

Université de Montréal

Mesure fiable et rapide de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et de la DHEA-S sériques,
biomarqueurs de stress potentiels chez le narval (*Monodon monoceros*), à l'aide de techniques
immuno-enzymatiques

Par

Karine Béland

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences cliniques vétérinaires, option sciences cliniques

Janvier, 2022

© Karine Béland, 2022

Résumé

Le narval (*Monodon monoceros*) est une espèce emblématique de l'Arctique. Les narvals sont de plus en plus exposés à des perturbations anthropiques, pouvant augmenter leur niveau de stress et, par conséquent, avoir des impacts inconnus sur la dynamique de la population. La validation et l'étude de biomarqueurs de stress chronique pourraient donc améliorer les efforts de conservation chez cette espèce. La déhydroépiandrostérone (DHEA) et son métabolite sulfaté, la DHEA-S, sont collectivement appelés DHEA(S). Lorsque combinés sous forme de ratios avec le cortisol (cortisol/DHEA(S)), ils se sont révélés prometteurs dans l'évaluation du stress chronique chez les humains et certaines espèces animales domestiques ou sauvages. Au cours de projets de pose d'émetteurs en 2017 et 2018 dans la baie de Baffin, Nunavut, Canada, des narvals ($n = 14$) ont été échantillonnés au début et à la fin des manipulations. La DHEA(S) sérique a ensuite été mesurée à l'aide de deux techniques immuno-enzymatiques (ELISAs) développées pour les humains et disponibles commercialement. Une validation partielle des deux ELISAs a pu être réalisée par détermination du coefficient de variation intra-essai, confirmation de la linéarité de dilution de la DHEA(S) et calcul du pourcentage de récupération. La DHEA était également bien conservée dans le sérum de narvals suite à un stockage prolongé de 12 et 24 mois à -80°C , soulignant le potentiel d'analyse d'échantillons archivés. Les valeurs sériques moyennes ($\text{ng/ml} \pm \text{SEM}$) de cortisol, de DHEA(S) et des ratios cortisol/DHEA(S) au début et à la fin des manipulations respectivement étaient les suivantes : cortisol = $30,74 \pm 4,87$ et $41,83 \pm 4,83$; DHEA = $1,01 \pm 0,52$ et $0,99 \pm 0,50$; DHEA-S = $8,72 \pm 1,68$ et $7,70 \pm 1,02$; cortisol/DHEA = $75,43 \pm 24,35$ et $84,41 \pm 11,76$; cortisol/DHEA-S = $4,16 \pm 1,07$ et $6,14 \pm 1,00$). Le cortisol sérique et le ratio cortisol/DHEA-S étaient statistiquement plus élevés à la fin des manipulations ($P = 0,024$ et $P = 0,035$ respectivement). De plus, le cortisol sérique à la fin des manipulations était positivement corrélé à la longueur totale du corps de l'animal ($P = 0,042$) et avait tendance à être plus élevé chez les mâles ($P = 0,086$). Cette étude confirme que ces ELISAs sont une méthode d'analyse facile à réaliser, rapide et appropriée pour mesurer la DHEA(S) sérique chez le narval. La DHEA(S) sérique et les ratios cortisol/DHEA(S) représentent des biomarqueurs potentiels pour évaluer le stress chronique chez les narvals et possiblement chez d'autres espèces de cétacés.

Mots-clés : biomarqueur, cortisol, déhydroépiandrostérone, DHEA, DHEA-S, ELISA, *Monodon monoceros*, narval, stress, sulfate de déhydroépiandrostérone.

Abstract

Narwhals (*Monodon monoceros*) are an iconic Arctic species and are increasingly being exposed to anthropogenic disturbances that may increase their stress levels with unknown consequences for the overall population dynamics. The validation and measurement of chronic stress biomarkers could contribute towards an improved understanding and conservation efforts for this species. Dehydroepiandrosterone (DHEA), and its sulfated metabolite DHEA-S, are collectively referred to as DHEA(S). When serum DHEA(S) concentrations are combined in a ratio with cortisol (cortisol/DHEA(S)), it has shown promise for evaluating chronic stress in humans, domestic animals, and wildlife. During field tagging in 2017 and 2018 on Baffin Bay, Nunavut, Canada, wild narwhals ($n = 14$) were sampled at the beginning and end of capture-tagging procedures (acute stressor). Serum DHEA(S) were measured with commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) developed for humans. A partial validation of the assays was performed by determination of the intra-assay coefficient of variation, confirmation of the DHEA(S) dilutional linearity, and the calculation of the percentage of recovery. In addition, DHEA was conserved following extended storage at -80°C , highlighting the potential to analyze archival samples. Mean values ($\text{ng/mL} \pm \text{SEM}$) of narwhal serum cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios at the beginning and at the end of handling respectively are reported (cortisol = 30.74 ± 4.87 , 41.83 ± 4.83 ; DHEA = 1.01 ± 0.52 , 0.99 ± 0.50 ; DHEA-S = 8.72 ± 1.68 , 7.70 ± 1.02 ; cortisol/DHEA = 75.43 ± 24.35 , 84.41 ± 11.76 , and cortisol/DHEA-S = 4.16 ± 1.07 , 6.14 ± 1.00). Serum cortisol and cortisol/DHEA-S were statistically higher at the end of the capture ($P = 0.024$ and $P = 0.035$ respectively). Moreover, serum cortisol at the end of handling and prior to release was positively correlated to total body length ($P = 0.042$) and tended to be higher in males ($P = 0.086$). This study showed that these assays are easy to perform, rapid, and suitable for measuring serum DHEA(S) of narwhals and that serum DHEA(S) and calculated cortisol/DHEA(S) are potential biomarkers for chronic stress in narwhals and possibly other species of cetaceans, but this requires additional study.

Keywords: biomarker, cortisol, dehydroepiandrosterone, DHEA, DHEA-S, ELISA, *Monodon monoceros*, narwhal, stress, dehydroepiandrosterone sulfate.

Table des matières

Résumé	2
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures.....	8
Liste des sigles et abréviations	9
Remerciements	11
Introduction	12
Chapitre 1 – Revue de la littérature.....	14
1 – Le narval	14
1.1 Résumé de la biologie de l’espèce.....	14
1.2 Le statut et les menaces pesant sur l’espèce.....	15
2 – Résumé de la physiologie du stress chez les mammifères marins.....	16
3 – La DHEA, la DHEA-S et les ratios cortisol/DHEA(S) comme biomarqueurs de stress chez les mammifères marins	17
4 – Techniques de mesure de la DHEA et de la DHEA-S sériques.....	19
5 – La validation d’un ELISA chez une nouvelle espèce	21
Chapitre 2 – Article.....	24
ABSTRACT	25
INTRODUCTION	26
MATERIALS AND METHODS.....	28
RESULTS	32
DISCUSSION	33

CONCLUSION.....	37
ACKNOWLEDGEMENTS	38
LITTERATURE CITED.....	39
TABLES	45
FIGURES	47
Chapitre 3 – Discussion générale.....	51
Conclusion.....	56
Références bibliographiques	57
Annexe I : Photographie d'exemple de manipulations effectuées sur un des narvals de l'étude	66
Annexe II : Informations sur les narvals échantillonnés lors des saisons 2017 et 2018	67

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Catégories de réponses au stress chez les mammifères marins.....	16
Tableau 2. Avantages et limitations des techniques immunologiques et de la technique de LC-MS/MS.....	21
Tableau 3. Critères de validation additionnels pour la validation complète d'un ELISA.....	23

Chapitre 2

Table 1. Recovery rate of serum DHEA(S) in narwhals.....	45
Table 2. Values of serum cortisol, DHEA(S) and cortisol/DHEA(S) ratios in narwhals.....	46

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Voies de sécrétion du cortisol, de la DHEA et de la DHEA-S via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (figure tirée de Whitham et al., 2020, non-modifiée).....	18
Figure 2. Mode de fonctionnement des ELISAs compétitifs DHEA et DHEA-S	20

Chapitre 2

Figure 1. Dilutional linearity of serum DHEA(S) in narwhals.....	47
Figure 2. Cryopreservation of serum DHEA in narwhals.....	48
Figure 3. Correlation between serum cortisol and body length of narwhal at the end of the handling period.....	49
Figure 4. Effect of sex on serum cortisol between beginning and end of handling period.....	50

Liste des sigles et abréviations

ACTH : Hormone adrénocorticotrope

CQSAS : Centre québécois sur la santé des animaux sauvages

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHEA-S : Sulfate de déhydroépiandrostérone

DHEA(S) : Déhydroépiandrostérone (DHEA) et sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA-S)

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

LC-MS/MS : Liquid chromatography with tandem mass spectrometry

MPO : Pêches et Océans Canada

SEM : Standard error of the mean; erreur type

WWF : World Wildlife Fund

*À tous ces humains magnifiques qui ont croisé ma route au Nunavut,
ce territoire aux mille merveilles,
Nakurmiik.*

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de maîtrise, Marion Desmarchelier, pour être une mentore et une amie en or. Toutes mes excuses pour tous ces courts délais, qui t'auront sûrement donné quelques cheveux blancs supplémentaires. Je tiens aussi à remercier mon codirecteur de maîtrise et directeur de résidence, Stéphane Lair, qui m'aura envoyé travailler au plus bel endroit sur terre, avec le plus fascinant des mammifères marins et ce, deux fois plutôt qu'une. J'aimerais également remercier chaleureusement Mario Guay et Tristan Juette, pour leur aide inestimable avec les nombreuses analyses de laboratoire et les analyses statistiques, respectivement. Un énorme merci aussi au noyau dur du Centre québécois sur la santé des animaux sauvages (CQSAS), Kathleen Brown, Judith Viau et Viviane Casaubon pour leur support organisationnel, matériel et émotionnel sans bornes (et aussi pour leurs petites surprises dans mes bagages et pour les nouvelles bottes de pluie livrées en Arctique en catastrophe). Tous mes co-auteurs, je vous remercie du fond du cœur pour votre expertise précieuse et votre contribution respective, autant sur le terrain que pour l'article. Ce projet de recherche a été possible grâce à la généreuse contribution du Fonds pour la conservation des espèces de l'Arctique du World Wildlife Fund (WWF) et du Fonds du centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, de même que grâce à celle de Pêches et Océans Canada et de Golder Associates, qui ont subventionné mes déplacements et le travail sur le terrain. Un merci tout spécial à Brandon Laforest du WWF pour son support, sa patience et ses conseils toujours judicieux et pertinents. Cédric B. Larouche, merci pour ton soutien (et ta patience) sans fin avec mes « petits » problèmes de formatage. Finalement, un gigantesque merci à mon copain, Mathieu Harton, à mes parents et à mes amis précieux (vous saurez vous reconnaître) incluant tous mes co-résidents d'amour (Marion Jalenques, Juliette Raulic et Benjamin Lamglait) qui, depuis le début de cette longue aventure, m'endurent au quotidien, m'écoutent et me conseillent, me font rire et/ou attendent patiemment que j'aie terminé mes études depuis douze petites années. Je vous dis à bientôt !

Introduction

Les perturbations anthropiques affectent les populations d'animaux sauvages, y compris les cétacés. Une évaluation objective de leurs impacts est nécessaire pour la conservation des espèces (Atkinson et al., 2015; Dickens & Romero, 2013). Le narval est une espèce clé de l'Arctique et est essentiel à la subsistance de plusieurs communautés inuites. Le ministère des Pêches et des Océans du Canada (MPO) a le mandat de veiller à ce que la récolte canadienne de cette espèce soit durable et que la gestion de la chasse se fasse en collaboration avec les chasseurs inuits (COSEWIC, 2004). Un projet du MPO coordonne la capture et le marquage des narvals depuis plus de 30 ans dans la baie de Baffin, Nunavut, Canada (Dietz et al., 2001; Watt et al., 2015, Shuert et al., 2021). Récemment, cette zone a subi des changements environnementaux majeurs incluant le réchauffement climatique (Laidre & Heide-Jørgensen, 2005; Serreze & Stroeve, 2015), la présence accrue de prédateurs (Breed et al., 2017), l'industrie du tourisme en plein essor (navires de croisière) (Dawson et al., 2018) et la construction d'une mine associée à l'augmentation du trafic maritime et des bruits sous-marins (Baffinland, 2018; Halliday et al., 2022). Ces changements représentent donc une source de stress chronique potentiellement importante chez le narval et pourraient affecter sa capacité à maintenir l'homéostasie. Le cortisol est le biomarqueur le plus couramment utilisé pour évaluer le stress chez la faune, y compris les mammifères marins (Atkinson et al., 2015; Atkinson & Dierauf, 2018; Burgess et al., 2018; Sheriff et al., 2011; Thompson et al., 2014; Whitham et al., 2020). Plusieurs auteurs affirment que le cortisol ne reflète que partiellement la réponse physiologique au stress puisque plusieurs autres facteurs en sont aussi responsables (Atkinson et al., 2018; Gundlach et al., 2018; Haddad et al., 2002; Whitham et al., 2020). La déhydroépiandrostérone (DHEA) et son métabolite sulfaté, la DHEA-S, dénommées DHEA(S) lorsque combinées, sont des précurseurs d'hormones androgènes et tout comme le cortisol, sont sécrétées par les glandes surrénales suite à une stimulation par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). Alors que le cortisol est une hormone catabolique, la DHEA et la DHEA-S sont anaboliques et ont donc un rôle protecteur et régénérateur (Juster et al., 2010; Lennartsson et al., 2012). Les ratios cortisol/DHEA(S) représentent donc l'équilibre entre l'activité catabolique et anabolique (Juster et al., 2010; Lennartsson et al., 2012) et se sont révélés

prometteurs dans l'évaluation du stress chronique chez l'humain (Jeckel et al., 2010; Juster et al., 2010), les animaux domestiques (Almeida et al., 2008; Gundlach et al., 2017; Rondelli et al., 2015; Whitham et al., 2020) et la faune (Boonstra et al., 2008; Boonstra et al., 2014; Newman et al., 2013; Whitham et al., 2020; Wright et al., 2016), y compris certaines espèces de mammifères marins comme le phoque commun et le phoque gris (Gundlach et al., 2018). Ils constitueraient ainsi un outil très intéressant pour aider à différencier le stress aigu du stress chronique chez les narvals, qui sont soumis à toutes sortes de perturbations.

