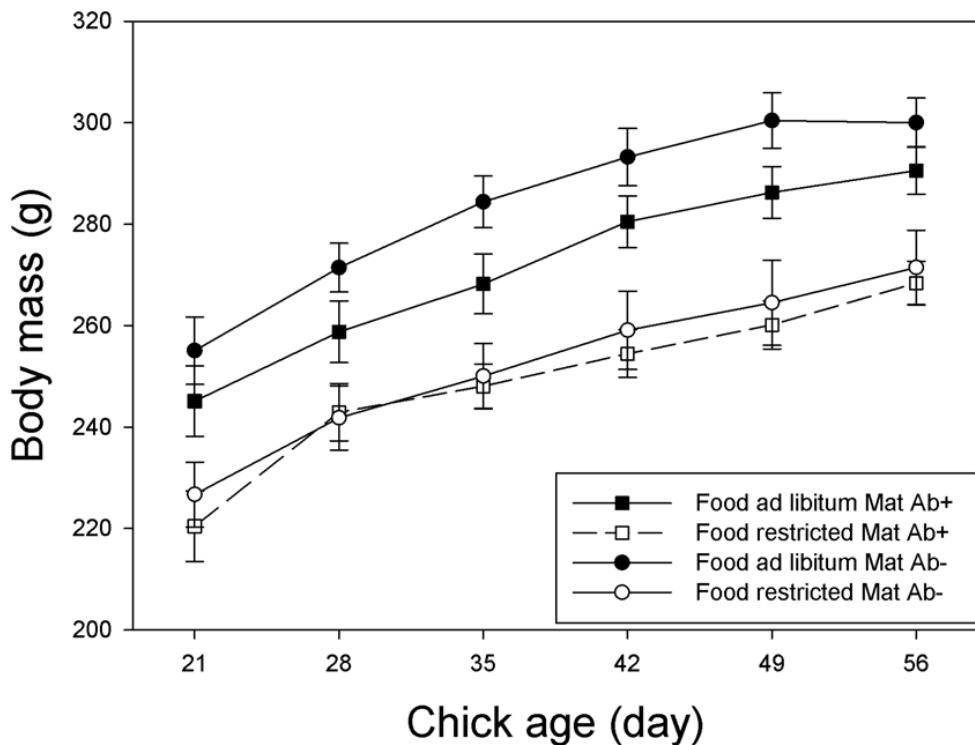
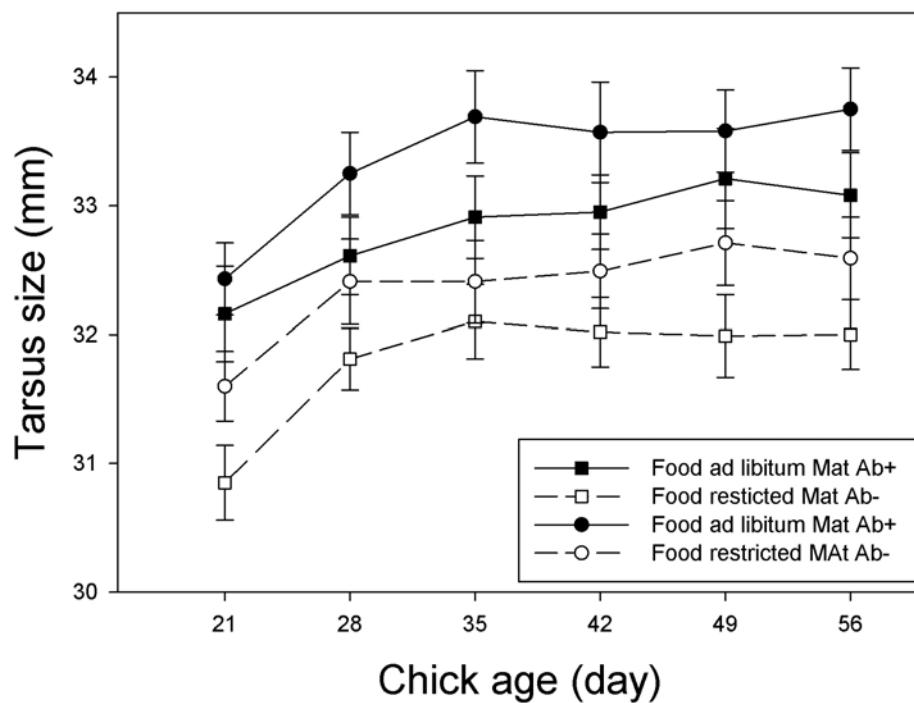


Fig. 2b.



