

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac.

Secteur de Recherche : Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

Présentée par :

Sophie LORIOUX

INFLUENCES ENVIRONNEMENTALES PRECOCES ET REGULATION MATERNELLE DU DEVELOPPEMENT : IMPLICATIONS ECOLOGIQUES ET EVOLUTIVES CHEZ DEUX ESPECES DE SQUAMATES

Directeur de Thèse : Olivier LOURDAIS (CR1)

Soutenue le 24 Octobre 2011

devant la Commission d'Examen

JURY

Frédéric GRANDJEAN, Professeur, Université de Poitiers
Benoit HEULIN, Chargé de Recherche, Université de Rennes1
Sandrine MEYLAN, Maître de Conférence

Tahar SLIMANI, Professeur, Université de Marrakech, Maroc
Olivier LOURDAIS, Chargé de Recherche, CEBC-CNRS
Xavier BONNET, Directeur de Recherche, CEBC-CNRS

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Directeur de Thèse
Co-directeur

Remerciements

Voici venu le temps d'accoucher d'un long travail...et de remercier toutes les personnes, sans qui ce manuscrit n'aurait jamais abouti.

Je remercie tout d'abord le directeur, Vincent Bretagnolle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie également les membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie Olivier pour m'avoir donnée ma chance et permis de réaliser ce travail de thèse, après 2 ans de combat de recherche de financements. Je le remercie pour sa motivation et les bons échanges scientifiques de ces derniers mois. Merci aussi de m'avoir assistée aussi, durant les manips et les coups durs associés (ah satané Février 2009 !). Merci de m'avoir transmis la rigueur et l'organisation (mais ça, c'est pas encore gagné...). Enfin merci pour ton encadrement et ton investissement sans bornes durant ces années.

Je remercie aussi Xavier Bonnet, qui fût la première personne à m'avoir fait intégrer le labo d'herpéto. Merci pour ta bonne humeur. Dommage que nos échanges fussent trop rares.

Merci à Sylvie Perez et Sabrina Biais de l'Université de Poitiers pour leur sympathie et pour avoir facilité toutes ces laborieuses démarches administratives (surtout à distance).

Enfin tout ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans la contribution de nombreuses personnes:

Merci à toutes les personnes qui ont contribué à la finition de ce manuscrit (à la fin ça devient un travail d'équipe plus que jamais) :

Merci à Mat, Roger, Thibaut, Audrey, Hélène, Fred A, Max pour leurs relectures et commentaires ;

Merci à the « Blond haired girls Team » pour leur aide précieuse de rentrée bibliographique ;

Merci à Boubou et Lassa pour leurs (vaines) tentatives de contributions ;

Merci aux filles de la Bioch' : Colette, Charline et Stéphanie pour leur contribution significative dans les dosages d'hormones et pour leur gentillesse à toute épreuve.

Merci à Christian Thiburce pour m'avoir assistée dans mes premières manipulations de vipères (et dieu sait s'il y en a eu par la suite !) et enseignée ses connaissances zootechniques. Je le remercie aussi pour sa gentillesse, ses nombreux services rendus et ses nombreuses créations : on citera le non moins célèbre « Queen Mary » ou *Love Boat* de la vipère aspic.

Merci à Xavier Duchemin pour m'avoir filé de nombreux coups de mains, aux soins et dans les manip' (eh oui, des gros bras ça aide pour maintenir les pythons !). Merci pour ta bonne humeur aussi.

Merci enfin à tous les étudiants qui m'ont considérablement aidée tout au long de ce parcours du combattant, notamment Marie Vaugoyau et Hélène Lisse, pour leur aide très précieuse sur de nombreux mois, mais également, Julie Volette, Gersie, Nathalie Lachize, Emeline Audebeau, Aimeric Aible, Andréaz et Jérémy Rio...et merci aussi à Marie racapé.

Merci à Micheline et Christophe pour leurs bons petits plats (même si je n'étais pas la meilleure des candidates !)

Et maintenant, au tour de la A-Team (enfin l'ex, car déjà plus ou moins délitée depuis le départ de little Roger) :

Eh bien commençons par toi petit Roger : MERCI ! Pour ta bonne humeur permanente, et parce qu'on a été coloc' de bureau pendant un peu de temps (même si t'as préféré fuir au bout d'un an, tout ça pour te retrouver dans les nouveaux bureaux !!!pfff ça c'est ton p'tit côté matérialiste !). Merci aussi pour ton aide en fin de thèse. J'en profite aussi pour remercier Cocotte pour toute sa gentillesse.