Chapitre 1 – Revue de la littérature

1 – Le narval

1.1 Résumé de la biologie de l'espèce

Le narval est un odontocète (baleine à dents) de taille moyenne de la famille des Monodontidae, qui ne comprend que deux espèces vivantes, soit le narval et le béluga (*Delphinapterus leucas*) (COSEWIC, 2004; Reeves et al., 2002). Les narvals vivent à longueur d'année dans les eaux froides de l'océan Arctique, tout comme la majorité des populations de bélugas et les baleines boréales (*Balaena mysticetus*) (Reeves et al., 2002). Une caractéristique physique distincte des narvals est leur peau blanche qui est tachetée de noir et qui pâlit au fur et à mesure que l'animal vieillit. Le narval est toutefois surtout connu pour sa longue défense torsadée et mythique pouvant mesurer plus de deux mètres, qui dérive de la canine supérieure gauche, la seule dent éruptée chez cette espèce. Cette défense est surtout exhibée par les mâles mais il arrive aussi qu'elle soit présente chez les femelles. À de rares occasions, on retrouvera deux défenses chez le même individu. Les narvals n'ont pas de nageoire dorsale mais possèdent plutôt une crête dorsale, qui leur confère un avantage considérable pour briser la glace qui se forme à la surface de l'eau. La migration des narvals est par ailleurs rythmée par la formation de ces glaces. À l'hiver, les narvals se retrouvent dans des zones d'hivernage au large où les eaux sont plus agitées et les glaces moins entassées et constamment en mouvement, leur offrant ainsi des endroits plus sûrs pour respirer. Au printemps, les narvals suivent les fissures se formant dans la banquise pour retrouver les bras de mer et les fjords qu'ils fréquentent pendant l'été et au début de l'automne (COSEWIC, 2004; Reeves et al., 2002). Par ailleurs, les populations connues de narvals sont désignées par leur répartition d'estivage. Les narvals échantillonnés dans le cadre de ce projet de recherche font partie de la population de la baie de Baffin (COSEWIC, 2004). Les narvals sont carnivores et se nourrissent d'une variété de proies, notamment de morues polaires (*Boreogadus saida*), de flétans du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*) et d'invertébrés incluant des calmars (COSEWIC, 2004; Reeves et al., 2002) et des crevettes (Reeves et al., 2002). Leurs principaux

prédateurs sont les humains et dans une nette moindre mesure, les épaulards (*Orcinus orca*) et les ours blancs (*Ursus maritimus*) (COSEWIC, 2004; Reeves et al., 2002).

1.2 Le statut et les menaces pesant sur l'espèce

Les narvals sont inscrits à l'Annexe II de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES), désignant les « *espèces qui, bien que n'étant pas nécessairement menacées actuellement d'extinction, pourraient le devenir si le commerce de leurs spécimens n'était pas étroitement contrôlé* » (COSEWIC, 2004). Au Canada, la situation du narval est considérée comme étant préoccupante, soit une « *espèce sauvage qui peut devenir une espèce menacée ou en voie de disparition en raison de l'effet cumulatif de ses caractéristiques biologiques et des menaces reconnues qui pèsent sur elle* », par le Comité sur la situation des espèces en péril au Canada (COSEPAC) (COSEWIC, 2004). L'espèce est essentielle à la subsistance de plusieurs communautés inuites, fournissant une nourriture culturellement importante sous forme d'aliments traditionnels et des revenus supplémentaires pour la vente des défenses. Au Canada, la chasse durable de ce mammifère marin est gérée par Pêches et Océans Canada et différentes organisations inuites, notamment le Conseil de gestion des ressources fauniques du Nunavut et différentes organisations de chasseurs et trappeurs sur le territoire (COSEWIC, 2004). Dans la Baie de Baffin au Nunavut, le MPO coordonne également un programme de capture et de pose d'émetteurs chez cette espèce depuis 30 ans (Dietz et al., 2001; Watt et al., 2015, Shuert et al., 2021) afin d'acquérir une meilleure compréhension de la biologie et de l'écologie du narval, incluant sa répartition, ses déplacements et ses comportements en plongée. En plus du réchauffement climatique de l'Arctique et de la réduction de la couverture de glace (Laidre et Heide-Jørgensen, 2005; Serreze et Stroeve, 2015), d'autres changements importants s'opèrent et menacent les narvals, notamment une présence accrue d'épaulards (Breed et al., 2017), une industrie touristique en croissance avec un trafic accru de navires de croisière (Dawson et al., 2018) et une augmentation des activités industrielles, notamment via la pêche commerciale (COSEWIC, 2004) et le transport de ressources naturelles qui augmentent considérablement le trafic maritime et le bruit sous-marin (Baffinland, 2018 ; Halliday et al., 2022). Il existe, à ce jour, une quantité très limitée d'informations dans la littérature concernant la santé et les conditions pathologiques pouvant affecter les narvals (COSEWIC, 2004).

2 – Résumé de la physiologie du stress chez les mammifères marins

Les facteurs de stress peuvent être caractérisés comme étant internes (par exemple, maladie ou période de reproduction) ou externes (par exemple, facteurs environnementaux et anthropiques), prédictibles ou imprévisibles et aigus ou chroniques (Atkinson et Dierauf, 2018; Atkinson et al., 2015; Boonstra et al., 2014; Sheriff et al., 2014). La réponse globale à ces facteurs de stress chez les mammifères marins dépendra de quatre grandes catégories de réponses se chevauchant, soit les réponses neurologique, endocrine, physiologique et immunologique (Tableau 1 ci-bas) (Atkinson et Dierauf, 2018).

Types de réponse	Augmentation	Diminution
Neurologique	<ul style="list-style-type: none"> - Activité du système nerveux sympathique - Activité des récepteurs β- et α-adrénergiques - Sécrétion de corticolibérine - Sécrétion de neurotransmetteurs 	<ul style="list-style-type: none"> - Sécrétion de l'hormone thyrotrope
Endocrine	<ul style="list-style-type: none"> - Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien - Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone 	<ul style="list-style-type: none"> - Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien - Sécrétion de la gonadolibérine - Sécrétion de la somatotropine
Physiologique	<ul style="list-style-type: none"> - Taux métabolique - Consommation d'oxygène - Production d'acides gras - Gluconéogenèse - Rétention du sodium - Diurèse 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux métabolique
Immunologique	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse inflammatoire - Réponse immunitaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse inflammatoire - Réponse immunitaire

Tableau 1. – Catégories de réponses au stress chez les mammifères marins

L'objectif de cette réponse physiologique au stress est d'assurer une réaction rapide pour maintenir l'homéostasie. En conditions dites normales, la réponse globale au stress permet à un animal de répondre adéquatement à un événement stressant donné. Néanmoins, en cas de stress chronique et/ou sévère, ces réponses peuvent être modifiées et l'animal pourrait ne plus être en mesure de réagir au stress correctement, altérant ainsi ses capacités d'adaptation (Atkinson et

Dierauf, 2018; Atkinson et al., 2015; Boonstra et al., 2014; Sheriff et al., 2014). De nombreux biomarqueurs de stress peuvent aider à évaluer cette réponse chez un individu donné et même au sein d'une population. Néanmoins, un des défis majeurs à l'étude des biomarqueurs de stress chez les animaux sauvages est l'obtention de valeurs de référence d'individus « non-stressés » (en conditions normales) puisque l'échantillonnage requiert souvent une capture, qui représente un stress aigu intense (Atkinson et Dierauf, 2018; Atkinson et al., 2015; Boonstra et al., 2014; Sheriff et al., 2014). Chez les mammifères marins, à ce défi déjà colossal, s'ajoute la difficulté de capturer, d'immobiliser de manière sécuritaire et d'échantillonner des individus en conditions environnementales hostiles (Atkinson et Dierauf, 2018; Atkinson et al., 2015).

3 – La DHEA, la DHEA-S et les ratios cortisol/DHEA(S) comme biomarqueurs de stress chez les mammifères marins

Le biomarqueur le plus fréquemment utilisé pour évaluer la réponse physiologique au stress chez la faune, incluant chez les mammifères marins, est le cortisol (Atkinson et al, 2015; Atkinson & Dierauf, 2018; Burgess et al., 2018; Sheriff et al., 2011; Thompson et al., 2014; Whitham et al., 2020). Toutefois, plusieurs scientifiques émettent des réserves en ce qui concerne l'utilisation du cortisol sérique comme biomarqueur de stress unique puisqu'il ne reflète que partiellement la réponse physiologique globale au stress (Atkinson et al., 2018; Gundlach et al., 2018; Haddad et al., 2002; Whitham et al., 2020). La déhydroépiandrosterone (DHEA) et son métabolite sulfaté (DHEA-S) sont des précurseurs d'hormones androgènes. Bien que le cortisol et la DHEA(S) soient trois hormones sécrétées par le cortex surrénalien suite à une stimulation par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), le cortisol est une hormone catabolique alors que la DHEA et la DHEA-S sont des hormones anaboliques ayant un rôle de protection et de régénération (Juster et al., 2010; Lennartsson et al., 2012) (Figure 1). En effet, il a été démontré chez les humains que la DHEA et la DHEA-S ont des effets neuroprotecteur, antioxydant, anti-inflammatoire et anti-glucocorticoïde (Juster et al., 2010; Lennartsson et al., 2012). Les ratios cortisol/DHEA(S) représentent donc un équilibre entre les activités anaboliques et cataboliques (Lennartsson et al., 2012). La DHEA, DHEA-S et les ratios cortisol/DHEA(S) semblent ainsi prometteurs pour l'évaluation de la réponse physiologique au stress chronique chez les humains (Jeckel et al., 2010;

Juster et al., 2010), les animaux domestiques de compagnie ou de production (Almeida et al., 2008; Gundlach et al., 2017; Rondelli et al., 2015; Whitham et al., 2020), et les animaux de la faune (Boonstra et al., 2008; Boonstra et al., 2014; Newman et al., 2013; Whitham et al., 2020; Wright et al., 2016), incluant les mammifères marins. Une étude chez les phoques communs (*Phoca vitulina*) et les phoques gris (*Halichoerus grypus*) a, par ailleurs, été récemment publiée (Gundlach et al., 2018). Puisque les ratios cortisol/DHEA(S) sont généralement plus élevés chez les animaux chroniquement stressés, la DHEA, la DHEA-S et les ratios cortisol/DHEA(S) ont le potentiel de différencier les réponses physiologiques issues d'un stress aigu versus d'un stress chronique. En effet, un stress chronique entraînerait un dérèglement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien menant à une diminution de la DHEA et de la DHEA-S et donc à une augmentation des ratios cortisol/DHEA(S) (Almeida et al., 2008; Gundlach et al., 2018; Jeckel et al., 2010; Lennartsson et al., 2013a; Lennartsson et al., 2013c; Whitham et al., 2020).

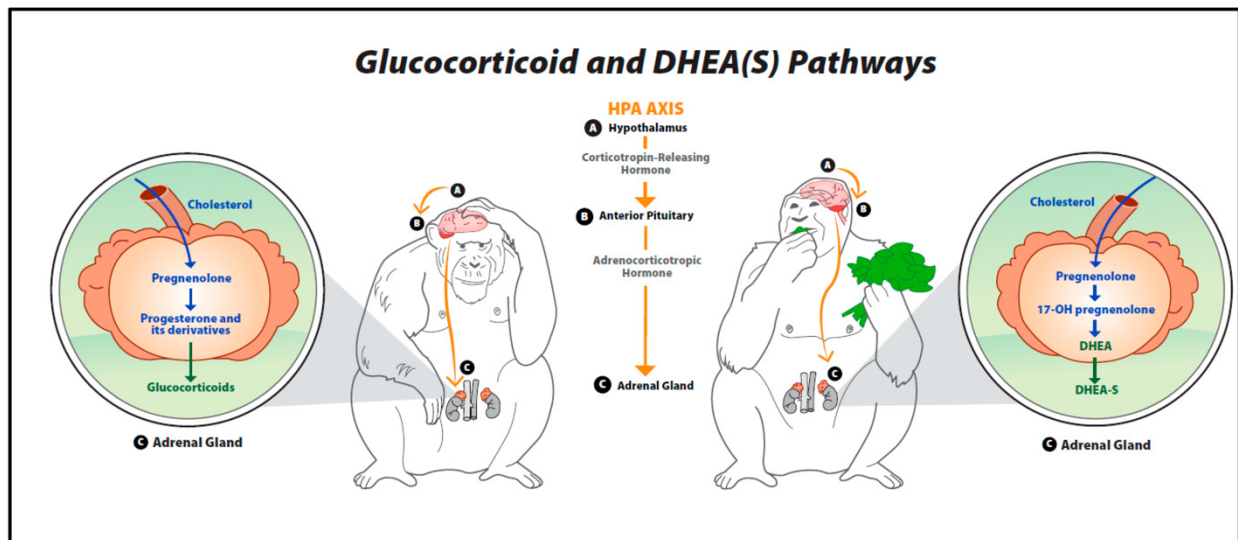


Figure 1. – Voies de sécrétion du cortisol, de la DHEA et de la DHEA-S via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (figure tirée de Whitham et al., 2020, non-modifiée)

L'étude récente de Gundlach et al. (2018) a comparé cette réponse physiologique chez trois groupes de phoques soumis au même stress aigu, soit la contention et le prélèvement sanguin. Le premier groupe était constitué de phoques considérés sains et gardés en institutions zoologiques, le second d'individus sauvages considérés en bonne santé et le troisième, de

phoques sauvages malades et donc considérés sous l'effet d'un stress chronique. En accord avec ce qui a été discuté ci-haut, les conclusions de l'étude ont mis en évidence que les concentrations sériques de DHEA étaient statistiquement plus faibles et les ratios cortisol/DHEA statistiquement plus élevés chez les phoques sauvages malades par rapport aux phoques gardés en institutions zoologiques et aux phoques sauvages considérés en bonne santé (groupes d'individus seulement sous l'effet d'un stress aigu) (Gundlach et al., 2018).

4 – Techniques de mesure de la DHEA et de la DHEA-S sériques

Les techniques de laboratoire les plus fréquemment utilisées pour mesurer la DHEA et la DHEA-S sériques en médecine vétérinaire et en sciences biologiques sont les techniques immunologiques (immuno-enzymatiques et radio-immunologiques). Ces dernières sont basées sur le même principe, soit la détection de la DHEA et de la DHEA-S à l'aide d'anticorps. Ces deux techniques diffèrent de par la façon dont les réactions antigènes-anticorps sont mesurées, soit à l'aide d'une réaction enzymatique et de la mesure de son absorbance lors d'un test immuno-enzymatique ou à l'aide d'isotopes radioactifs et de la mesure de la radiation gamma lors d'un test radio-immunologique. Puisque les techniques immuno-enzymatiques ne nécessitent pas l'utilisation de composés radioactifs, requièrent du matériel de laboratoire moins spécialisés et qu'aucun permis spécial n'est nécessaire pour leur utilisation, elles sont plus fréquemment utilisées (Whitham et al., 2020). Différents types d'ELISAs sont disponibles sur le marché (direct, indirect et sandwich), de même que les ELISAs de type compétitif tels qu'utilisés dans ce projet de recherche (Figure 2).