ANNEXE III

Multigenerational transfer of maternal antibodies and their effects on the humoral immune response in urban pigeons (*Columba livia*)

En préparation

Ismail A.¹, Jacquin L.^{1,2}, Haussy C.¹, Perret S.³, & Gasparini J.¹

¹ *Université Pierre et Marie Curie CNRS ENS, Laboratoire Ecologie & Evolution UMR 7625, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France*

² *McGill University, Department of Biology & Redpath Museum, 859 Sherbrooke Street West Montréal, Québec, Canada*

³ *Centre d'Ecologie Expérimentale et Prédictive CEREEP-Ecotron Ile-De-France CNRS ENS, UMS 3194, Ecole Normale Supérieure, St-Pierre-lès-Nemours, France*

Running title: Multigenerational transfer of maternal antibodies

Abstract

Maternal antibodies not only provide passive protection early in life but could also affect the development of the juvenile's immune response in the next generations. Here, we examined this prediction in feral pigeons (*Columba livia*) by investigating the long term effects of antigen exposure experienced by females on antigen-specific Abs transferred into egg-yolk of their daughter and on the to the humoral immune response toward this same antigen in the grand-children the present study is illustrated by the fact that the levels of anti-KLH Abs were affected by the chick age and by the interaction between prenatal immune challenge and chick age. We found chicks from KLH-injected maternal grand-mothers had a higher humoral response than chicks from sham-injected grand-mothers. However, this effect only concerned the secondary humoral immune response because this effect was only significant after the second KLH injection at 35 days; lower blocking effect observed in nestlings injected at 21 days of age could be due to their immature immune system compared to older nestlings injected at 35 days of age, making the effect of prenatal grandmother treatment less detectable. We did not detect a significant effect of female KLH exposure on the ability of their daughters to transmit anti-KLH antibodies into their eggs. Together, these data suggest that matAb would be a non-genetic messenger of the phenotype "parasite resistance" over several successive generations but our results therefore suggest that there is an epigenetic effect induced by parasites exposure that affects the immune system of offspring over more than one generation.

Keywords: maternal antibodies, immune response, generation, feral pigeon.

Introduction

Maternal effects occur when a mother's phenotype, including her environmental experience, has a direct modulating effect on the phenotype of her young [1]. Maternal antibodies of vertebrates are a good example of maternal effects because they are directly transferred from the mother to the offspring (through the placenta in mammals or through the egg yolk in birds), and are known to affect the phenotypic traits of the young. However, the adaptive value of such transfer remains controversial because the selective processes shaping the evolution of this transfer in wild populations are still unclear. The level of antibodies found in the egg yolk and in the young are correlated with the level of maternal antibodies [2, 3], and the intensity of this transfer can be affected by the condition of mother [4, 5], and by the presence of parasites in the maternal environment [6, 7, 8, 9]. These studies thus suggest that mothers are able to adaptively adjust the level of antibodies transmitted depending on their environment and their physiological state. Maternally transferred antibodies might not only confer a passive protection to their young [10, 11], but could also affect the development of their immune response at different time scales [12]. Based on studies of mice and rats, a long term beneficial effect of matAb on offspring intrinsic immune system has been proposed [13, 14, 9]. Indeed, it has been recently suggested that specific maternal antibodies may educate the nestling immune system [15, 13, 16, 14, 17, 18, 19]

In addition, some studies suggest that the effect of maternal antibodies could span over several generations [14]. The mechanism proposed is that matAbs either act as internal image [15] or induce idiotypic network interactions [20] in the developing immune system of the neonate, priming it to the antigen repertoire to which the mother has been exposed [14]. In this case, the immune experience of the grand-mother may influence the immune system of the mother, which could in turn influence the immune system of their grandchild through transgenerational immune priming effects.

In this context, the phenotypic level of parasite resistance induced by the educational properties of maternal antibodies is a non-genetically inherited phenotype from mothers and therefore constitutes a good example of an epigenetic effect. We define epigenetic as the inheritable modifications of genes expression without changes in the underlying DNA sequences [21, 22]. Currently, the evolutionary importance of epigenetics effects in the inclusive heritability has been investigated and mainly focused on cultural heritability [23] and on DNA switch-off [24]. Here, we hypothesized that specific maternal antibodies would

be a non-genetic messenger of the phenotypic level of parasite resistance over several successive generations. This non-genetically inherited phenotype can therefore be under natural selection only if the phenotype is transmitted over more than one generation [23]. This hypothesis therefore predicts that the humoral immune response towards a specific antigen of juveniles is positively linked to the maternal grand-mother exposure towards this same antigen. In addition, we should observe that daughters of antigen exposed mothers transfer more antibodies into their eggs than non-exposed mothers. Alternatively, if we did not detect any impact of the maternal grand-mother exposure towards this same antigen on mothers ability to transfer antibodies and on juvenile immune response, we may conclude that antibodies may not constitute the intergenerational messenger of inheritable phenotype and can be considered as an adaptive plasticity of parasite resistance between two successive generations.

In this study, we tested this prediction in feral pigeons (*Columba livia*) by investigating the long term effects of antigen exposure experienced by F0 grand-mothers on the antigen-specific antibodies transferred into the egg-yolk of their F1 daughters and on the humoral immune response towards this same antigen in their F2 grand-children. We injected half of the F0 females with an antigen (Keyhole Limpet Haemocyanin- KLH) (antigen-injected group) or with a neutral solution (sham-injected group). Parents in generation F1 were all injected with KLH antigen. We then collected all eggs laid by the F1 daughters in the first year of reproduction and measured the amount of anti-KLH antibodies transferred into these eggs. We then injected the F2 generation with KLH to measure their humoral immune response against KLH. We first predicted that eggs laid by the F1 daughters of KLH-injected F0 mothers contained more anti-KLH antibodies than those laid by the F1 daughters of sham-injected F0 mothers. Second, we predicted that F2 chicks from KLH-injected F0 maternal grand-mothers would mount a stronger humoral immune response than F2 chicks from sham-injected F0 maternal grand-mothers.