Un BIG merci à Miches parce qu'il le vaut bien : pour ses multiples implications : capture des serpents, conception du matériel expérimental, aides stat...et parce qu'il est toujours prêt à aider...si je peux un jour te rendre la pareille, ce sera avec grand plaisir !

Enfin merci à mon p'tit Maxoubidou : eh oui, 3 ans de partage de bureau, ça fait des souvenirs : des échanges, des prises de becs, des fous-rire et des craquages....c'était vraiment chouette de partager tout ça avec toi mon p'tit lapin! Allez j'te fais un Shoulder Kiss, parc'que finalement on s'aime bien ?! ah par contre j'te remercie vraiment pas pour tes blagues dont la qualité (douteuse) s'effondrait lamentablement au fur et à mesure de l'avancée de la semaine et parce que le lundi, c'était déjà pas brillant. Mais bon c'est du détail...et pis oui c'est vrai, je suis bon public !

Enfin après 7 ans passés au laboratoire, cette thèse fut une formidable aventure humaine, avec des coups de cœur (parfois aussi des déceptions), alors je dis un grand Merci à :

La promo DEA 2005, c'est un peu vous qui m'avez donnée l'envie de rester ici ! JB, Audrey, La belle Cécile, Tom-Tom...et j'en passe.

L'auberge espagnole de Rimbault et ses multiples allées-venues (ça ce sont les dires de Fred A, une vraie langue de vipère celui-là ! au fait merci quand même Fred) : Tous ces souvenirs partagés avec Audrey J., petit gecko, et mon coup de cœur pour Léo et Cam's forcément.

Et enfin tous les étudiants que j'ai croisé depuis : Les Agropip (Steeeeeve, Salom, Viiiiictooooor, petit gecko, Alex, Benoit, Adrien ; Boenie, Vincent, Marie R ; Fabrice....), les prédateurs marrants (Morgane, Cécile, Débo, Cédric, Laurène, Paul, Annette, Clara, Fred B, Vincent....), et sans oublier les écophy bien évidemment (Stéphane, Andreaz, Sabrina...). La liste est longue donc par avance désolé pour les oublis, il est tard (trop)....

Merci aussi à ceux qui sont loin : Audrey, Cécile, Marine, Alex et Jess et ma petite Steph (je pense bien fort à toi-même si je donne peu de nouvelles)

Merci aux membres du club Ameroc avec qui j'ai passé de très bons moments, souvent en l'air ;

Merci aussi à Thibaut (espèce de carnivore ! j'm'en fous, j'continuerai à donner du melon à ton chien), Mathieu, Hélène et Maxoubidou pour ces derniers mois de réconfort, durant les pauses thés et autour d'apéros et de bons repas ! Merci aussi à Zézelle parce que je l'aime beaucoup aussi même si elle est pas toujours là (Madame préfère la ville, ben voyons !) et aussi à zézette parce que maintenant j'ai une nouvelle copine de piscine trop sympa (et qui est bien plus sportive que son « gros vilain » qui fait que du bain à remous ! bonjour les mycoses...)

Enfin Merci à mes amis d'à côté, parce que oui, faut pas croire, on a beau passer 7 ans dans un endroit isolé, les amis c'est sacré, et ailleurs c'est vital ! Alors je dirais mes plus sincères merci à :



Dom et Sandrine pour leur amitié. Bon Dom, Sam t'attend sur la falaise ! Mais fais gaffe y'a un varan au sommet !

Olivia pour cette belle découverte à l'escalade, pour être cette personne intègre et généreuse, pour son soutien également dans les moments difficiles ;

Camille et Léo (eh oui encore une fois, parce que du meilleur on ne se lasse pas) pour leur amitié sans faille ; et parce que c'est pour la vie ;

Flore parce malgré la distance, t'es toujours là.. .Merci pour ton soutien dans les coups durs ! et maintenant que j'ai fini cette thèse, t'inquiètes, je débarque !

Hélène, non j'rigole ! parce que t'as beau être blonde et faire des gaffes, j'te Krouchbouch' à mort !

Mes « vieilles copines » pour ces 20 années d'amitié, pour m'avoir toujours soutenue, malgré la distance et les routes divergentes ; parce que des histoires comme celles-là, on en a pas souvent dans sa vie, alors merci Marie, Clairette, Dee Dee, Charlotte et Juju.