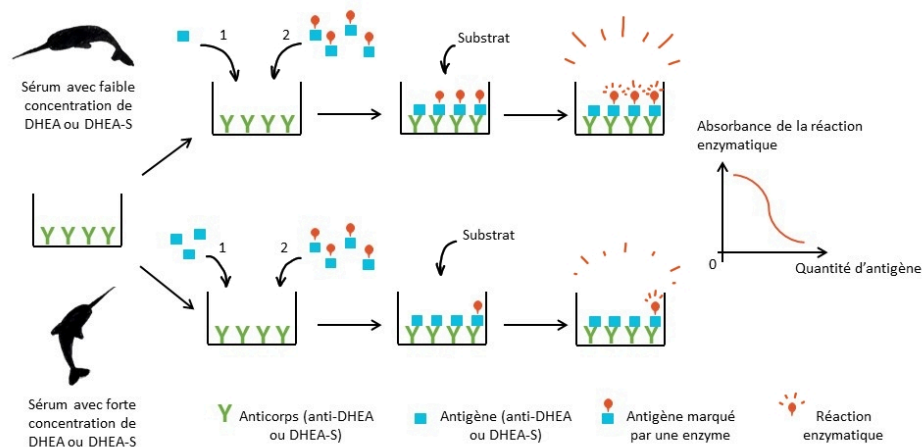


Figure 2. – Mode de fonctionnement des ELISAs compétitifs DHEA et DHEA-S

©Marion Jalenques

Brièvement, les ELISAs de type compétitif pour la mesure de la DHEA et de la DHEA-S consistent à lier des anticorps anti-DHEA ou anti-DHEA-S à une microplaque. La matrice (sérum de l'espèce d'intérêt) est ensuite ajoutée et suivie d'un conjugué contenant un antigène marqué par une enzyme. La DHEA ou la DHEA-S contenues dans l'échantillon sérique de l'espèce d'intérêt ira donc se lier préférentiellement aux anticorps anti-DHEA ou anti-DHEA-S de la microplaque. Suite à un lavage, on ajoutera le conjugué contenant des antigènes marqués par une enzyme, qui se lie à son tour, aux anticorps anti-DHEA ou anti-DHEA-S toujours libres sur la microplaque. Finalement, suite à l'ajout d'un substrat activant les réactions enzymatiques, l'absorbance de ces réactions est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration sérique de la DHEA ou de la DHEA-S dans la matrice testée.

En médecine humaine principalement, en plus des techniques immunologiques citées ci-haut, la DHEA et la DHEA-S sont de plus en plus fréquemment mesurées à l'aide d'une combinaison de chromatographie en phase liquide et de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (Keevil, 2016). Cette technique est bien décrite dans la littérature (Hoofnagle et Wener, 2009; Keevil, 2016) et ne sera pas abordée en détails dans cet ouvrage. Les avantages et les limites de la

technique de LC-MS/MS, de même que celles des techniques immunologiques sont présentées dans le tableau 2 qui suit (Cross et Hornshaw, 2016; Hoofnagle et Wener, 2009; Keevil, 2016).

	Techniques immunologiques	Technique LC-MS/MS
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Facile d'utilisation - Acceptabilité dans la communauté scientifique - Coût de l'équipement de départ - Débit d'analyses - Sensibilité 	<ul style="list-style-type: none"> - Sélectivité - Sensibilité - Débit d'analyses - Volume d'échantillon nécessaire (< 5 µl) - Coût d'analyse par échantillon - Reproductibilité - Multiplexage
Limitations	<ul style="list-style-type: none"> - Sélectivité - Détection des analytes - Volume d'échantillon nécessaire (100-200 µl) - Coût d'analyse par échantillon - Reproductibilité - Multiplexage - Durée de l'analyse 	<ul style="list-style-type: none"> - Coût de l'équipement de départ - Complexité d'utilisation - Complexité des échantillons

Tableau 2. – Avantages et limitations des techniques immunologiques et de la technique de LC-MS/MS

5 – La validation d'un ELISA chez une nouvelle espèce

L'utilisation de test ELISA chez une nouvelle espèce devrait être soumise à une validation complète au préalable (Andreasson et al., 2015; European Medicines Agency, 2011). Dans le cadre de ce projet de recherche, seulement une validation partielle était possible, et ce, pour différentes raisons abordées dans la discussion. Néanmoins, dans le cas d'un test ELISA déjà validé et commercialisé pour une autre espèce, une validation partielle est acceptable (European Medicines Agency, 2011). Il est donc fréquent dans la littérature vétérinaire et plus généralement, biologique d'y retrouver des validations partielles (Bienboire-Frosini et al., 2017; Boonstra et al., 2008; Edes et al., 2018b; Fokidis, 2016; Gundlach et al., 2017; Gundlach et al., 2018; Newman et al., 2008). Trois méthodes de validation partielle d'un test ELISA ont été décrites par Andreasson et collaborateurs (Andreasson et al., 2015). Elles peuvent être résumées comme suit :

Pourcentage de variation intra-essai : Pour calculer le pourcentage de variation, le ou les mêmes échantillons sont testés à plusieurs reprises puis le pourcentage de variation entre les résultats obtenus pour un même échantillon est calculé. Celui-ci doit être de moins de 20 % pour la validation.

Linéarité de dilution : Un échantillon enrichi dont on connaît la concentration de la molécule d'intérêt est ajouté à une matrice. La concentration de cette molécule d'intérêt a préalablement été mesurée dans la matrice. Ensuite, différentes dilutions du mélange sont réalisées puis les concentrations sont mesurées à nouveau. Les résultats obtenus et ceux attendus soit, la concentration de la matrice et la concentration de l'échantillon enrichi, sont ensuite comparés entre eux. Afin qu'un ELISA soit validé, cette corrélation doit être linéaire.

Pourcentage de récupération : À partir des mêmes dilutions utilisées pour la linéarité de dilution, le pourcentage de récupération est calculé à l'aide de la formule ci-bas. Ce pourcentage de récupération doit se situer entre 80 et 120 %.

$$\frac{\text{Valeur obtenue du sérum enrichi} - \text{Valeur obtenue du sérum standard}}{\text{Valeur attendue du sérum enrichi obtenue}} \times 100$$

De plus, les mêmes auteurs (Andreasson et al., 2015) ainsi que l'Agence européenne des médicaments (European Medicines Agency, 2011) proposent l'évaluation de plusieurs critères de validation additionnels résumés dans le tableau 3.

Critères	Brèves descriptions
Robustesse	Capacité d'un test diagnostique à ne pas être perturbé malgré de légères variations dans les conditions expérimentales.
Exactitude	Capacité d'un test diagnostique à fournir des résultats comparables à ceux obtenus avec une méthode de référence.
Incertitude	Marge d'erreur attendue lors de l'utilisation d'un test diagnostique donné.
Limites de quantification	Les concentrations les plus basses et les plus élevées mesurables avec exactitude par un test diagnostique donné.
Parallélisme	Comparaison entre la capacité d'un test diagnostique à mesurer un analyte donné dans une matrice par rapport à l'analyte dans un calibre.
Sélectivité	L'habileté d'un test diagnostique à mesurer l'analyte cible adéquatement en présence d'autres analytes.
Stabilité	La stabilité d'un analyte donné soumis à des conditions et des délais d'analyse différents.

Tableau 3. – Critères de validation additionnels pour la validation complète d'un ELISA

Chapitre 2 – Article

RAPID AND RELIABLE SERUM DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) AND DHEA-S MEASUREMENT IN NARWHALS (*MONODON MONOCEROS*) USING AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE

Karine Béland, DMV, IPSAV, DES, Stéphane Lair, DMV, DES, DVSc, DACZM, Mario Guay, DEC (Medical biology), Tristan Juette, PhD, Christian Bédard, DMV, MSc, DACVP, Sandra R. Black, BSc, DVM, Dip. Path., Marianne Marcoux, PhD, Cortney A. Watt, PhD, Nigel E. Hussey, PhD, and Marion Desmarchelier, DMV, MSc, DACZM, DECZM (Zoo Health Management), DACVB

From the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St. Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada (Béland, Lair, Guay, Juette, Bédard, and Desmarchelier); Faculty of veterinary medicine, University of Calgary, 3280 Hospital Drive NW, Calgary, Alberta T2N 4Z6, Canada (Black); Freshwater Institute, Fisheries and Oceans Canada, 501 University Crescent, Winnipeg, Manitoba R3T 2N6, Canada (Marcoux and Watt); Department of Integrative Biology, University of Windsor, 401 Sunset Avenue, Windsor, Ontario N9B 3P4, Canada (Hussey). Correspondence should be directed to Dr. Marion Desmarchelier (marion.desmarchelier@umontreal.ca).

ABSTRACT

Narwhals (*Monodon monoceros*) are an iconic Arctic species and are increasingly exposed to anthropogenic disturbances that may increase their stress levels with unknown consequences for the overall population dynamics. The validation and measurement of chronic stress biomarkers could contribute towards improved understanding and conservation efforts for this species. Dehydroepiandrosterone (DHEA), and its sulfated metabolite DHEA-S, are collectively referred to as DHEA(S). When serum DHEA(S) concentrations are combined in a ratio with cortisol (cortisol/DHEA(S)), it has been shown to be a promising indicator of chronic stress in humans, domestic animals, and wildlife. During field tagging in 2017 and 2018 in Baffin Bay, Nunavut, Canada, wild narwhals ($n = 14$) were sampled at the beginning and end of the capture-tagging procedures (acute stressor). Serum DHEA(S) were measured with commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) developed for humans. A partial validation of the ELISA assays was performed by the determination of the intra-assay coefficient of variation, confirmation of the DHEA(S) dilutional linearity, and the calculation of the percentage of recovery. In addition, DHEA was conserved following extended storage at -80°C , highlighting the potential to analyze archival samples. Mean values ($\text{ng/mL} \pm \text{SEM}$) of narwhal serum cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios at the beginning and at the end of handling respectively are reported (cortisol = 30.74 ± 4.87 , 41.83 ± 4.83 ; DHEA = 1.01 ± 0.52 , 0.99 ± 0.50 ; DHEA-S = 8.72 ± 1.68 , 7.70 ± 1.02 ; cortisol/DHEA = 75.43 ± 24.35 , 84.41 ± 11.76 , and cortisol/DHEA-S = 4.16 ± 1.07 , 6.14 ± 1.00). Serum cortisol and cortisol/DHEA-S were statistically higher at the end of the capture ($P = 0.024$ and $P = 0.035$ respectively). Moreover, serum cortisol at the end of handling was positively correlated to total body length ($P = 0.042$) and tended to be higher in males ($P = 0.086$). This study showed that these assays are easy to perform, rapid, and suitable for measuring serum DHEA(S) of narwhals, and that serum DHEA(S) and calculated cortisol/DHEA(S) are potential biomarkers for chronic stress in narwhals and possibly other cetaceans, but this requires additional study.

INTRODUCTION

Anthropogenic disturbances are increasingly known to impact wildlife populations, including whales. Objectively assessing anthropogenic impacts is necessary for species conservation.^{3,14} The narwhal (*Monodon monoceros*) is an iconic species of the Arctic ecosystem. This species is essential for the subsistence of several Inuit communities,¹¹ providing a culturally important food resource. In Canada, the sustainable hunt of narwhals is co-managed by the Department of Fisheries and Oceans Canada (DFO) and Inuit stakeholders.¹¹ The DFO has been coordinating a live capture and tagging program for this species for 30 years in Baffin Bay, Nunavut, Canada^{15,47,53} to gain a better understanding of narwhal biology and ecology, including information on their distribution, diving behavior, and movement, to inform management.

In addition to general climatic warming trends in the Arctic and reducing sea ice coverage,^{32,33,45} other significant changes that may affect narwhal populations are underway. These include, amongst others, the increased presence of predatory killer whales (*Orcinus orca*),¹⁰ a growing tourism industry with increasing cruise ship traffic,¹² and shipping of natural resources that significantly increases shipping traffic and underwater noise.^{5,24} These anthropogenically induced changes may represent extrinsic stressors for the narwhal population. The assessment of the impact of cumulative stressors at both an individual and population levels remains a challenge for management, impact assessment, and conservation of vulnerable species.

Cortisol, a glucocorticoid, is the most commonly reported biomarker used for measuring levels of physiological stress responses in wildlife, including marine mammals.^{3,4,9,46,51,56} However, several authors have cautioned over relying on the use of cortisol as the only indicator of the stress response as it only partially reflects the global physiological response to a stressful event.^{3,21,22,56} Although cortisol has been shown to be elevated in narwhal blubber after several days of being entrapped in ice (chronically stressed animals) when compared to free-swimming animals (“unstressed” narwhals under normal environmental conditions),⁵⁴ additional parameters could increase the accuracy of quantifying their chronic stress responses.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated metabolite, DHEA-S, collectively referred to as DHEA(S) are androgen hormones precursors. While cortisol and DHEA(S) are all secreted by the adrenal cortex following adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation, cortisol is a catabolic hormone, in contrast with DHEA(S) which are anabolic hormones and have a protective and regenerative role.^{29,34} Dehydroepiandrosterone and DHEA-S have been reported to have neuroprotective, antioxidative, anti-inflammatory, and anti-glucocorticoid effects in humans.^{29,34} The ratio of serum cortisol concentrations to DHEA(S) has also been reported to represent the balance between catabolic and anabolic activity.³⁴ Serum DHEA, DHEA-S, and cortisol to DHEA(S) ratios have shown promise in evaluating physiological responses to chronic exposure to stressors in humans,^{28,29} domestic animals,^{1,20,44,56} and wildlife,^{7,8,38,56,57} including marine mammal species such as harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*).²¹ Since the cortisol/DHEA(S) ratios are generally higher in chronically stressed animals, DHEA(S) and cortisol/DHEA(S) ratios have the potential to discriminate acute from chronic stress responses. The physiological phenomenon of chronic stress seems to be the result of a dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis leading to chronically decreased DHEA(S).^{1,21,28,35,36,56}

Given recognition of the need for additional biomarkers to measure chronic stress in marine mammals, the objectives of the current study were twofold: firstly, we aimed to 1) validate narwhal serum DHEA(S) measurements using two rapid and commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) originally developed for humans and 2) determine the stability of serum DHEA in frozen samples, after 12 and 24 months of freezing at -80°C. We hypothesized that the commercially available human ELISA we employed is reliable for measuring serum DHEA(S) in narwhal, and that the serum DHEA values would be similar for a given sample after 12 and 24 months of freezing at -80°C. Secondly, if ELISA measurements were proven reliable, we aimed to assess their relevance by comparing values of serum cortisol measured by chemiluminescence, of DHEA(S) measured by ELISA and of calculated cortisol/DHEA(S) ratios between the beginning and the end of the handling period and the correlation of these stress hormones with sex, body length, and total handling time.