Materials and methods

Study species

The experiment was conducted between 2010 and 2012; 120 adult feral pigeons (60 females and 60 males) were captured from three suburban locations near Paris and transported into 10

outdoor aviaries (2.20 m x 2.20 m) located at the CEREEP field station (CEREEP-Ecotron Ile-de-France, UMS 3194, Ecole Normale Supérieure, St-Pierre-les-Nemours). Each aviary contained six males and six females in similar conditions. These birds captured in the field constitute the F0 generation. Female feral pigeons usually lay 2 white eggs per hatch that both parents will incubate alternately for 18-19 days.

Experimental procedure

F0 grand-mothers

The F0 generation immunization was performed in 2010. The KLH-injected group consisted of 60 birds (three breeding pairs chosen randomly in each aviary) that received a subcutaneous injection of a 100- μ L solution containing 0.5 mg.mL⁻¹ keyhole limpet hemocyanin (KLH). KLH is a natural protein that birds do not encounter in their natural environment, and it is therefore used to stimulate an immune response towards a novel antigen [25, 26, 27]. It is a copper-containing respiratory protein derived from an invertebrate (*Megathura crenulata*) [28]. It stimulates a strong Ab response but does not trigger a severe inflammatory or pyrogenic response as do many other immunogens [29]. The sham-injected group consisted of the 60 remaining birds that were injected with phosphate-buffered saline (PBS). A second injection was performed two weeks later to ensure that blood anti-KLH Ab levels differed between KLH and sham-injected treatment groups [30].

F1 daughters

88 chicks born in 2010 (42 females and 46 males) constitute the F1 generation. All individuals of this F1 generation were injected with KLH (0.5 mg.mL⁻¹) at 21 and 35 days-old. Reproduction of the F1 generation was then monitored the year after the injections. From April to September in 2011, we collected 142 eggs from 25 females of the F1 generation (92 eggs were laid by 14 F1 daughters of 10 F0 females from sham-injected group and 50 eggs were laid by 11 F1 daughters of 8 F0 females from KLH-injected group). After collection, eggs were frozen and egg yolks were diluted 1:1 in Phosphate-Buffered Saline, homogenized 1 min with a homogenizer (ULTRA-TURRAX, T10 Basic Disperser, Sciencelab, Houston, USA). Chloroform was then added 1:1 and homogenized 1 min with a vortex. After

centrifugation (6 min at 13 rpm), the supernatant was used for Ab assays (Gasparini et al., 2001). There was no significant effect of F0 treatment on the number of eggs laid by F1 daughters (GLM, effect of antigen injection: $F_{8,957} = 1.293$, $P = 0.28$).

F2 grand-children

In 2012, eggs laid by F1 birds were left in the nests to hatch. These chicks constitute the F2 generation. We injected all F2 chicks at 21 and 35-days-old subcutaneously with 100- μ L of a solution containing 0.5 mg.mL⁻¹ of KLH. To follow the dynamics of the humoral immune response towards KLH, we collected blood samples from chicks from the brachial vein as they aged at 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days (15 chicks had a KLH-injected maternal grand-mothers ($N = 6$) and 10 chicks had a sham-injected maternal grand-mothers ($N = 7$)). Blood samples were left at 5 °C for 24 hours before centrifugation (10000 r.p.m. for 10 min). Plasma was then extracted and stored at -20 °C. The ELISA technique was used to quantify the amount of anti-KLH antibodies in the plasma.

Anti-KLH antibody assay

Anti-KLH Ab levels in egg yolk extractions and chicks plasma were determined using a sandwich ELISA (method described by [31]). High-binding plates (Greiner Bio-One, Germany) were coated overnight at 5°C with 100 μ L KLH (40 μ g.mL⁻¹ in 50 mM carbonate buffer), then washed three times with phosphate buffered saline (0.1 M PBS, pH 7.4). Wells were blocked with 200 μ L 3% milk powder (Regilait Bio) in PBS for two hours at room temperature with agitation. After washing, 100 μ L of plasma (dilution 1/500) or yolk extraction (dilution 1/1000) diluted in PBS with 0.5% milk powder were distributed. Plates were then incubated one night at 4°C. After washing, plates were incubated two hours at room temperature with 100 μ L rabbit-anti-pigeon IgG conjugated to horseradish peroxidase (10 mg/ml in PBS, pH 7.2, Nordic Immunology, Netherlands), diluted 1:5000 in PBS with 0.5% milk powder. After washing, 100 μ L of Ortho-Phénylène Diamine (OPD) (Sigma-Aldrich, USA) were added to the wells. The reaction was stopped after 10 minutes by adding 50 μ L HCl (1 M). Plates were then read at 490 nm in a microplate reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK). A panel of samples from another experiment was used to estimate the repeatability between Ab values of the same samples between-plates ($N = 56$, $F_{53,56} = 55.8$, P

< 0.001 , $r = 0.96$) as well as within-plates ($N = 31$, $F_{26,31} = 21.3$, $P < 0.001$, $r = 0.89$), showing that this method is reliable to measure anti-KLH Ab levels. As a standard, a mixture of several pigeon samples was measured in serial dilutions to calculate a relative Ab concentration after calibrations with this standard.