Merci aussi à monsieur patate, même si ce fut dur, pour ce que tu m'as apportée, pour ces souvenirs pas toujours si pires, pour nos échanges de « Golden moly », nos éclats de rire....

Enfin le dernier et le plus grand des MERCI ira à ma famille, particulièrement à mes parents et Mimi, pour m'avoir toujours soutenue, jamais jugée, accepté mes choix de vie, pour m'avoir apportée tout cet amour.

A Robert, Raoul et Zdenka ...





« Tu traiteras avec les mêmes courtoisies serpents, scorpions, tarentules et toutes espèces de bêtes nuisibles.

Nuisible, tu l'es toi-même plus que la bête : est-ce toi-même que tu voudrais punir en elle ? Laisse-la partir, et tes malices avec elle. »

Lanza del Vasto,
Principes et Préceptes du Retour à l'Evidence.

RESUME

Influences environnementales précoces et régulation maternelle du développement: Implications écologiques et évolutives chez deux espèces de Squamates

Les organismes sont soumis aux fluctuations de l'environnement et les stades précoces (vie embryonnaire) sont particulièrement sensibles aux perturbations qui peuvent modifier les trajectoires développementales. La sensibilité thermique des embryons est une caractéristique générale chez les vertébrés et aurait constitué une force sélective majeure dans l'évolution des soins parentaux (hypothèse de Farmer, 2000). Par ailleurs, le développement embryonnaire est un processus complexe et les influences environnementales peuvent avoir des effets très différents selon la période d'exposition. Pourtant cette variabilité est insuffisamment prise en compte en écologie évolutive et dans l'étude des soins parentaux.

L'environnement maternel peut constituer une interface entre l'environnement extérieur et les embryons. La régulation des conditions thermique du développement est très répandue chez les vertébrés. Si les ectothermes produisent une chaleur métabolique négligeable, ils ont développé une diversité de stratégies comportementales et physiologiques pour protéger les embryons des variations thermiques. Les soins parentaux prénataux sont associés à un changement du comportement maternel avec une augmentation des activités de thermorégulation, ainsi qu'à de profondes modifications énergétiques et physiologiques.

Nous avons examiné l'importance de la régulation maternelle des conditions prénatales chez deux espèces de serpents aux modes de reproduction contrastés, une ovipare (python de Children, *A childreni*) et une vivipare (la vipère aspic, *V aspis*). L'originalité de ce travail repose sur la prise en compte du caractère dynamique de la sensibilité embryonnaire et des contraintes maternelles. Nos résultats nous ont permis de démontrer l'existence d'une sensibilité thermique stade-dépendent, avec une plus forte sensibilité aux perturbations en début de développement, et l'importance de l'accès à la température préférée pendant cette étape. En parallèle, nous avons pu mettre en évidence un investissement maternel important (thermorégulation comportementale), et les contraintes associées (augmentation des prises de risque, pertes hydriques, coûts énergétiques). Ces données obtenues soutiennent la théorie de Farmer et l'importance de la prise en charge maternelle des stades précoces. Cette sensibilité thermique pourrait avoir constitué une force sélective majeure dans la complexification des soins parentaux (transition vers la viviparité, soins aux œufs).

Mots-clés : Squamates, développement, température, soins parentaux prénataux, ovipares, vivipares.



SUMMARY

Early environmental influences and maternal developmental regulation: ecological and evolutionary implications in two Squamate species.