MATERIALS AND METHODS

Study sites and captures

During the 2017 and 2018 field seasons (July to September), narwhals were captured as part of the DFO tagging program in Tremblay Sound, Nunavut, Canada (72° 22'N 81° 06'W). All procedures were approved by the Freshwater Institute Animal Care Committee operating under the auspices of the Canadian Council on Animal Care (#ACC-2017-44 and #ACC-2018-22). The capture of narwhals was performed following previously described protocols.^{25,41} In brief, narwhals were captured using a 50 m x 10 m gillnet tied perpendicularly to the shore with an anchor at the deep end and six buoys attached at set intervals along the net. The net and the surrounding waters were then continuously monitored by two observers. When a narwhal became entangled in the net, the animal was secured at the surface by a team in an inflatable motorboat. The captured narwhal was then restrained with hoop nets and a tail rope, maintaining the blowhole out of the water. A second boat team detach the net from the anchor line so the narwhal and the capture boats could be pulled to shore. On average, less than five minutes was required to complete the beaching of the narwhal. Individual narwhals were then safely disentangled from the net and manually held in shallow water, head facing to open water, by four to six handlers (Annex I).

Monitoring and physical data collection

For each individual, the following parameters were recorded: sex, various direct morphometric measurements including girth, body and tusk length, as well as fluke width, presence of skin anomalies or wounds, and presence of scars characteristic of previous injuries. During the handling period, individual narwhals were monitored continuously by a veterinarian with the support of trained handlers. Various physiological parameters, such as general behavior including tail-kicks, roll attempts, and vocalizations, respiratory rate, expired CO₂, heart rate, and blood gases at the beginning and at the end of handling, were monitored and documented. The beginning of handling corresponded to the time where the narwhals were near the shore, entangled and safe to handle. The end of handling corresponded to the moment prior to the

release. The total handling time of narwhals was also documented and corresponded to the interval between its capture in the net and the release of the narwhal.

Sample collection and preparation

Blood was drawn from the ventral or dorsal fluke veins with a 19 gauge ¼ inch butterfly attached to a 20 mL syringe and transferred to a 3 mL EDTA tube, a 3 mL heparinized tube, and a 10 mL separator dry tube. Blood smears were immediately made on site and blood gases were analyzed at the beginning and end of handling using a VetScan i-STAT 1 (Abbott Point-of-care Inc., Princeton, New Jersey, 08540, USA). Dry and heparinized tubes were centrifuged for 10 minutes at 1000g and plasma and serum were aliquoted into 1.25 mL cryovials and stored at -20°C in the field for five days to three weeks before being transferred to a -80°C freezer immediately upon return from the field.

Stress hormone analysis

The use of the narwhal banked serum was approved by the Université de Montréal's Animal Use Ethics Committee operating under the auspices of the Canadian Council on Animal Care (#21-Rech-2060). Serum was stored at -80°C for one to three years prior to analysis. Dehydroepiandrosterone and DHEA-S were analyzed with commercial competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (CAN-DHS-490 and CAN-DHS-480 respectively, Diagnostic Biochem Canada Inc., London, Ontario, N6M 1A1, Canada) in accordance with the manufacturer's instructions. The reported limit of detection (LoD) was 0.15 ng/mL for the DHEA ELISA kit and the percentage of cross reactivity with other hormones was generally very low (between 0.05 % with DHEA-S and 0.61 % with androstenedione), except for epiandrosterone, which was 4.56 %. The reported sensitivity for the DHEA-S ELISA kit was of 5.0 ng/mL and percentage of cross reactivity with other hormones was generally very low (from 0.001 % with estrone and 1.7 % with androstenedione) but was the highest for androsterone (16.0 %). A comprehensive list of hormones and their cross-reactivity with these DHEA(S) ELISA kits, and other details are available on the manufacturer website (<https://dbc-labs.com/wp-content/uploads/pdfs/DHEA-ELISA.pdf>, <https://dbc-labs.com/wp-content/uploads/pdfs/DHEAS-ELISA.pdf>). Based on the manufacturer's instructions, serum cortisol levels were measured with a solid-phase, competitive

chemiluminescence enzyme immunoassay (IMMULITE® 1000, Siemens Healthcare Limited, Oakville, Ontario, L6H 0H6, Canada). The reported analytical sensitivity for this assay was of 2.0 ng/mL (<http://www.meditecno.pt/Upload/Product/Archive/lkco1.pdf>).

ELISA test validation and sample stability

Analysis for the validation of DHEA and DHEA-S ELISAs were performed using the following protocol:^{2,18}

1) Determination of the intra-assay coefficient of variation: A sample was measured in duplicate 20 times on an ELISA microplate and the intra-assay coefficient of variation was calculated. This coefficient is expected to be less than 20 %;²

2) Confirmation of the dilutional linearity: Samples were first measured in duplicate, then spiked with a commercial calibrator with a known DHEA(S) concentration, and then diluted several times (1:2, 1:4, and 1:8). An ELISA was performed on each diluted sample. The results obtained were compared with the results expected with the expectation of linear relationship² and;

3) Calculation of the recovery rate: Using the dilutional linearity solutions, the recovery rates, which should be between 80 – 120 %, ² were calculated using the following formula:²

$$\% \text{ Recovery of DHEA(S)} = \frac{\text{Measured [spiked sample]} - \text{Measured [neat sample]}}{\text{Theoretical [spiked sample]}} \times 100.$$

Pools of samples were used to determine the intra-assay coefficient of variation and to assess the dilutional linearity of DHEA. For the assessment of the dilutional linearity of DHEA-S, samples from two individual narwhals were used. The recovery rates were calculated with serum of one narwhal for the DHEA and of two narwhals for the DHEA-S. To assess the stability of DHEA in narwhals' serum stored at -80°C, sixteen samples from 10 narwhals were tested in duplicate twice after 12 and 24 months of freezing. Following the validation steps, serum DHEA(S) sampled at the beginning and end of handling were measured in duplicate for each narwhal. The mean ± standard error of the mean (SEM) of serum cortisol, DHEA(S) and cortisol/DHEA ratios were then compared between the beginning of handling and prior to release (i.e. end of handling).

Statistical analysis

Shapiro-Wilk normality tests were used to assess normality of the data and Levene's tests were performed to assess the equal variance between groups. For variables that met these two conditions, parametric tests (Student's *t*-test and Pearson) were used, while for those that did not meet at least one of these conditions, non-parametric tests (Wilcoxon test, Mann-Whitney, and Spearman) were applied. To assess the dilutional linearity of DHEA(S) and the cryopreservation of DHEA, Pearson's correlations and Spearman rank correlation test were performed, respectively. The effect of sex, body length, and total handling time on serum cortisol, DHEA(S) and cortisol/DHEA ratios was then evaluated. Paired values (beginning and end of handling) were available for only a subset of narwhals ($n = 8$ for cortisol, $n = 7$ for DHEA, and $n = 5$ for DHEA-S). Consequently, the interactions between the sampling time (beginning and end of handling) and the independent variables (sex or body length) to explain variation associated with the different serum parameters (cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios) were not statistically evaluated. The effects of the independent variables were thus evaluated for the beginning and end of handling independently. All statistical analyses were performed using R version 4.0.3⁴² with P -values ≤ 0.05 considered statistically significant.

RESULTS

Narwhals included in this study consist of six males and eight females captured and tagged during the 2017 and 2018 field seasons. The mean (\pm SD) total length of females and males was 389.38 ± 7.45 cm (range: 360-425 cm) and 430.67 ± 20.69 cm (range: 360-488 cm), respectively. The mean total handling time was 35.1 ± 2.5 minutes (range: 23-43 minutes) for females and 49.5 ± 6.3 minutes (range: 27-67 minutes) for males (Annex II). A total of 22 frozen serum samples from these 14 narwhals were available for analysis.

The DHEA and DHEA-S ELISAs were validated by assessing intra-assay coefficient of variation, dilutional linearity and recovery rate. The intra-assay coefficient of variation was 4.3 % for DHEA (serum DHEA = 3.32 ± 0.14 ng/mL) and 12.1 % for DHEA-S (serum DHEA-S = 7.00 ± 1.00 ng/mL). Dilutions of DHEA(S) were linear with R^2 values of 0.99 (Figure 1). The recovery rates ranged from 80.8 to 97.1 % for DHEA and from 83.3 to 110.5 % for DHEA-S (Table 1). The serum DHEA, analyzed after 12 and 24 months of freezing, were significantly ($P = 0.03$) and positively correlated (Figure 2).

Values of serum cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios of individual narwhal are presented in Table 2. Cortisol values and cortisol/DHEA-S were significantly higher at the end of the handling period in comparison to the beginning ($P = 0.024$ and $P = 0.035$ respectively) (Table 2). In contrast, DHEA(S) and cortisol/DHEA ratios did not differ significantly between the two sampling periods ($P > 0.297$) (Table 2). Serum cortisol at the end of the handling period was positively correlated with body length, being higher in longer individuals ($P = 0.042$) (Figure 3). Cortisol levels at the end of the handling period tended to be higher in males in comparison to females, but this was not statistically significant ($P = 0.086$) (Figure 4). Finally, there was no statistically significant association between all other measured parameters and total handling time ($P > 0.126$).

DISCUSSION

ELISA test validation

This study provides partial validation for two commercially available ELISA kits designed for humans, to measure DHEA and DHEA-S in serum of narwhals. In order to evaluate the performance of these ELISAs more rigorously, a full analytical validation such as that suggested by Andreasson et al. (2015) would have been optimal. The approach favored in the current study, however, is not uncommon for innovative validation studies on new species (see Gundlach et al., 2018 study on seals), where the coefficient of variation, dilutional linearity, and percentage of recovery are prioritized. This approach is also acceptable when dealing with a commercially validated kit¹⁸ and is commonly used in the veterinary and biological scientific literature.^{6,8,17,19-21,37} Certain validation parameters (i.e. robustness, trueness, uncertainty, limit of quantification, parallelism, selectivity, and sample stability) that typically comprise a full analytical validation could not be completed during this study, mostly because of the limited amount of narwhal serum available. “Trueness”, a comparison with accepted reference values,² was not possible because reference intervals for serum DHEA(S) are not currently available for any marine mammals including narwhals.

Sample stability

In this study, narwhal’ serum DHEA was reasonably well cryopreserved after 12 and 24 months of freezing (Figure 2), which is comparable with published results on apparent good cryopreservation of serum steroid hormones including cortisol and DHEA-S.^{40,49} However, the samples were initially stored at -20°C for several days to weeks in the field and were first analyzed one year after sampling. The samples may have been altered during the initial freezing process and the first year of freezing; therefore, an underestimation of the real values cannot be excluded. In optimal conditions, the analysis would have been undertaken as soon as possible after sampling, but this was impossible under the conditions of the study. Evaluation of the cryopreservation of cortisol and DHEA-S was not feasible due to the limited amount of serum available, but should ideally be considered in future studies. Moreover, serum samples with

various freeze-thaw cycles could be used to assess sample stability, another identified validation parameter.^{2,18}

Comparison of serum cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios between narwhals and other marine mammals

This study provided values for serum cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios in wild narwhals. Serum cortisol in cetaceans is usually lower in comparison to pinnipeds and terrestrial mammals experiencing an important stress event such as capture and handling^{3,4} and the values obtained in this study are no exception. Our values are comparable to those obtained in free-ranging beluga whales (*Delphinapterus leucas*), the closest relative to narwhal, sampled in Norwegian and Canadian waters.^{48,52}

In comparison with a recent study where DHEA(S) were measured by radioimmunoassay in harbor and gray seals, the DHEA concentrations in the acutely stressed narwhals of the present study were similar to those obtained in seals habituated to human handling and in wild healthy subjects, also exposed to acute stress, but higher than values recorded in wild diseased seals (i.e. under chronic stress).²¹ The DHEA-S concentrations obtained in narwhals were similar to those reported in the three experimental groups of seals from the same study, which were not statistically different from one another.²¹

Serum DHEA concentrations, also measured with ELISA, were recently published for killer whales under human care,^{39,43} with reported values much higher in comparison to harbor and gray seals,²¹ handled narwhals in this study, and the reported human DHEA reference range.³¹ The reasons for this disparity may include differences in measurement techniques, as well as inter-species, reproductive status, and age variations. Dehydroepiandrosterone tends to increase during the reproduction period and gestation in killer whales, but decreases with advanced age,^{39,43} similar to that is reported in humans^{31,50} and other species.⁵⁶ Given that reproductive status could not be determined in the current study, and because live narwhals cannot be aged easily (although narwhal length can be used as a proxy for age⁵⁵), comparison of narwhal serum DHEA(S) concentrations with those of captive killer whales should be avoided until further analysis and research are conducted.

Comparison of serum cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios between the beginning and the end of handling in narwhals

Although serum cortisol varies among species due to several intrinsic and extrinsic factors,^{13,46,56} an increase in values is usually measurable in 3 to 5 minutes and peaks at 15-30 minutes following an acute stressful event such as capture.¹³ The serum cortisol concentration obtained in narwhals at the beginning of handling may not be equivalent to its basal concentration and could be overestimated as there may have already been an effect of the actual capture and initial handling to secure the animal. However, it was significantly higher at the end of the handling period, which could be interpreted as the effect of acute stress on serum cortisol levels in this species.