Statistical analyses

In this study, we first wanted to test whether the immune treatments (PBS vs. KLH) of the F0 females affected the transmission of antibodies into the eggs laid by their F1 daughters. To do this, we used a linear mixed model with the anti-KLH antibody concentration in eggs of the F1 generation as the dependent variable and the immune treatment of the F0 females as an explanatory variable. We added the F0 and F1 female identities as random effects to take into account for the non-independence of eggs laid by F1 sisters from the same F0 mothers and eggs laid by the same F1 mothers. Second, we wanted to test whether the humoral immune responses of F2 chicks were affected by the immune treatment of their F0 grand-mothers. To do this, we used a generalized linear mixed model with the anti-KLH antibody concentration of the F2 chicks as the dependent variable and the immune treatment of the F0 females as a fixed effect, with chick age as a cofactor. We added the F0 and F1 female identities as random effects for similar reasons as previously described. Anti-KLH antibody concentrations were log transformed to achieve normality. All statistical analyses were performed using SAS (version 9.2).

Results

The concentration of anti-KLH antibody in eggs laid by F1 daughters was not affected by the immune treatment of the F0 grand-mothers (Figure 1, mixed model: $F_{1,117} = 0.58$, $P = 0.45$). The dynamics of the humoral immune response towards KLH injections of the F2 chicks was significantly affected by the immune treatment of their F0 maternal grand-mother as shown by the significant interaction between chick age and immune treatment of the F0 maternal grand-mother (Table 1, Figure 2). Anti-KLH antibody concentrations was higher in F2 chicks having a KLH-injected maternal grand-mother than in chicks having a sham-injected maternal grand-mother at 49 days-old ($F_{1,20} = 5.09$, $P = 0.03$). No significant differences were detected in the other ages (all P -values > 0.20).

Discussion

In this study, we tested whether antibodies could be transmitted over more than two successive generations and whether female exposure to a specific antigen may affect the humoral immune response of their grand-children. According to our prediction, chicks from KLH-injected maternal grand-mothers had a higher humoral immune response than chicks from sham-injected grand-mothers. However, this effect only concerned the secondary humoral immune response because this effect was only significant after the second KLH injection at 35 days. The lower immune response observed in nestlings injected at 21 days of age could be due to their immature immune system compared to older nestlings injected at 35 days of age [31,32], (Figure 2). Our study therefore show that immune factors can be transferred from mother to offspring and have a long-lasting influence even on the immune response of the next generation. By contrast, in F1 generation, prenatal immune challenge of biological parents with KLH antigen decreased the humoral response against KLH of nestlings injected at 21 and 35 days of age [33], in agreement with previous studies [34]. This strongly suggests that maternal anti-KLH Abs transmitted through the egg yolk had a specific blocking effect on the humoral response of nestlings. In disagreement with our predictions, we did not detect a significant effect of female KLH exposure on the ability of their daughters to transmit anti-KLH antibodies into their eggs. Our results therefore suggest that there is an epigenetic effect induced by parasites exposure that affects the immune system of offspring over more than one generation (Figure 2). However, because we did not find that F0 females exposure affected the ability of F1 females to transmit specific anti-KLH antibodies in their eggs (Figure 1), we cannot validate our hypothesis concerning the transgenerational messenger of this epigenetic effect. About this point, two interpretations can be made from our results. First, our statistic power is not enough to detect the difference observed in the Figure 2 and specific maternal antibodies would be the transgenerational messenger. However, our sample size is relatively high for a long-term and transgenerational experiments and with the smaller sample size, we are able to detect an effect of the maternal F0 exposure on the immune response of the F2 generation. Second, the antibody would not be the transgenerational messenger and another physiological mechanism may play this role. For instance, there are growing evidences that androgens packed into the egg could affect several physiological traits such as the immune system [32]. Moreover, prenatal immune activation of F1 generation can significantly affect the development of specific neural processes such as neurotransmission and synaptic plasticity important for learning and memory [35, 36, 37, 38],

F1 mothers of high immune system quality are able to invest more in the reproduction and therefore transfer more nutrients into their egg yolk which have a positive effect on the development of immune system. Further studies are now required to test whether parasites female exposure may affect the ability of females to transfer such nutrients or hormones into the eggs over several generations.

Independently of the exact mechanism, it results in an epigenetic maternal priming of offspring intrinsic immune function of the F2 generation [39, 34, 9]. Maternally derived immunoglobulins have been proposed to have such an imprinting effect on the development of humoral immunity [17, 19]. But there are few studies reporting the mechanism of this imprinting. A recently proposed mechanism [40] suggested that the maternal environment may have an impact on individuals of the F2 generation, since the developing offspring bears the primordial germ cells (PGC) that later differentiate into gamete precursor cells and finally lead to the individuals of the F2 generation. Moreover, [13] propose that during early ontogeny there is an immunological imprinting phase with characteristics analogous to behavioural imprinting: (i) the internal imprinting effect is induced by external signals, (ii) in contrast to normal learning, immunological imprinting is also only possible during certain development phases and (iii) it is characterised by an (almost) irreversible result. Thus, there is a need for a basic mechanism of how maternal antibody transfer has direct and long term epigenetic and evolutionary effects on offspring. In addition, this long term epigenetic effect of immunity may profoundly affect the fitness of the next generation and may play a central role in ecology and evolution of host-parasite interaction. Indeed, in the context of the immune-ecology framework, all factors, such as this epigenetic effect, that impact the immune response would not only affect the immune resistance of individuals towards a pathogen but would also affect other life history traits [41] via trade-offs [42].