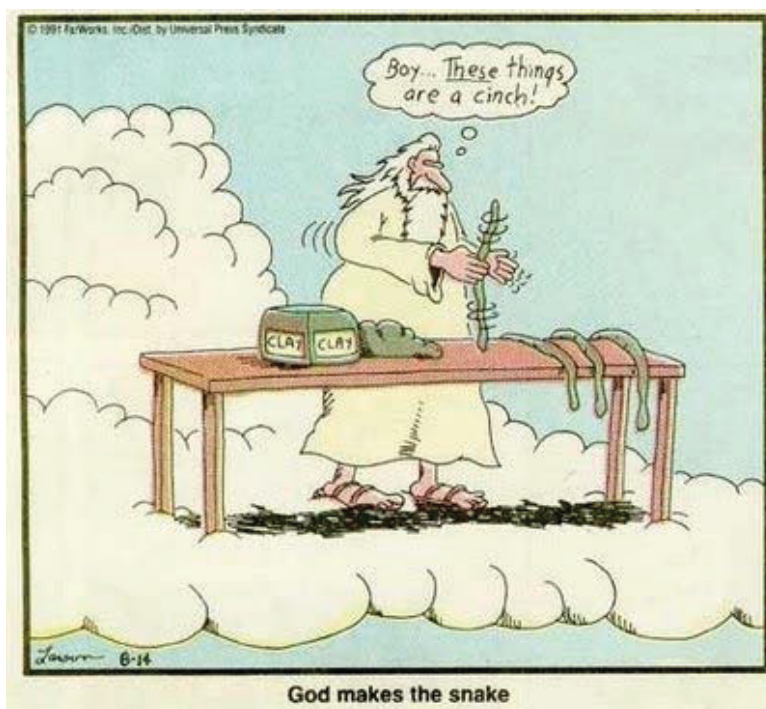
Organisms undergo environmental fluctuations and early stages (embryonic life) are especially sensitive to perturbations that can modify developmental trajectories. Embryonic thermal sensitivity is a universal feature in vertebrates and may have been a major selective force in the evolution of parental care (Farmer's hypothesis, 2000). Besides, embryonic development is a complex process and environmental influences can have contrasted effects depending on the timing of exposure. However this variability is insufficiently considered in evolutionary ecology and in studies on parental care.

Maternal environment can constitute an interface between the external environment and embryos. Regulation of thermal developmental conditions is widespread in vertebrates. Since ectotherms produce negligible metabolic heat, they have developed a diversity of behavioral and physiological strategies to buffer the embryos from thermal variations. Prenatal parental care is associated with a shift in maternal behavior with an increase of thermoregulatory activities, as well as strong physiological and energy modifications.

We examined the importance of maternal regulation of prenatal conditions in two snakes species with contrasted reproductive modes, one oviparous (Children's python, *A. childreni*) and the other viviparous (the aspic viper, *V. aspis*). The originality of this work stems from the explicit consideration of the dynamic nature of embryonic sensitivity and maternal constraints. Our results demonstrated (1) the existence of a stage-dependent thermal sensitivity, with a higher sensitivity to perturbations early in development; and (2) the importance of accessing preferred temperature during that period. In parallel, we evidenced a strong maternal investment (behavioral thermoregulation), and associated constraints (risk taking increase, water loss, energetic costs). Our data supported Farmer's theory and the importance of maternal regulation of early stages. This stage-dependent gradient in thermal sensitivity may have been a major selective force in the evolution of increased parental care (transition toward viviparity, eggs care).

Keywords: Squamates, Development, Temperature, Prenatal parental care, Oviparous, Viviparous.





SOMMAIRE



INTRODUCTION

-1-

1- Vivre dans un monde variable

-2-

1-1- Fluctuations spatio-temporelles de l'environnement

-2-

1-2- Plasticité phénotypique : répondre au changement par le changement

-3-

1-3- Influences environnementales précoces

-5-

2- Sensibilité du développement

-8-2-1-

Spécificités du développement embryonnaire

-8-

2-2- Périodes de sensibilité embryonnaire

-10-

2-3- La sensibilité thermique: une caractéristique universelle

-13-

3- Effets maternels et évolution des soins parentaux

-15-

3-1- Quand la mère devient l'environnement...

-15-

3-2- Soins parentaux et régulation du développement

-16-

3-2-1- Sensibilité thermique et évolution des soins parentaux

-16-

3-2-2- Les soins parentaux prénataux

-18-

3-2-3- Rôle des systèmes endocrines dans l'expression des soins parentaux

-20-

4- Sensibilité thermique des ectothermes et intérêt des reptiles Squamates

-22-

4-1- Cadre théorique

-22-

4-1-1- Notion de courbe de performance

-22-

4-1-2- Le cas des embryons

-23-

4-2- Les reptiles Squamates (lézards et serpents)

-25-

4-2-1- Diversité des moyens de régulation maternelle du développement

-25-

4-2-2- Sensibilité thermique du développement

-

29-

4-3- Les coûts associés à la prise en charge maternelle

-32-



4-3-1- Contraintes physiques, activité et exposition au risque	-32-
4-3-2- Contraintes énergétiques	-32-
5 - Problématique de la thèse et prédictions générales	-

33-

MATERIEL ET METHODES - 37-

1- Modèles d'études -38-

1-1- une espèce vivipare : la vipère aspic	-38-
1-1-1- Caractéristiques et répartition	-38-
1-1-2- Reproduction et nature des soins parentaux prénataux	-39-
1-2- Une espèce ovipare avec soins aux œufs: le python de Children	-42-
1-2-1- Caractéristiques et répartition	-42-
1-2-2- Reproduction et nature des soins parentaux prénataux	-43-