Serum DHEA(S) did not differ statistically between the beginning and the end of the handling period, and was not correlated to total handling time. Although DHEA(S) may increase temporarily with acute stress in some species, including humans,^{8,34,56} our results suggest that serum DHEA(S) are less influenced by acute stress in narwhals, similar to harbor and gray seals.²¹ The cortisol/DHEA-S ratio was statistically higher at the end of the handling period, but the cortisol/DHEA ratio was not significantly different. It is likely that the small number of narwhals' serum samples available for hormonal analysis, both at the beginning and end of the handling period, limited the statistical power; consequently, future work will require larger sample sizes. These results still suggest that DHEA(S) and cortisol/DHEA(S) ratios are likely to be better biomarkers of chronic stress than cortisol alone in narwhals. The possibility that narwhals were already chronically stressed and experiencing attenuated DHEA(S) response or DHEA(S) depletion, as is reported in humans^{35,36} should also be considered. Comparisons of these results with serum DHEA(S) sampled from known chronically stressed (e.g. individuals sampled from an ice entrapment) and "unstressed" (e.g. healthy individuals under normal environmental conditions) narwhals would confirm this hypothesis.

Correlations between serum cortisol measured at the beginning and the end of handling, and total body length and sex of narwhals

Serum cortisol was positively and statistically correlated to total body length at the end of the handling period, while values tended to be higher in males compared to females at this time point,

although this difference was not statistically significant. Because body length could be used as a proxy of age in narwhals,⁵⁵ further studies are required to assess whether older and/or male individuals have a more pronounced physiological response to acute stress than younger and/or female narwhals.

Limits of the study

Results of DHEA(S) measurements must be interpreted with caution, while recognizing the limitations of the study. The delay between the freezing time and the analyses of cortisol and DHEA(S) were variable and may have impacted the results, possibly increasing variability in derived values. Delays between capture and first venipuncture, and between the two venipunctures (beginning and end of handling) differed among narwhals, varying with untangling time and ease of blood draw. Several minutes passed between the time when a narwhal was entangled in the net and when it was secured on the beach by handlers to undertake tagging procedures and this time frame varied between whales depending on how they reacted to capture and how entangled they were. The period of transportation from the point of capture and restraint to the beach was likely very stressful for narwhals and because we were not able to sample blood until narwhals were secured in position in shallow waters, an underestimation of the level of increase of serum cortisol and DHEA(S) between the beginning and end of handling should be considered.

CONCLUSION

Overall the results of this study highlight that the two commercially available ELISAs used provide an easy, rapid, and valuable assays for measuring serum DHEA and DHEA-S in narwhals. It also provides values of serum cortisol, DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios which, to the authors' knowledge, have not been previously published for narwhals nor any other wild cetaceans to date (excluding serum cortisol). Because the study of stress biomarkers is an important objective tool for assessing environmental pressures on a given species⁵⁶ and the promising results presented here, DHEA(S) and the cortisol/DHEA(S) ratios require further investigation to assess their relevance as chronic stress biomarkers in narwhal and other marine mammals. In the future, these biomarkers could be analyzed in conjunction with animal health status, including complete blood counts, serum chemistries, physiological status, and potential environmental stressors such as recent environmental changes in ice conditions,^{32,45} changes in prey availability, increased predatory pressure,²⁶ and increased underwater noise and shipping traffic.^{23,30} In addition, these biomarkers could eventually be incorporated in the calculation of an allostatic load index to evaluate the impact of chronic stress on narwhal health by incorporating multi-systemic (cardiovascular, immune, metabolic, and neuroendocrine) biomarkers,^{16,29} as recently published for western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) under human care.¹⁷ When compared to traditional biomedical methods in human medicine, the increase in the use of DHEA (S) has shown enhanced capacity to predict morbidity and mortality rates associated with stress-related diseases,²⁹ and appears promising to predict these rates in veterinary medicine.^{16,17} Modelling of predicted morbidity and mortality can be used as an early warning indicator of adverse population level effects of anthropogenic environmental change on vulnerable marine mammals. Finally, the study of these potential chronic stress biomarkers could be undertaken through less invasive field methods such as remote biopsy sampling of skin and blubber, as well as collection of respiratory vapor (e.g. Hudson et al., 2021).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the generous Mittimatalik community and Hunters and Trappers Organization for their invaluable help, advice, and support, R. Hodgson for field logistics and leadership, the field crews, as well as the Canadian Wildlife Health Cooperative (Quebec Regional Center) team, and Dr. Marion Schmicke for their assistance. This study was supported by the Arctic Species Conservation Fund of the World Wildlife Fund (WWF) Canada and the Fonds du centenaire of the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Field work was funded by Fisheries and Oceans Canada and Golder Associates Inc.

LITTERATURE CITED

1. Almeida PE, Weber PSD, Burton JL, Zanella AJ. Depressed DHEA and increased sickness response behaviors in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. *Domest Anim Endocrinol.* 2008;34:89-99.
2. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Genc S, Kruse N, Kuiperij HB, Kulic L, Lewczuk P, Mollenhauer B, Mroczko B, Parnetti L, Vanmechelen E, Verbeek MM, Winblad B, Zetterberg H, Koel-Simmelink M, Teunissen CE. A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol* [Internet]. 2015. Available from doi: 10.3389/fneur.2015.00179
3. Atkinson S, Crocker D, Houser D, Mashburn K. Stress physiology in marine mammals: How well do they fit the terrestrial model?. *J Comp Physiol B.* 2015;185:463-486.
4. Atkinson S, Dierauf LA. Stress and marine mammals. In: Gulland FMD, Dierauf LA, Whitman KL (eds), *CRC handbook of marine mammal medicine*, 3rd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2018. p. 153-168.
5. Baffinland. Mary river project: Phase 2 proposal. Executive Summary. 2018;30 pp.
6. Bienboire-Frosini C, Chabaud C, Cozzi A, Codecasa E, Pageat P. Validation of a commercially available enzyme immunoassay for the determination of oxytocin in plasma samples from seven domestic animal species. *Front Neurosci* [Internet]. 2017. Available from doi: 10.3389/fnins.2017.00524
7. Boonstra R, Dantzer B, Delehanty B, Fletcher QE, Sheriff MJ. Equipped for life in the boreal forest: The role of the stress axis in mammals. *Arctic.* 2014;67(1):82-97.
8. Boonstra R, Lane JE, Boutin S, Bradley A, Desantis L, Newman AEM, Soma KK. Plasma DHEA levels in wild, territorial red squirrels: Seasonal variation and effect of ACTH. *Gen Comp Endocrinol.* 2008;158:61-67.
9. Burgess EA, Hunt KE, Kraus SD, Rolland RM. Quantifying hormones in exhaled breath for physiological assessment of large whales at sea. *Sci Rep* [Internet]. 2018. Available from doi: 10.1038/s41598-018-28200-8

10. Breed GA, Matthews CJD, Marcoux M, Higdon JW, LeBlanc B, Petersen SD, Orr J, Reinhart NR, Ferguson SH. Sustained disruption of narwhal habitat use and behavior in the presence of Arctic killer whales. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(10):2628-2633.
11. COSEWIC (Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada). COSEWIC assessment and update status report on the narwhal *Monodon monoceros* in Canada. 2004;50 pp.
12. Dawson J, Pizzolato L, Howell SEL, Copland L, Johnston ME. Temporal and spatial patterns of ship traffic in the Canadian Arctic from 1990 to 2015. *Arctic*. 2018;71(1):15-26.
13. de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt M. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(2):271-281.
14. Dickens MJ, Romero LM. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;191:177-189.
15. Dietz R, Heide-Jorgensen MP, Richard PR, Acquarone M. Summer and fall movements of narwhals (*Monodon monoceros*) from northeastern Baffin Island towards northern Davis Strait. *Arctic*. 2001;54(3):244–261.
16. Edes AN, Wolfe BA, Crews DE. Evaluating allostatic load: A new approach to measuring long-term stress in wildlife. *J Zoo Wildl Med*. 2018;49(2):272-282.
17. Edes AN, Wolfe BA, Crews DE. The first multi-zoo application of an allostatic load index to western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Gen Comp Endocrinol*. 2018;266:135-149.
18. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011;23 pp.
19. Fokidis HB. Sources of variation in plasma corticosterone and dehydroepiandrosterone in the male northern cardinal (*Cardinalis cardinalis*): I. Seasonal patterns and effects of stress and adrenocorticotrophic hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 2016;235:192-200.
20. Gundlach NH, Feldmann M, Gundelach Y, Gil MA, Siebert U, Hoedemaker M, Schmicke M. Dehydroepiandrosterone and cortisol/dehydroepiandrosterone ratios in dairy cattle with postpartum metritis. *Res Vet Sci*. 2017;115:530-533.
21. Gundlach NH, Schmicke M, Ludes-Wehrmeister E, Ulrich SA, Araujo MG, Siebert U. New approach to stress research in phocids - Potential of dehydroepiandrosterone and cortisol/dehydroepiandrosterone ratio as markers for stress in harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). *J Zoo Wildl Med*. 2018;49(3):556-563.

22. Haddad JJ, Saadé NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: A role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol.* 2002;133(1-2):1-19.
23. Halliday WD, Barclay D, Barkley AN, Cook E, Dawson J, Hilliard RC, Hussey NE, Jones JM, Juanes F, Marcoux M, Nudds S, Pine MK, Richards C, Scharffenberg K, Westdal K, Insley SJ. Underwater sounds levels in the Canadian Arctic 2014-2019. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112437
24. Halliday WD, Dawson J, Yurkowski DJ, Doniol-Valcroze T, Ferguson SH, Gjerdrum C, Hussey NE, Kochanowicz Z, Mallory ML, Marcoux M, Watt CA, Wong SNP. Vessel risks to marine wildlife in Tallurutiup Imanga National Marine Conservation Area and eastern entrance to the Northwest Passage. *Environ Sci Policy.* 2022;127:181-195.
25. Heide-Jørgensen MP, Nielsen NH, Hansen RG, Schmidt HC, Blackwell SB, Jørgensen OA. 2015. The predictable narwhal: Satellite tracking shows behavioural similarities between isolated subpopulations. *J Zool.* 2015;297(1):54–65.
26. Higdon JW, Ferguson SH. Loss of Arctic sea ice causing punctuated change in sightings of killer whales (*Orcinus orca*) over the past century. *Ecol Appl.* 2009;19:1365–1375.
27. Hudson JM, Anderson WG, Marcoux M. 2021. Measurement of cortisol in blow samples collected from free-swimming beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Mar Mam Sci.* 2021;37(3):888–900.
28. Jeckel CMM, Lopes RP, Berleze MC, Luz C, Feix L, Argimon II de L, Stein LM, Bauer ME. Neuroendocrine and immunological correlates of chronic stress in “strictly healthy” populations. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(1):9-18.
29. Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;35:2-16.
30. Kochanowicz Z, Dawson J, Halliday WD, Sawada M, Copland L, Carter NA, Nicoll A, Ferguson SH, Heide-Jørgensen MP, Marcoux M, Watt C, Yurkowski DJ. Using western science and Inuit knowledge to model ship-source noise exposure for cetaceans (marine mammals) in Tallurutiup Imanga (Lancaster Sound), Nunavut, Canada. *Mar Policy* [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1016/j.marpol.2021.104557

31. Kushnir MM, Blamires T, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Erdogan E, Bunker AM, Meikle AW. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. *Clin Chem*. 2010;56 (7):1138-1147.
32. Laidre KL, Heide-Jørgensen MP. Arctic sea ice trends and narwhal vulnerability. *Biol Conserv*. 2005;121(4):509–517.
33. Laidre K, Heide-Jørgensen MP, Stern H, Richard P. Unusual narwhal sea ice entrapments and delayed autumn freeze-up trends. *Polar Biol*. 2012;35(1):149-154.
34. Lennartsson A-K, Kushnir MM, Bergquist J, Jonsdottir IH. DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Biol Psychol*. 2012;90(2):143-149.
35. Lennartsson A-K, Theorell T, Kushnir MM, Bergquist J, Jonsdottir IH. Perceived stress at work is associated with attenuated DHEA-S response during acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2013a;38:1650-1657.
36. Lennartsson A-K, Theorell T, Rockwood AL, Kushnir MM, Jonsdottir IH. Perceived stress at work is associated with lower levels of DHEA-S. *PLoS One* [Internet]. 2013b. Available from doi: 10.1371/journal.pone.0072460
37. Newman AEM, Pradhan DS, Soma KK. Dehydroepiandrosterone and corticosterone are regulated by season and acute stress in a wild songbird: Jugular *versus* brachial plasma. *Endocrinology*. 2008;149(5):2537-2545.
38. Newman AEM, Zanette LY, Clinchy M, Goodenough N, Soma KK. Stress in the wild: Chronic predator pressure and acute restraint affect plasma DHEA and corticosterone levels in a songbird. *Stress*. 2013;16(3):363-367.
39. O’Brien JK, Steinman KJ, Fetter GA, Robeck TR. Androgen and glucocorticoid production in the male killer whale (*Orcinus orca*): Influence of age, maturity, and environmental factors. *Andrology*. 2017;5(1):180-190.
40. Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59(3):551-555.

41. Orr JR, Joe R, Evc D. Capturing and handling of white whales (*Delphinapterus leucas*) in the Canadian Arctic for instrumentation and release. *Arctic*. 2001;54:299–304.
42. R Development Core Team [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [Accessed 16 April 2021]. Available from <http://www.Rproject.org>.
43. Robeck TR, Steinman KJ, O'Brien JK. Characterization and longitudinal monitoring of serum androgens and glucocorticoids during normal pregnancy in the killer whale (*Orcinus orca*). *Gen Comp Endocrinol*. 2017;247:116-129.
44. Rondelli MCH, Munhoz TD, Catandi PB, Freschi CR, Palacios Junior RJG, Machado RZ, Tinucci-Costa M. Serum DHEA-S increases in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Res Vet Sci*. 2015;100:18-20.
45. Serreze MC, Stroeve JC. Arctic sea ice trends, variability and implications for seasonal ice forecasting. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* [Internet]. 2015. Available from doi: 10.1098/rsta.2014.0159
46. Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 2011;166:869-887.
47. Shuert CR, Marcoux M, Hussey NE, Watt CA Auger-Méthé M. Assessing the post-release effects of capture, handling and placement of satellite telemetry devices on narwhal (*Monodon monoceros*) movement behaviour. *Conserv Physiol* [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1093/conphys/coaa128
48. St. Aubin DJ, Deguise S, Richard PR, Smith TG, Geraci JR. Hematology and plasma chemistry as indicators of health and ecological status in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Arctic*. 2001;54(3):317-331.
49. Stroud LR, Solomon C, Shenassa E. Long-term stability of maternal prenatal steroid hormones from the National Collaborative Perinatal Project: Still valid after all these years. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(2):140-150.
50. Tagawa N, Hidaka Y, Takano T, Shimaoka Y, Kobayashi Y, Amino N. Serum concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate and their relation to cytokine production during and after normal pregnancy. *Clin Chim Acta*. 2004;340(1-2):187-193.