In conclusion, our experimental study shows that the grandmother's immunological memory of a previously encountered antigen can be transferred to the egg-yolk and stimulate the secondary humoral immune response of the F2 generation. Thus, our data strongly suggest the existence of an epigenetic effect of immunity. More knowledge is needed regarding the physiological messenger of such epigenetic effect from the whole lifetime repertoire of antigens to which the mother has been exposed.

Acknowledgments

All experiments and protocols were conducted under the approbation of the French Veterinary Services of the DSV77 (authorization N°77-05). We are very grateful to Jade Dauvillers, Anne-Caroline Prévot-Julliard, Gérard Leboucher, Hélène Corbel, Philippe Lenouvel, and the CEREEP station for the help they provided at different stages of the study. This work was financed by grants from the local government (Ile-de-France: Sustainable Development Network R2DS, No. 2008-07). L. Jacquin was supported by a grant from the French Ministry of Research and a postdoctoral Fyssen fellowship. A. Ismail was supported by a scholarship from Damascus University in Syria.

Reference

1. Mousseau, T. A. & Fox, C. W. 1998 Maternal effects as adaptations. Oxford, UK: *Oxford University Press*.
2. Gasparini, J., McCoy, K. D., Tveraa, T. & Boulinier, T. 2002b Related concentrations of specific immunoglobulins against the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in eggs, young and adults of the kittiwake (*Rissa tridactyla*). *Ecol. Lett* **5**, 519–524. (doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00345.x)
3. Grindstaff, J. L. 2010 Initial levels of maternally derived antibodies predict persistence time in offspring circulation. *J. Ornithol* **151**, 423–428. (doi:10.1007/s10336-009-0472-5)
4. Blount, J. D., Surai, P. F., Nager, R. G., Houston, D. C., Møller, A. P., Trewby, M. L. & Kennedy, M. W. 2002 Carotenoids and egg quality in the lesser black-backed gull *Larus fuscus*: a supplemental feeding study of maternal effects. *Proc. R. Soc. B* **269**, 29–36. (doi:10.1098/rspb.2001.1840)
5. Hargitai, R., Prechl, J. & Torok, J. 2006 Maternal immunoglobulin concentration in collared flycatcher (*Ficedula albicollis*) eggs in relation to parental quality and laying order. *Funct. Ecol* **20**, 829–838. (doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01171.x).
6. Gasparini, J., McCoy, K. D., Haussy, C., Tveraa, T. & Boulinier, T. 2001 Induced maternal response to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*. *Proc. R. Soc. B* **268**, 647–650. (doi:10.1098/rspb.2000.1411)
7. Müller, W., Groothius, T. G. G., Dijkstra, C., Alatalo, R. 2004 Maternal antibodies transmission and breeding densities in the black-headed gull *Larus ridibundus*. *Funct. Ecol* **18**, 719–724. (doi:10.1111/j.0269-8463.2004.00902.x)

8. Staszewski, V., Gasparini, J., McKoy, K. D., Tveraa, T. & Boulinier, T. 2007 Evidence of an interannual effect of maternal immunization on the immune response of juveniles in a long-lived colonial bird. *J. Anim. Ecol.* **76**, 1215–1223. (doi:10.1111/j.13652656.2007.01293.x)
9. Hasselquist, D. and Nilsson, J. A. 2009 Maternal transfer of antibodies vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Phil. Trans. R. Soc. B* **364**, 51–60.(doi:10.1098/rstb.2008.0137)
10. Musoke A. J, Williams J. F, Leid R. W, Williams C. S. 1975 The immunological response of the rat to infection with taeniaeformis. IV. Immunoglobulins involved in passive transfer of resistance from mother to offspring. *Immunol* **29**, 845–53.
11. Hanson, L. A., Adlerberth, I., Carlsson, B., Zaman, S., Hahn-Zoric, M., Jalil, F. 1990 Antibody-mediated immunity in the neonate. *Padiatr. Padol* **25**, 371–6.
12. Jacquin, L., Blottière, L., Haussy, C., Perret, S., Gasparini, J. 2012 Prenatal and postnatal parental effects on immunity and growth in ‘lactating’ pigeons. *Funct Ecol* **26**, 866 – 875. (doi:10.1111/j. 1365-2435.2012.01988.x)
13. Lemke, H. & Lange, H. 1999 Is there a maternally induced immunological imprinting phase a la Konrad Lorenz? *Scand. J. Immunol* **50**, 348–354. (doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00620.x).
14. Lemke, H., Coutinho, A. & Lange, H. 2004 Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes. *Trends. Immunol* **25**, 180–186. (doi:10.1016/j.it.2004.02.007)
15. Anderson, R. W. 1995 On the maternal transmission of immunity: a ‘molecular attention’ hypothesis. *Bio Systems* **34**, 87–105. (doi:10.1016/0303-2647(94)01444-C)
16. Lundin B.S., Dahlman-Höglund, A., Pettersson, I., Dahlgren, U. I. H., Hanson, L. A., Telemo, E. 1999 Antibodies Given Orally in the Neonatal Period Can Affect the Immune Response for Two Generations: Evidence for Active Maternal Influence on the Newborn’s Immune System. *Scand. J. Immunol* **50**, 651–656. (doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00651.x)
17. Gasparini, J., McKoy, K. D., Staszewski, V., Haussy, C. & Boulinier, T. 2006 Dynamics of anti-Borrelia antibodies in Black legged Kittiwake (*Rissa tridactyla*) chicks suggest maternal educational effect. *Canadian Journal of Zoology* **84**, 623–627. (doi:10.1139/z06-024)