2- Matériel et techniques -46-

2-1- Manipulations thermiques expérimentales	-46-
2-2- Suivi échographique	-51-
2-2-1- Engagement dans la reproduction chez le python de Children	-51-
2-2-2- Ovulation et suivi du développement embryonnaire chez la Vipère aspic)	-52-
2-3- Suivis physiologiques	-54-
2-3-1- Suivis hormonaux et réponse au stress	-54-
2-3-2- Suivis énergétiques	-55-
2-3-3- Pertes hydriques totales et osmolalité	-56-
2-4- Suivi comportemental adulte	-56-
2-5- Mesures de la qualité phénotypique chez les jeunes	-58-
2-5-1- Morphologie	-59-
2-5-2- Physiologie	-60-
2-5-3- Performances	-61-
2-5-4- Comportement des nouveau-nés	-62-

RESULTATS - 65 -



Chapitre 1: Sensibilité thermique embryonnaire	-66-
Résumé du chapitre	-67-
Article 1: A good start in life: access to preferred temperatures during gravidity improves offspring quality in the Children's python (<i>Antaresia childreni</i>).	-70-
Article 2: The significance of thermal maternal effects: relevance of stage-dependent embryonic sensitivity.	-97-
Chapitre 2 : Régulation maternelle du développement	-124-
Résumé du chapitre	-124-
Article 3: Dedicated mothers: pregnant vipers invest in stage- independent and non-dépréciables care to their embryos	-127-
Chapitre 3 : Les coûts de la régulation du développement	-152-
Résumé du chapitre	-153-
Article 4: Structural and performance costs of reproduction in an extreme capital breeder, the Children's python, <i>Antaresia childreni</i>	-155-
Article 5: Modifications structurales et physiologiques associées à la gestation chez un reproducteur sur capital, la vipère aspic (<i>Vipera aspis</i>)	-172-
Annexe: résultats préliminaires des modifications physiologiques chez les femelles reproductrices de <i>A childreni</i>	-192-
Chapitre 4 : Régulation hydrique et contraintes maternelles	-195-
Résumé du chapitre	-196-
I- Quantification de la prise en eau chez <i>V aspis</i>	-197-
II- Impact de la gestation et de la température sur les pertes hydriques totales chez <i>V aspis</i>	-204-
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	- 214 -
1- Sensibilité thermique embryonnaire et bénéfices de la régulation maternelle	- 217 -
1-1-Sensibilité thermique du développement	-217-



1-1-1-Cadre conceptuel	-217-
1-1-2- L'importance de la température préférée (T_{set})	-218-
1-1-3-Sensibilité thermique embryonnaire stade-dépendent	-220-
2- La régulation maternelle : spécificités et contraintes	-222-
2-1- Des soins thermiques non-dépréciables	-222-
2-2- Des contraintes élevées	-223-
2-2-1- Altération structurale et réduction des performances	-223-
2-2-2- Contraintes hydriques	-224-
2-3- Besoins hydriques : un conflit potentiel ?	-226-
2-3-1- Sensibilité hydrique des embryons	-226-
2-2-2- Conflit hydrique foeto-maternel	-227-
3- Evolution des soins parentaux	-231-
4- Perspectives expérimentales	-233-
4-1- Mise en évidence d'une sensibilité thermique secondaire	-233-
4-2- Mise en évidence d'une sensibilité hydrique stade-dépendent	-234-
4-3- Mise en évidence d'un potentiel conflit hydrique parent-enfant	-235-
5- Ouverture conceptuelle : épigénétique et transmission héréditaire des influences environnementales	-235-
5-1- Epigénétique	-235-
5-2- Influences environnementales précoces et programmation épigénétique	-237-
5-3- Transmission héréditaire des phénotypes acquis : un nouvel apport dans la compréhension de la régulation maternelle du développement ?	-237-
Crédit photos	-240-
Bibliographie	-241-



Présentation des résultats

Les résultats de ce manuscrit seront abordés sous forme d'articles pouvant être soit en révision (Article 1), soit soumis (Article 2 et Article 4), soit en préparation (Article 3 et Article 5). Ils sont composés de 4 chapitres qui correspondent aux articles cités précédemment. Le chapitre 4 est présenté sous forme de résultats. Chaque chapitre est composé d'un résumé détaillé (en français) du ou des articles, et de l'article. Les articles sont listés ci-dessous :