51. Thompson LA, Spoon TR, Goertz CEC, Hobbs RC, Romano TA. Blow collection as a non-invasive method for measuring cortisol in the beluga (*Delphinapterus leucas*). PLoS One [Internet]. 2014 Available from doi: 9(12):e114062
52. Tryland M, Thoresen SI, Kovacs KM, Lydersen C. Serum chemistry of free-ranging white whales (*Delphinapterus leucas*) in Svalbard. Vet Clin Pathol. 2006;35(2):199-203.
53. Watt CA, Orr JR, Heide-Jørgensen MP, Nielsen NH, Ferguson SH. Differences in dive behaviour among the world's three narwhal (*Monodon monoceros*) populations correspond with dietary differences. Mar Ecol Prog Ser. 2015;525:273–285.
54. Watt CA, Simonee J, L'Herault V, Zhou R, Ferguson SH, Marcoux M, Black S. Cortisol levels in narwhals (*Monodon monoceros*) blubber from 2000 to 2019. Arct Sci [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1139/as-2020-0034
55. Watt CA, Stewart BE, Loseto L, Halldorson T, Ferguson SH. Estimating narwhal (*Monodon monoceros*) age using tooth layers and aspartic acid racemization of eye lens nuclei. Mar Mamm Sci. 2020;36:103– 115.
56. Whitham JC, Bryant JL, Miller LJ. Beyond glucocorticoids: Integrating dehydroepiandrosterone (DHEA) into animal welfare research. Animals [Internet]. 2020. Available from doi: 10.3390/ani10081381
57. Wright A, Fokidis HB. Sources of variation in plasma corticosterone and dehydroepiandrosterone in the male northern cardinal (*Cardinalis cardinalis*): II. Effects of urbanization, food supplementation and social stress. Gen Comp Endocrinol. 2016;235:201-209.

TABLES

Table 1: Recovery rate (%) of dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated metabolite (DHEA-S), collectively referred to as DHEA(S), from spiked serum samples of narwhal (*Monodon monoceros*) measured with two commercial competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Diagnostic Biochem Canada Inc.). Serum from two individuals was used for this validation step. The neat sample values correspond to the concentrations of DHEA(S) measured in narwhal' serum. The obtained spiked sample values correspond to the concentrations of DHEA(S) in which the serum was spiked with a calibrator with known human DHEA(S) concentrations. The theoretical spiked sample values are the expected concentrations of DHEA(S) following spiking. The recovery rates were between 80 and 120 %, which is within the range accepted for validation.

Sample	Dilution factor	Neat sample value (ng/ml)	Obtained spiked sample value (ng/ml)	Theoretical spiked sample value (ng/ml)	% Recovery
DHEA	0	0.30	2.10	-	-
Narwhal #					
01-2018	1:2	0.14	1.16	1.05	97.1
(beginning of handling)	1:4	0.08	0.56	0.53	90.6
	1:8	0.04	0.25	0.26	80.8
DHEA-S	0	20.00	155.00	-	-
Narwhal #					
01-2018	1:2	9.00	82.00	78.00	93.6
(beginning of handling)	1:4	4.00	42.00	39.00	97.4
	1:8	2.00	23.00	19.00	110.5
DHEA-S	0	15.00	191.00	-	-
Narwhal #					
05-2017	1:2	9.00	101.00	96.00	95.8
(end of handling)	1:4	4.00	45.00	48.00	85.4
	1:8	2.00	22.00	24.00	83.3

Table 2: Values of serum cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated metabolite (DHEA-S), collectively referred to as DHEA(S), and cortisol/DHEA(S) ratios measured at the beginning and the end of the narwhal (*Monodon monoceros*) handling period. Cortisol was measured with a solid-phase, competitive chemiluminescence enzyme immunoassay (IMMULITE® 1000). DHEA(S) were measured with commercial competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Diagnostic Biochem Canada Inc.).

Variable (ng/mL)	Mean ± SEM	Median	Minimum	Maximum	95 % confidence interval
Cortisol ^a beginning <i>n</i> = 11	30.74 ± 4.87	27.90	12.61	61.59	19.89, 41.60
end <i>n</i> = 11	41.83 ± 4.83	39.86	20.11	69.93	31.06, 52.60
DHEA ^b beginning <i>n</i> = 9	1.01 ± 0.52	0.45	0.26	5.17	-0.20, 2.22
end <i>n</i> = 11	0.99 ± 0.50	0.44	0.23	5.91	-0.12, 2.09
DHEA-S ^b beginning <i>n</i> = 9	8.72 ± 1.68	9.00	2.00	20.00	4.86, 12.59
end <i>n</i> = 10	7.70 ± 1.02	7.00	3.00	15.00	5.39, 10.01
Cortisol/DHEA ^b beginning <i>n</i> = 9	75.43 ± 24.35	57.29	5.57	239.67	19.28, 131.58
end <i>n</i> = 11	84.41 ± 11.76	85.16	5.96	166.69	58.20, 110.61
Cortisol/DHEA-S ^a beginning <i>n</i> = 9	4.16 ± 1.07	3.20	3.00	11.94	1.70, 6.64
end <i>n</i> = 10	6.14 ± 1.00	5.77	2.70	13.77	3.89, 8.40

^a Differences in concentrations between the beginning and the end of the handling period were positively and statistically significant. $P_{\text{cortisol}} = 0.024$, $P_{\text{cortisol/DHEA-S ratio}} = 0.035$.

^b Differences in concentrations between the beginning and the end of the handling period were not statistically significant. $P_{\text{DHEA}} = 0.641$, $P_{\text{DHEA-S}} = 0.379$, and $P_{\text{cortisol/DHEA ratio}} = 0.297$.

FIGURES

Figure 1: Dilutional linearity of A) dehydroepiandrosterone (DHEA) and B) its sulfated metabolite (DHEA-S), collectively referred to as DHEA(S), from spiked serum samples of narwhal (*Monodon monoceros*) measured with two commercial competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Diagnostic Biochem Canada Inc.). Pooled serums of narwhal were used for the DHEA (A) and serums of two narwhals were used for the DHEA-S (B, color coded by individual). Theoretical spiked serum DHEA(S) concentrations are compared with obtained spiked serum DHEA(S) concentrations. The obtained spiked sample values correspond to the concentrations of DHEA(S) in which the serum was spiked with a calibrator with known DHEA(S) concentrations. The theoretical spiked sample values are the expected concentrations of DHEA(S) following spiking. The obtained and the theoretical DHEA(S) concentrations were correlated (for DHEA: $t_1 = 8.24$, $P = 0.077$; for individual DHEA-S : $t_1 = 53.05$, $P = 0.012$ and for blue individual DHEA-S: $t_1 = 24.48$, $P = 0.030$) and dilutions were linear for both hormones. The shaded grey areas represent the confidence intervals.

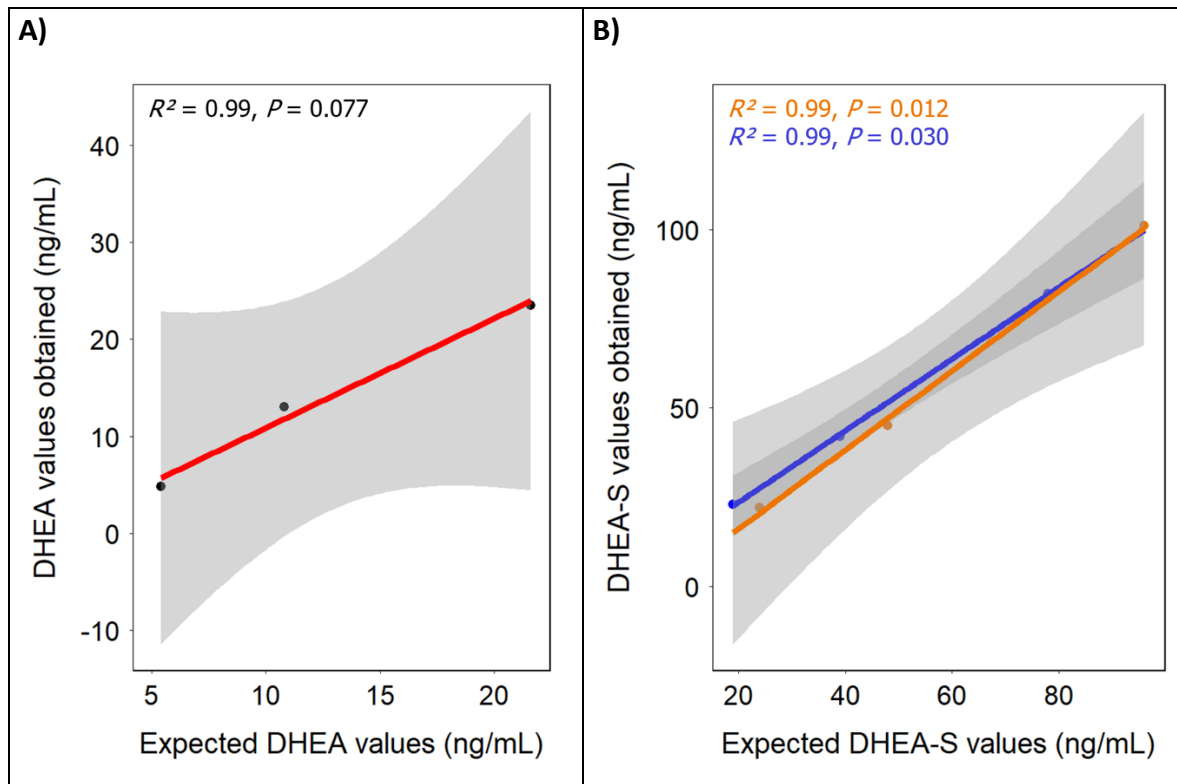


Figure 2: Spearman rank correlation test between serum dehydroepiandrosterone (DHEA) concentrations in narwhal (*Monodon monoceros*) measured after 12 and 24 months of freezing at -80°C (in 2019 and 2020 respectively). Sixteen serum samples from 10 narwhals were used and the DHEA was measured with a commercial competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Diagnostic Biochem Canada Inc.). The shaded grey area represents the confidence interval.

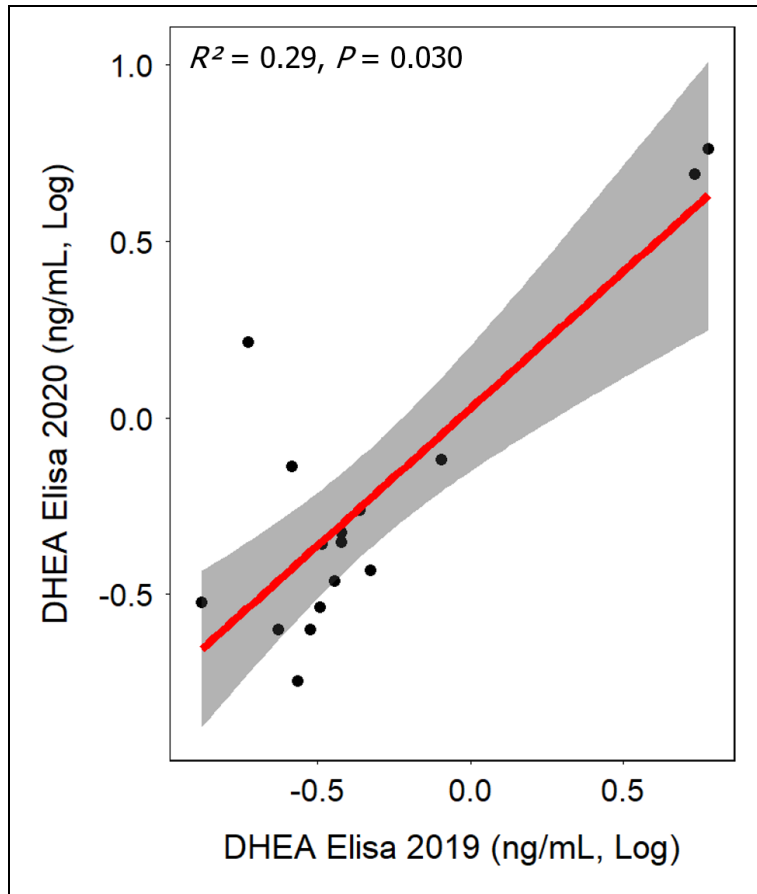


Figure 3. Correlation between serum cortisol and body length of narwhal (*Monodon monoceros*) of both sexes at the end of the handling period. The correlation was positively and statistically significant. Cortisol was measured with a solid-phase, competitive chemiluminescence enzyme immunoassay (IMMULITE® 1000). The shaded grey area represents the confidence interval.