18. Grindstaff, J., Hasselquist, D., Nilsson, J-A., Sandell, M., Smith, H. G. & Stjernman, M. 2006 Transgenerational priming of immunity: maternal exposure to a bacterial antigenenhances offspring humoral immunity. *Proc. R. Soc. B* **273**, 2551–2557. (doi:10.1098/rspb.2006.3608)
19. Reid, J. M., Arcese, P., Keller, L. F. & Hasselquist, D. 2006 Long-term maternal effect on offspring immune response in song sparrows *Melospiza melodia*. *Biol. Lett.* **2**, 573–576. (doi:10.1098/rsbl.2006.0092)
20. Tanasa, R. I., Trad, A., Lange, H., Grötzingen, J., and Lemek, H. 2010 Allergen IgE-isotype-specific suppression by maternally derived monoclonal anti-IgG-idiotype. *Allergy* **65**, 16–23. (doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02104.x)
21. Jablonka, E., and Lamb, M. J. 1995 Epigenetic inheritance and evolution: the lamarckian dimension. Oxford: *Oxford University Press*.
22. Poulin, R. & Thomas, F. 2008. Epigenetic effects of infection on the phenotype of host offspring: parasites reaching across host generations. *Oikos*. **117**: 331–335. (doi:10. 1111/j.2007.0030-1299.16435.x)
23. Danchin, É. & Wagner, R. H. 2010 «Inclusive Heritability: Combining Genetic And Nongenetic Information To Study Animal Culture». *Oikos* **119**, 210-218. (doi:10.1111/j.1600-0706.2009.17640.x)
24. Bossdorf, O., Richards, C. L. and Pigliucci, M. 2008 Epigenetics for ecologists. *Ecol. Lett* **11**, 106-115.
25. Hasselquist, D., Wasson, M. F. & Winkler, D. W. 2001 Humoral immunocompetence correlates with date of egg-laying and reflects workload in female tree swallows. *Behav. Ecol* **12**, 93–97. (doi:10.1093/oxfordjournals.beheco.a000384)
26. Duffy, J. E., Carlson, E., Li, Y., Prophete, C. & Zelikoff, J. T. 2002 Impact of polychlorinatedbiphenyls (PCBs) on the immune function of fish: age as a variable in determining adverse outcome. *Mar. Environ. Res* **54**, 559–563. (doi:10.1016/S0141-1136(02)00176-9)
27. King, M.O., Owen, J.P., & Schwabl, H.G. 2010 Are maternal antibodies really that important? Patterns in the immunologic development of altricial passerine house sparrows (*Passer domesticus*). *PLOS One*. **5**, e9639 (doi:10.1371/journal.pone.0009639)
28. Dixon, F.J., Jacot-Guillarmod, H & McConahey, P.J. 1966 The antibody responses of rabbits and rats to hemocyanin. *J. Immunol* **97**, 350-355.

29. Jurincic-Winkler, C., Metz, K.A., Beuth, J., Sippel, J. & Klippel, K.F. 1995. Effect of keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bacillus Calmette-Guerin (BCG) instillation on carcinoma in situ of the urinary bladder. *Anticancer Res* **15**(6B), 2771–2776. PubMed: 8669862.
30. Ismail, A., Jacquin, L., Haussy, C., Legoupi, J., Perret, S., & Gasparini, J. 2013. Food availability and maternal immunization affect transfer and persistence of maternal antibodies in nestling pigeons. *PLOS. One* **8**(11): e79942. (doi: 10.1371/journal.pone.0079942)
31. Jacquin, L., Haussy, C., Bertin, C., Laroucau, K. & Gasparini, J. 2013 Darker females transmit more specific antibodies to their eggs than paler ones in feral pigeons. *Biological. J. Linn. Soc* **108**, 647–657. (doi:10.1111/bij.12001)
32. Müller, W., Groothuis, T. G. G., Kasprzik, A., Dijkstra, C., Alatalo, R. V. et Siitari, H. 2005 Prenatal androgen exposure modulates cellular and humoral immune function of black-headed gull chicks. *Proc. R. Soc. B* **272**, 1971-1977.
33. Ismail A., Jacquin L., Haussy C., Perret S., & Gasparini J. 2014. Food availability modulates the effects of maternal antibodies on growth and immunity in young feral pigeons. En préparation.
34. Boulinier T & Staszewski V 2008. Maternal transfer of antibodies: raising immunology issues. *Trends Ecol Evol*, **23**: 282-288.
35. Bitanihirwe, B. K., Peleg-Raibstein, D., Mouttet, F., Feldon, J., Meyer, U. 2010 Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **35**, 2462-2478. (doi: 10.1038/npp.2010.129).
36. Ito, H.T., Smith, S.E., Hsiao, E., Patterson, P.H., 2010 Maternal immune activation alters nonspatial information processing in the hippocampus of the adult offspring. *Brain, Behav. Immun* **24**, 930–941. (doi: 10.1016/j.bbi.2010.03.004)
37. Oh-Nishi, A., Obayashi, S., Sugihara, I., Minamimoto, T., Suhara, T., 2010 Maternal immune activation by polyriboinosinic–polyribocytidilic acid injection produces synaptic dysfunction but not neuronal loss in the hippocampus of juvenile rat offspring. *Brain Res* **1363**, 170-179. (doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.054)
38. Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., Shimizu, E., Ishikura, H., Iyo, M., 2006 Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of

- schizophrenia. Biological Psychiatry **59**, 546–554. (doi:10.1016/j.biopsych.2005.07.031).
39. Grindstaff, J. L., Brodie, E. D. III., & Ketterson, E. D. 2003 Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc. R. Soc. B* **270**, 2309–2320. (doi:10.1098/rspb.2003.2485).
40. Frésard, L., Morisson, M., Brun, J-M., Collin, A., Pain, B., Minvielle, F. and Pitel, F. 2013 Epigenetics and phenotypic variability: some interesting insights from birds. *Gene. Select. Evol* **45**, 16. (doi: 10.1186/1297-9686-45-16).
41. Sorci G, Faivre B (2009) Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **364**, 71-83.
42. Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B. and Sorci, G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Natur*, **161**, 367–379.

Table 1: Output of the best-fit generalized mixed models explaining variations in anti-KLH Ab levels of F2 chicks following two injections (at 21 and 35 days-old), as they age in interaction with the treatment of their F0 maternal grand-mothers.

Effects	DF	F	P
Age	8,248	103,13	<0.0001
Grand-mother treatment	1,248	2,26	0,13
Age x grand-mother treatment	8,248	2,89	0,004

Figure 1: Means \pm standard errors (SE) of anti-KLH Ab level in egg yolk laid by F1 daughters of KLH-injected (black bar) or sham-injected (open bar) F0 females.

Figure 2: Humoral immune response of F2 chicks over time following KLH injection at 21- and 35-days-old, measured by anti-KLH Ab level in relation to age for F2 chick that had a KLH-injected maternal grand-mothers (black dots) and chicks that had a sham-injected maternal grand-mothers (white dots).

Figure 1.

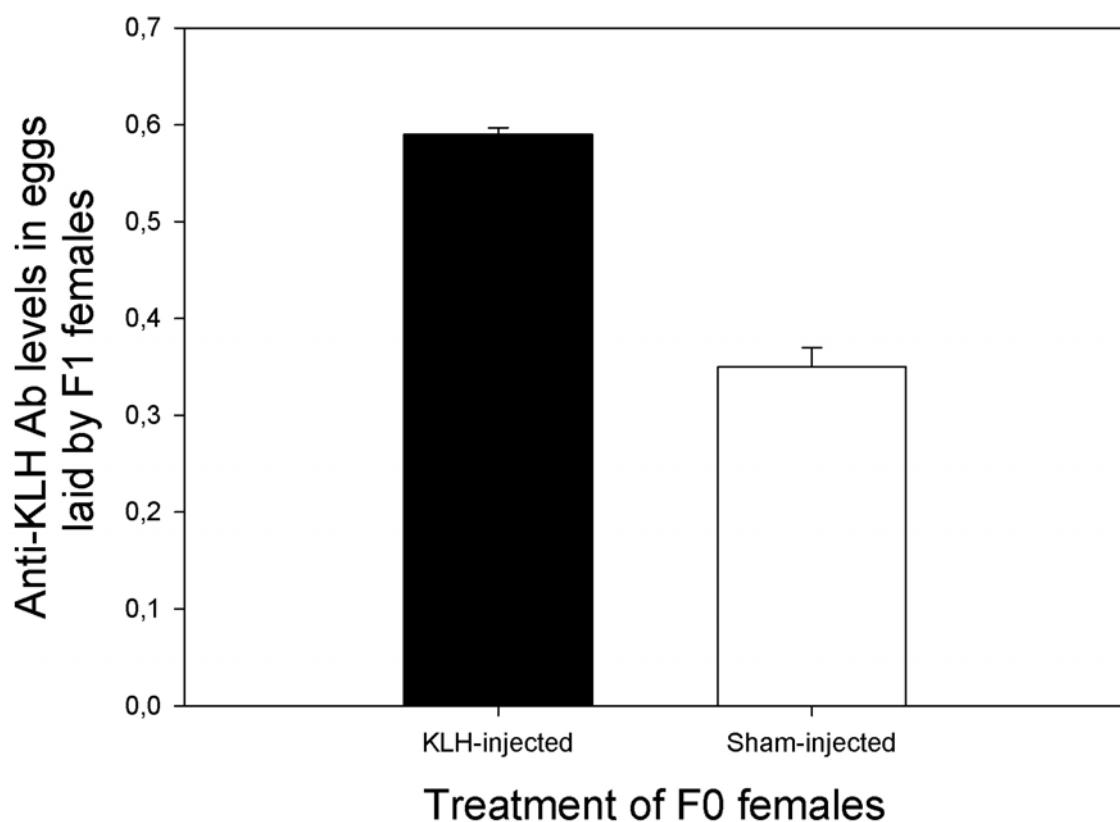
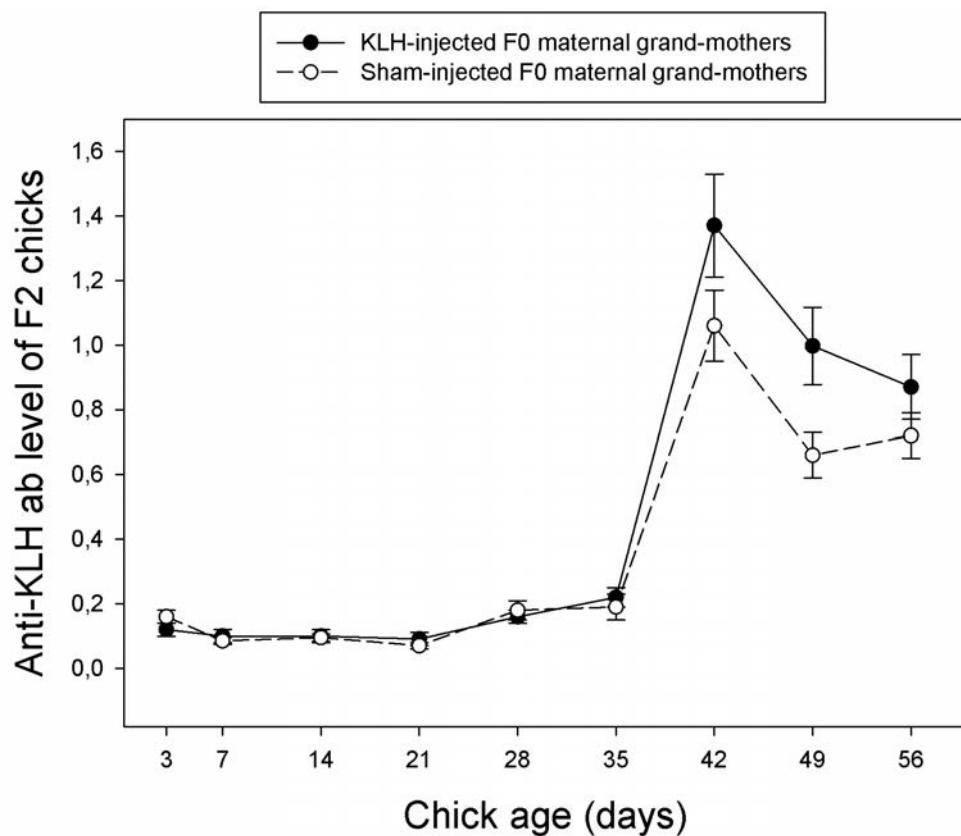