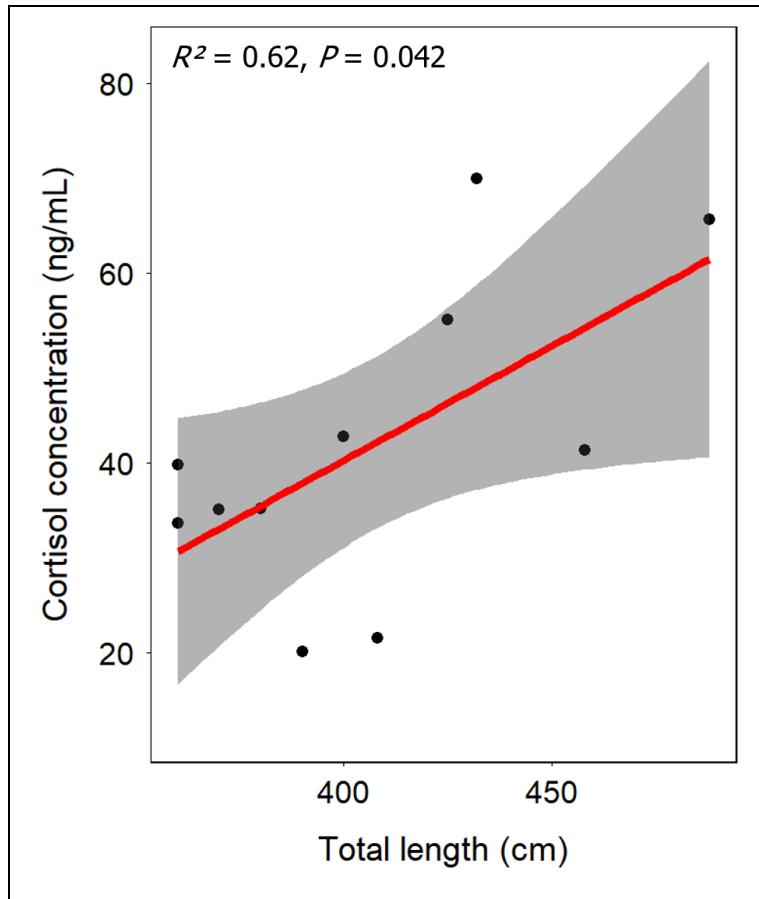
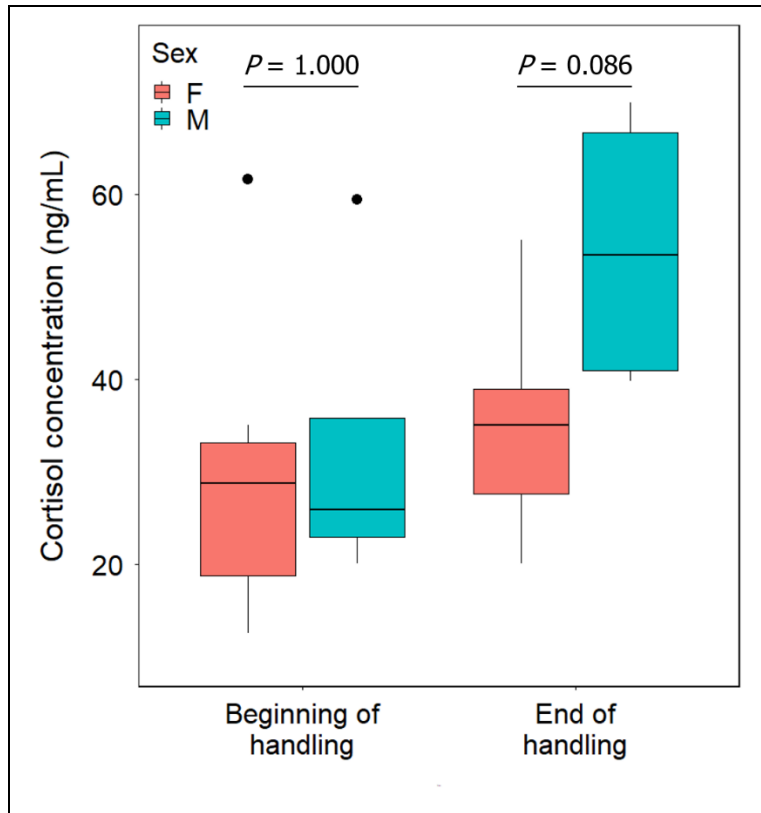


Figure 4. Boxplot of the effect of sex on serum cortisol at the beginning and at the end of the handling period of narwhal (*Monodon monoceros*). The horizontal line in the box represents the median of the analyte concentration, each box represents the interquartile range, the vertical lines represent the minimum and the maximum, and the circles represent outliers. Serum cortisol tended to be higher in males at the end of the handling period. Cortisol was measured with a solid-phase, competitive chemiluminescence enzyme immunoassay (IMMULITE® 1000).



Chapitre 3 – Discussion générale

Validation des deux ELISAs

Cette étude a permis de partiellement valider l'utilisation de deux méthodes immuno-enzymatiques, disponibles en médecine humaine, pour la mesure de la DHEA et de la DHEA-S dans le sérum de narvals. Bien qu'elle aurait été optimale, la validation complète de ces ELISAs, telle que suggérée par Andreasson et al. (2015) n'était pas possible pour diverses raisons. Ainsi, une validation partielle a été réalisée dans le cadre de ce projet de recherche. Les paramètres suivants, qui sont normalement inclus lors d'une validation complète, n'ont pu être validés dans le cadre du présent projet : la robustesse, l'exactitude, l'incertitude, la limite de quantification, le parallélisme, la sélectivité et la stabilité. Certains de ces paramètres n'ont pu l'être car une quantité limitée de sérum était disponible pour le projet. D'autres paramètres, tel que l'exactitude, n'ont pu être validés comme cela aurait nécessité une comparaison entre les valeurs de DHEA(S) obtenues chez les narvals et des valeurs de référence reconnues (Andreasson et al., 2015), qui ne sont ni disponibles, ni publiées chez les cétacés en milieu naturel. Une telle approche est jugée tout de même acceptable lorsqu'un ELISA commercial, préalablement validé chez une autre espèce est utilisé (European Medicines Agency, 2011). À cet effet, une validation partielle est fréquemment utilisée dans la littérature vétérinaire, notamment lors d'études innovantes chez des espèces peu communes telles que l'étude de la DHEA(S) chez les phoques de Gundlach et al. (2018), où le coefficient de variation intra-essai, la linéarité de dilution et le pourcentage de récupération ont aussi été priorisés lors de la validation des techniques de dosage radio-immunologiques de la DHEA et de la DHEA-S. Plus largement, des validations partielles sont aussi fréquentes en sciences biologiques (Bienboire-Frosini et al., 2017; Boonstra et al., 2008; Edes et al., 2018b; Fokidis, 2016; Gundlach et al., 2017; Gundlach et al., 2018; Newman et al., 2008).

Stabilité des échantillons

Dans cette étude, la cryopréservation de la DHEA dans le sérum de narvals suite à 12 et 24 mois de congélation fut satisfaisante (Figure 2 dans l'article) et comparable aux données publiées sur

la cryopréservation efficace d'autres hormones stéroïdiennes incluant le cortisol et la DHEA-S (Orentreich et al., 1984; Stroud et al., 2007). Néanmoins, les échantillons de sérum ont initialement été entreposés à -20°C sur le terrain, et ce, pour plusieurs jours et même plusieurs semaines dans certains cas. De plus, comme les premières analyses ont été réalisées un an après les prélèvements, il est possible que les différentes hormones, soit le cortisol et la DHEA(S), aient été altérées suite à la congélation et que cela ait sous-estimé les concentrations sériques initiales. En conditions optimales, les analyses auraient été réalisées le plus rapidement possible suite aux prélèvements, ce qui était logistiquement impossible sur le terrain à cause de la localisation éloignée et des conditions environnementales difficiles. La quantité de sérum de narvals disponible pour analyse étant limitée, l'évaluation de la cryopréservation du cortisol et de la DHEA-S n'a pu être effectuée, mais devrait être considérée dans des études futures. De plus, des échantillons sériques subissant différents cycles de congélation-décongélation pourraient être utilisés afin d'évaluer la stabilité des hormones dans lesdits échantillons (Andreasson et al., 2015; European Medicines Agency, 2011).

Comparaison du cortisol et de la DHEA(S) sériques et des ratios cortisol/DHEA(S) entre les narvals et autres mammifères marins

Ce projet de recherche a aussi permis la publication de valeurs sériques de cortisol, de DHEA(S) et de ratios cortisol/DHEA(S) chez le narval. Chez les cétacés, le cortisol sérique n'augmente pas de manière aussi marquée que les pinnipèdes et les mammifères terrestres suite à un événement stressant important tel qu'une capture ou une contention (Atkinson et al., 2015; Atkinson & Dierauf, 2018). Les valeurs de cortisol sérique obtenues chez les narvals échantillonnés dans le cadre de cette étude n'y font pas exception. Par ailleurs, les valeurs de cortisol sérique mesurées chez ces narvals sont comparables à celles mesurées chez des bélugas sauvages, le plus proche parent des narvals, échantillonnés dans les eaux canadiennes et norvégiennes (St. Aubin et al., 2001; Tryland et al., 2006). Les concentrations sériques de DHEA chez les narvals échantillonnés lors de la présente étude étaient similaires à celles mesurées par radio-immunologie chez des phoques communs et des phoques gris gardés en institutions zoologiques (et donc habitués aux contacts humains), de même que chez des phoques communs et gris en santé et sauvage. Les valeurs sériques de DHEA étaient toutefois plus élevées chez les narvals, par rapport à celles

mesurées chez des phoques communs et des phoques gris sauvages, mais malades. Les valeurs de DHEA-S obtenues dans le sérum de narvals étaient similaires à celles rapportées chez les phoques communs et gris gardés en institutions zoologiques, sauvages et en santé et sauvages et malades, qui ne différaient pas statistiquement les unes des autres dans l'étude récente sur ces deux espèces de phoques (Gundlach et al., 2018). Les concentrations sériques de DHEA mesurées par ELISA chez des épaulards gardés en institutions zoologiques ont également été récemment publiées (O'Brien et al., 2017; Robeck et al., 2017). Dans ces études, les valeurs rapportées chez les épaulards sont nettement supérieures à celles publiées chez les phoques gris et les phoques communs (Gundlach et al., 2018), les narvals de cette présente étude, de même que les valeurs de référence de DHEA publiées pour l'espèce humaine (Kushnir et al., 2010). Les différences dans les méthodes de mesure utilisées, de même que la variabilité interspécifique, le statut reproducteur et l'âge variables des individus seraient à considérer pour justifier la disparité entre les valeurs obtenues. Néanmoins, à l'image de ce qui est observé chez les humains (Kushnir et al., 2010; Tagawa et al., 2004) et autres espèces (Whitham et al., 2020), la DHEA tend à augmenter en période de reproduction, incluant lors de la gestation, mais à diminuer avec l'âge, chez les épaulards (O'Brien et al., 2017; Robeck et al., 2017). Puisque le statut reproducteur des narvals échantillonnés lors du présent projet de recherche demeure inconnu et puisque l'âge des narvals ne peut pas être déterminé avec certitude facilement, la comparaison entre les concentrations sériques de DHEA(S) chez les narvals et chez ces épaulards gardés en institutions zoologiques demeure difficile.

Comparaison du cortisol et de la DHEA(S) sériques et des ratios cortisol/DHEA(S) entre le début et la fin des procédures chez le narval

Bien que les concentrations sériques de cortisol varient entre les différentes espèces de vertébrés et sont influencées par bon nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques (de Kloet et al., 2005; Sheriff et al., 2011; Whitham et al., 2020), une augmentation est généralement notable de 3 à 5 minutes suite à un événement stressant tel une capture et plafonne de 15 à 30 minutes suite à un tel événement (de Kloet et al. 2005). Ainsi, chez les narvals échantillonnés lors de cette étude, les concentrations sériques de cortisol mesurées en début de procédure ne peuvent pas être considérées comme étant équivalentes aux valeurs basales de cortisol. En effet, les

concentrations initiales réelles de cortisol sérique ont pu être surestimées comme, pour des raisons de sécurité humaine et animale, les manipulations initiales (capture à l'aide d'un filet, contention manuelle, désenchevêtrement du filet) ont précédé le premier prélèvement sanguin. Néanmoins, les concentrations sériques de cortisol étaient tout de même statistiquement plus élevées en fin de procédure (avant relâche) par rapport à au début de la procédure (après la capture et le désenchevêtrement), mettant en lumière l'effet d'un stress aigu sur la concentration sérique de cortisol chez le narval.

La DHEA et la DHEA-S sériques n'étaient pas statistiquement différentes entre le début et la fin des procédures et n'étaient pas corrélées à la durée totale des manipulations. Chez certaines espèces, incluant les humains, la DHEA(S) peut augmenter de manière transitoire lors de stress aigu (Boonstra et al., 2008; Lennartsson et al., 2012; Whitham et al., 2020). Les résultats de la présente étude suggèrent néanmoins que la DHEA(S) sérique est moins influencée par un stress aigu chez les narvals, à l'image de ce qui est publié pour les phoques communs et les phoques gris (Gundlach et al., 2018). La possibilité que les narvals échantillonnés aient eu une réponse atténuée ou une déplétion de la DHEA(S) suite à un stress chronique, comme rapporté chez les humains (Lennartsson et al., 2013a; Lennartsson et al., 2013b) devrait aussi être considérée. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, il serait intéressant de comparer les concentrations sériques de DHEA(S) obtenues lors de cette présente étude à ceux provenant de narvals connus comme étant stressés (par exemple, narvals emprisonnés dans la glace) et de narvals considérés peu ou pas stressés (en conditions environnementales dites normales). Finalement, le ratio cortisol/DHEA-S était statistiquement plus élevé à la fin des procédures alors qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le début et la fin des procédures en ce qui concerne le ratio cortisol/DHEA. Il est possible que la faible quantité de sérums appariés (sang prélevé en début et fin des procédures) disponibles pour les analyses hormonales limite le pouvoir statistique. Ainsi, un échantillon plus grand devrait certainement être considéré lors de projets de recherche futurs.

Corrélation entre la concentration sérique de cortisol en début et fin des procédures et la longueur totale et le sexe chez le narval

En fin de procédure, le cortisol sérique était aussi statistiquement et positivement corrélé à la longueur totale des narvals alors que les valeurs tendaient à être plus élevées chez les mâles par rapport aux femelles, bien que cette différence n'était pas statistiquement significative. Comme la longueur totale du corps peut être utilisée pour approximer l'âge des narvals (Watt et al., 2020), des études supplémentaires sont requises afin de confirmer ou d'infirmier que les individus plus âgés et/ou les mâles ont une réponse physiologique plus prononcée au stress aigu par rapport aux jeunes narvals et/ou aux femelles.

Conclusion

Cette étude a permis de confirmer que les deux ELISAs utilisés, commercialisés pour les humains, permettent une mesure facile et rapide de deux biomarqueurs de stress chroniques potentiels, soit la DHEA et la DHEA-S, chez le narval. Cette étude a également permis la publication de valeurs sériques de cortisol, de DHEA(S) et de ratios cortisol/DHEA(S), qui à notre connaissance, n'ont jamais été rapportées chez le narval ni aucune autre espèce de cétacés (excluant le cortisol). Puisque l'étude des biomarqueurs de stress est un outil objectif important pour évaluer les pressions environnementales sur une espèce donnée (Whitham et al., 2020), et à la lumière des résultats prometteurs obtenus lors de la présente étude, des projets de recherche complémentaires sur ces biomarqueurs de stress chronique potentiels chez le narval seraient pertinents et nécessaires. La DHEA(S), de même que les ratios cortisol/DHEA(S) pourraient éventuellement être analysés en parallèle de l'état de santé des narvals et des perturbations environnementales comme l'augmentation de la température de l'eau, le changement de disponibilité des proies, la présence de nouveaux prédateurs, l'augmentation des bruits sous-marins et du trafic maritime. Enfin, nous espérons que l'étude de ces biomarqueurs de stress chronique potentiels pourra éventuellement être étendue à des échantillons prélevés sur le terrain de manière moins invasive tels que des biopsies de peau et de graisse de narvals prélevées à distance, mais aussi chez d'autres espèces de mammifères marins comme le béluga du Saint-Laurent et de l'Arctique, de même que la baleine noire de l'Atlantique Nord.