Figure 2



Résumé

Le transfert intergénérationnel de l'immunité est un phénomène dont l'étude remonte à une dizaine d'années. Chez les vertébrés, il prend la forme d'un transfert d'anticorps de la mère aux juvéniles. Pourtant, les processus écologiques et évolutifs du transfert sur plusieurs générations et la persistance des anticorps maternels chez les juvéniles n'ont pas été bien étudiés. Ce travail de thèse porte sur l'étude des mécanismes du transfert d'anticorps maternels sur plusieurs générations consécutives et leurs conséquences sur la réponse immunitaire et sur la croissance des juvéniles. En utilisant des approches expérimentales, j'ai pu dans un premier temps montrer que le transfert d'anticorps maternels était affecté par la disponibilité en nourriture dans l'environnement. De plus, nos résultats suggèrent que la persistance d'anticorps maternels dépend du niveau initial d'anticorps maternels présents chez le juvénile dans les premiers jours de vie. Dans un second temps, nous avons étudié la réponse immunitaire et la croissance des poussins en tentant de mettre en évidence comment les anticorps maternels influençaient le compromis entre ces deux paramètres physiologiques. Enfin, nos résultats suggèrent que les anticorps maternels pourraient être le messager intergénérationnel d'un effet épigénétique sur la réponse immunitaire. En effet, nous avons trouvé qu'une réponse immunitaire des grand-mères induite par l'exposition à un parasite stimule la réponse immunitaire des petits-enfants contre ce même parasite. Mes travaux de thèse soulignent une fois de plus l'importance du transfert de l'immunité dans l'écologie et l'évolution des interactions hôte-parasite.

Mots-clés : effets maternels, transfert et persistance des anticorps maternels, juvéniles, réponse immunitaire humorale, croissance, épigénétique.

Abstract

Intergenerational transfer of immunity is a phenomenon which started to be studied 10 years ago. In vertebrates, it takes the form of a transfer of antibodies from mothers to juveniles. However, the ecological and evolutionary processes of transfer across several generations and the persistence of maternals antibodies in chicks were not well studied. This thesis focuses on the study of the mechanisms of maternal antibodies transfer over several generations and on how they impact the immune response and growth in juveniles. By using experimental approaches, I first show that the transfer of maternal antibody was affected by food availability in the environment. In addition, our results suggest that the persistence of maternal antibodies depends on the initial level of maternal antibodies present in the nestlings in the first days of life. Secondly, we studied the immune response and growth of juvenile by trying to show how maternal antibodies may affect the resolution of the trade-off between these two physiological parameters. Finally, our results suggest that maternal antibodies would be a messenger of an epigenetic effect on immunit. Indeed, induced immune response in grand-mothers towards a pathogen has been found to stimulate the immune response of grand-children. My thesis emphasizes the importance of maternal transfer of immunity in the ecology and evolution of host-parasite.

Key-words: maternal effect, transfer and persistence of maternal antibodies, chick, humoral immune response, growth, epigenetic.