Références bibliographiques

Almeida PE, Weber PSD, Burton JL, Zanella AJ. Depressed DHEA and increased sickness response behaviors in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. *Domest Anim Endocrinol*. 2008;34:89-99.

Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Genc S, Kruse N, Kuiperij HB, Kulic L, Lewczuk P, Mollenhauer B, Mroczko B, Parnetti L, Vanmechelen E, Verbeek MM, Winblad B, Zetterberg H, Koel-Simmelink M, Teunissen CE. A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol* [Internet]. 2015. Available from doi: 10.3389/fneur.2015.00179

Atkinson S, Crocker D, Houser D, Mashburn K. Stress physiology in marine mammals: How well do they fit the terrestrial model?. *J Comp Physiol B*. 2015;185:463-486.

Atkinson S, Dierauf LA. Stress and marine mammals. In: Gulland FMD, Dierauf LA, Whitman KL (eds), *CRC handbook of marine mammal medicine*, 3rd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2018. p. 153-168.

Baffinland. Mary river project: Phase 2 proposal. Executive Summary. 2018;30 pp.

Bienboire-Frosini C, Chabaud C, Cozzi A, Codecasa E, Pageat P. Validation of a commercially available enzyme immunoassay for the determination of oxytocin in plasma samples from seven domestic animal species. *Front Neurosci* [Internet]. 2017. Available from doi: 10.3389/fnins.2017.00524

Boonstra R, Dantzer B, Delehanty B, Fletcher QE, Sheriff MJ. Equipped for life in the boreal forest: The role of the stress axis in mammals. *Arctic*. 2014;67(1):82-97.

Boonstra R, Lane JE, Boutin S, Bradley A, Desantis L, Newman AEM, Soma KK. Plasma DHEA levels in wild, territorial red squirrels: Seasonal variation and effect of ACTH. *Gen Comp Endocrinol*. 2008;158:61-67.

Burgess EA, Hunt KE, Kraus SD, Rolland RM. Quantifying hormones in exhaled breath for physiological assessment of large whales at sea. *Sci Rep* [Internet]. 2018. Available from doi: 10.1038/s41598-018-28200-8

Breed GA, Matthews CJD, Marcoux M, Higdon JW, LeBlanc B, Petersen SD, Orr J, Reinhart NR, Ferguson SH. Sustained disruption of narwhal habitat use and behavior in the presence of Arctic killer whales. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(10):2628-2633.

COSEWIC (Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada). COSEWIC assessment and update status report on the narwhal *Monodon monoceros* in Canada. 2004;50 pp.

Cross TG, Hornshaw MP. Can LC and LC-MS ever replace immunoassays?. *J Appl Bioanal*. 2016;2(4):108-116.

Dawson J, Pizzolato L, Howell SEL, Copland L, Johnston ME. Temporal and spatial patterns of ship traffic in the Canadian Arctic from 1990 to 2015. *Arctic*. 2018;71(1):15-26.

de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt M. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(2):271-281.

Dickens MJ, Romero LM. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;191:177-189.

Dietz R, Heide-Jorgensen MP, Richard PR, Acquarone M. Summer and fall movements of narwhals (*Monodon monoceros*) from northeastern Baffin Island towards northern Davis Strait. Arctic. 2001;54(3):244–261.

Edes AN, Wolfe BA, Crews DE. Evaluating allostatic load: A new approach to measuring long-term stress in wildlife. J Zoo Wildl Med. 2018a;49(2):272-282.

Edes AN, Wolfe BA, Crews DE. The first multi-zoo application of an allostatic load index to western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). Gen Comp Endocrinol. 2018b;266:135-149.

European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011;23 pp.

Fokidis HB. Sources of variation in plasma corticosterone and dehydroepiandrosterone in the male northern cardinal (*Cardinalis cardinalis*): I. Seasonal patterns and effects of stress and adrenocorticotrophic hormone. Gen Comp Endocrinol. 2016;235:192-200.

Gundlach NH, Feldmann M, Gundelach Y, Gil MA, Siebert U, Hoedemaker M, Schmicke M. Dehydroepiandrosterone and cortisol/dehydroepiandrosterone ratios in dairy cattle with postpartum metritis. Res Vet Sci. 2017;115:530-533.

Gundlach NH, Schmicke M, Ludes-Wehrmeister E, Ulrich SA, Araujo MG, Siebert U. New approach to stress research in phocids - Potential of dehydroepiandrosterone and cortisol/dehydroepiandrosterone ratio as markers for stress in harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). J Zoo Wildl Med. 2018;49(3):556-563.

Haddad JJ, Saadé NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. J Neuroimmunol. 2002;133(1-2):1-19.

Halliday WD, Barclay D, Barkley AN, Cook E, Dawson J, Hilliard RC, Hussey NE, Jones JM, Juanes F, Marcoux M, Nudds S, Pine MK, Richards C, Scharffenberg K, Westdal K, Insley SJ. Underwater sounds levels in the Canadian Arctic 2014-2019. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112437

Halliday WD, Dawson J, Yurkowski DJ, Doniol-Valcroze T, Ferguson SH, Gjerdrum C, Hussey NE, Kochanowicz Z, Mallory ML, Marcoux M, Watt CA, Wong SNP. Vessel risks to marine wildlife in Tallurutiup Imanga National Marine Conservation Area and eastern entrance to the Northwest Passage. *Environ Sci Policy*. 2022;127:181-195.

Heide-Jørgensen MP, Nielsen NH, Hansen RG, Schmidt HC, Blackwell SB, Jørgensen OA. 2015. The predictable narwhal: satellite tracking shows behavioural similarities between isolated subpopulations. *J Zool*. 2015;297(1):54–65.

Higdon JW, Ferguson SH. Loss of Arctic sea ice causing punctuated change in sightings of killer whales (*Orcinus orca*) over the past century. *Ecol Appl*. 2009;19:1365–1375.

Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods*. 2019;347:3-11.

Hudson JM, Anderson WG, Marcoux M. 2021. Measurement of cortisol in blow samples collected from free-swimming beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Mar Mam Sci*. 2021;37(3):888–900.

Jeckel CMM, Lopes RP, Berleze MC, Luz C, Feix L, Argimon II de L, Stein LM, Bauer ME. Neuroendocrine and immunological correlates of chronic stress in “strictly healthy” populations. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(1):9-18.

Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;35: 2-16.

Keevil BG. LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory. *Clin Biochem.* 2016;49:989-997.

Kochanowicz Z, Dawson J, Halliday WD, Sawada M, Copland L, Carter NA, Nicoll A, Ferguson SH, Heide-Jørgensen MP, Marcoux M, Watt C, Yurkowski DJ. Using western science and Inuit knowledge to model ship-source noise exposure for cetaceans (marine mammals) in Tallurutiup Imanga (Lancaster Sound), Nunavut, Canada. *Mar Policy* [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1016/j.marpol.2021.104557

Kushnir MM, Blamires T, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Erdogan E, Bunker AM, Meikle AW. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. *Clin Chem.* 2010;56 (7):1138-1147.

Laidre KL, Heide-Jørgensen MP. Arctic sea ice trends and narwhal vulnerability. *Biol Conserv.* 2005;121(4):509–517.

Laidre K, Heide-Jørgensen MP, Stern H, Richard P. Unusual narwhal sea ice entrapments and delayed autumn freeze-up trends. *Polar Biol* [Internet]. 2011. Available from doi: 10.1007/s00300-011-1036-8

Lennartsson A-K, Kushnir MM, Bergquist J, Jonsdottir IH. DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Biol Psychol.* 2012;90(2):143-149.

Lennartsson A-K, Theorell T, Kushnir MM, Bergquist J, Jonsdottir IH. Perceived stress at work is associated with attenuated DHEA-S response during acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2013a;38:1650-1657.

Lennartsson A-K, Theorell T, Rockwood AL, Kushnir MM, Jonsdottir IH. Perceived stress at work is associated with lower levels of DHEA-S. PLoS One [Internet]. 2013b. Available from doi: 10.1371/journal.pone.0072460

Newman AEM, Pradhan DS, Soma KK. Dehydroepiandrosterone and corticosterone are regulated by season and acute stress in a wild songbird: Jugular *versus* brachial plasma. Endocrinology. 2008;149(5):2537-2545.

Newman AEM, Zanette LY, Clinchy M, Goodenough N, Soma KK. Stress in the wild: chronic predator pressure and acute restraint affect plasma DHEA and corticosterone levels in a songbird. Stress. 2013;16(3):363-367.

O'Brien JK, Steinman KJ, Fetter GA, Robeck TR. Androgen and glucocorticoid production in the male killer whale (*Orcinus orca*): influence of age, maturity, and environmental factors. Andrology. 2017;5(1):180-190.

Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. J Clin Endocrinol Metab. 1984;59(3):551-555.

Orr JR, Joe R, Evcic D. Capturing and handling of white whales (*Delphinapterus leucas*) in the Canadian Arctic for instrumentation and release. Arctic. 2001;54:299–304.

R Development Core Team [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [Accessed 16 April 2021]. Available from <http://www.Rproject.org>.

Reeves RR, Stewart BS, Clapham PJ, Powell JA. Beluga and narwhal. In: National Audubon Society guide to marine mammals of the world. New York: Alfred A. Knopf; 2002. p. 316-325.

Robeck TR, Steinman KJ, O'Brien JK. Characterization and longitudinal monitoring of serum androgens and glucocorticoids during normal pregnancy in the killer whale (*Orcinus orca*). *Gen Comp Endocrinol*. 2017;247:116-129.

Rondelli MCH, Munhoz TD, Catandi PB, Freschi CR, Palacios Junior RJG, Machado RZ, Tinucci-Costa M. Serum DHEA-S increases in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Res Vet Sci*. 2015;100:18-20.

Serreze MC, Stroeve JC. Arctic sea ice trends, variability and implications for seasonal ice forecasting. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* [Internet]. 2015. Available from doi: 10.1098/rsta.2014.0159

Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 2011;166:869-887.

Shuert CR, Marcoux M, Hussey NE, Watt CA Auger-Méthé M. Assessing the post-release effects of capture, handling and placement of satellite telemetry devices on narwhal (*Monodon monoceros*) movement behaviour. *Conserv Physiol* [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1093/conphys/coaa128

St. Aubin DJ, Deguise S, Richard PR, Smith TG, Geraci JR. Hematology and plasma chemistry as indicators of health and ecological status in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Arctic*. 2001;54(3):317-331.

Stroud LR, Solomon C, Shenassa E. Long-term stability of maternal prenatal steroid hormones from the National Collaborative Perinatal Project: Still valid after all these years. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(2): 140-150.

Tagawa N, Hidaka Y, Takano T, Shimaoka Y, Kobayashi Y, Amino N. Serum concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate and their relation to cytokine production during and after normal pregnancy. *Clin Chim Acta*. 2004;340(1-2): 187-193.

Thompson LA, Spoon TR, Goertz CEC, Hobbs RC, Romano TA. Blow collection as a non-invasive method for measuring cortisol in the beluga (*Delphinapterus leucas*). *PLoS One* [Internet]. 2014 Available from doi: 9(12):e114062

Tryland M, Thoresen SI, Kovacs KM, Lydersen C. Serum chemistry of free-ranging white whales (*Delphinapterus leucas*) in Svalbard. *Vet Clin Pathol*. 2006;35(2):199-203.

Watt CA, Orr JR, Heide-Jørgensen MP, Nielsen NH, Ferguson SH. Differences in dive behaviour among the world's three narwhal (*Monodon monoceros*) populations correspond with dietary differences. *Mar Ecol Prog Ser*. 2015;525:273–285.

Watt CA, Simonee J, L'Herault V, Zhou R, Ferguson SH, Marcoux M, Black S. Cortisol levels in narwhals (*Monodon monoceros*) blubber from 2000 to 2019. *Arct Sci* [Internet]. 2021. Available from doi: 10.1139/as-2020-0034

Watt CA, Stewart BE, Loseto L, Halldorson T, Ferguson SH. Estimating narwhal (*Monodon monoceros*) age using tooth layers and aspartic acid racemization of eye lens nuclei. *Mar Mamm Sci*. 2020;36:103– 115.

Whitham JC, Bryant JL, Miller LJ. Beyond glucocorticoids: Integrating dehydroepiandrosterone (DHEA) into animal welfare research. *Animals* [Internet]. 2020. Available from doi: 10.3390/ani10081381

Wright A, Fokidis HB. Sources of variation in plasma corticosterone and dehydroepiandrosterone in the male northern cardinal (*Cardinalis cardinalis*): II. Effects of urbanization, food supplementation and social stress. Gen Comp Endocrinol. 2016;235:201-209.

Annexe I : Photographie d'exemple de manipulations effectuées sur un des narvals de l'étude



© Erin Linn

Annexe II : Informations sur les narvals échantillonnés lors des saisons 2017 et 2018

# Narval	Sexe (génétique)	Longueur (cm)	Temps total capture (min)	Temps entre 2 prélèvements sanguins (min)
01-2017	M	466	46	n/d ^b
03-2017	F	400	36	20
04-2017	M	432	47	14
05-2017*	M	488	67	n/a ^c
06-2017*	M	458	67	n/a ^c
11-2017	F	390	39	20
12-2017	F	425	27	13
15-2017*	M	380	43	28
16-2017*	F	370	43	n/d ^b
17-2017	M	360	27	12
19-2017*	F	408	35	23
20-2017*	F	380	35	15
01-2018	F	360	43	20
04-2018	F ^a	382	23	n/a ^c

* Capture double (deux individus capturés au même moment)

^a Analyse génétique non-effectuée; sexe déterminé par palpation

^b n/d : non-disponible; le temps entre les 2 prélèvements sanguins n'a pas été noté

^c n/a : non-applicable; l'animal a eu seulement un prélèvement sanguin ou un des deux prélèvements sanguins n'a pas permis de mettre du sérum en banque