- 1: **A good start in life: access to preferred temperatures during gravidity improves offspring quality in the Children's python (*Antaresia childreni*)** (En révision pour Journal of Experimental Biology).
- 2: **The significance of thermal maternal effects: relevance of stage-dependent embryonic sensitivity** (Soumis).
- 3: **Dedicated mothers: pregnant vipers invest in stage- independent and non dépréciables care to their embryos** (En préparation):
- 4: **Structural and performance costs of reproduction in an extreme capital breeder, the Children's python, *Antaresia childreni*** (Soumis).
- 5: **Modifications structurales et physiologiques associées à la gestation chez un reproducteur sur capital, la vipère aspic (*Vipera aspis*)** (En préparation, français).



INTRODUCTION



1- Vivre dans un monde variable

1-1- Fluctuations spatio-temporelles de l'environnement

Les organismes sont soumis à des variations spatio-temporelles, parfois extrêmement importantes, des paramètres biotiques ou abiotiques du milieu (Meyers and Bull 2002). Les fluctuations abiotiques sont représentées par des conditions climatiques et des traits physiques ou chimiques de l'environnement. Les fluctuations biotiques se manifestent quant à elles, par des changements dans la ressource et/ou l'abondance de proies, l'abondance de prédateurs ou de parasites, la compétition interspécifique. Les fluctuations temporelles peuvent avoir lieu sur des échelles de temps plus ou moins longues. A l'intérieur de ces échelles de temps, les variations peuvent se produire sur des pas de temps réguliers, comme il est observé pour les changements saisonniers ou nycthéméraux, ou bien au contraire présenter des variations irrégulières ou aléatoires. Les conséquences de ces modifications environnementales sur les populations (humaines et animales) ont attiré un intérêt scientifique considérable (Choi *et al.* 2011 ; Sheriff *et al.* 2011 ; Moyes *et al.* 2011). Ces variations de l'environnement biotiques et abiotiques vont affecter les traits des individus, aussi bien au niveau morphologique, que physiologique ou bien encore comportemental (Pigliucci 2005 ; Leimar *et al.* 2006 ; Monaghan 2008 ; Miaud *et al.* 2011 ; Brönmark *et al.* 2011). De manière ultime, au delà de l'échelle individuelle, la dynamique des populations peut également être affectée, avec des conséquences en termes de viabilité ou bien encore des conséquences sur les déplacements de certaines populations face à ces changements (Pulido 2007 ; Reed *et al.* 2010).



1-2- Plasticité phénotypique : répondre au changement par le changement

Tandis que certains organismes vont modérer la variabilité temporelle rencontrée, à travers des processus de migration ou de dispersion (Both and Marvelde 2007 ; Virkkala and Rajasarkka 2011), afin d'échapper à certaines conditions environnementales, l'une des options des individus pour répondre à ces fluctuations est de développer des caractéristiques susceptibles d'être en adéquation avec les caractéristiques de l'environnement vécu. En effet le milieu extérieur représente une force sélective majeure (sélection naturelle) dans l'évolution des caractéristiques phénotypiques des individus (Meyers and Bull 2002 ; Pigliucci 2005 ; Leimar *et al.* 2006 ; Monaghan 2008). La modulation du phénotype en fonction d'un environnement donné, également appelée plasticité phénotypique, est un processus majeur dans la réponse des organismes face aux fluctuations environnementales. La plasticité phénotypique se définit donc comme la capacité d'un génotype à produire différents phénotypes en fonction de l'environnement. En génétique quantitative, la variance phénotypique s'exprime sous la forme : $V_P = V_G + V_E + V_{G \times E}$, où V_P représente la variance phénotypique, V_G , la variance génétique, V_E , la variance environnementale et $V_{G \times E}$ la variance liée à l'interaction des gènes et de l'environnement. Ainsi, les variations environnementales, en interaction avec le génotype vont moduler l'expression phénotypique à l'échelle de l'individu tout au long de sa vie.

Cependant, il reste assez difficile d'estimer le potentiel adaptatif de telles variations, et tous les effets de l'environnement n'entraînent pas obligatoirement des modifications adaptatives (Fig.1). Les variations phénotypiques induites par l'environnement peuvent être liées à la température, l'acidité, l'alimentation (Fig.2), la disponibilité en eau, la densité de population, la présence de prédateurs ou de pathogènes, et à l'exposition à des toxines.



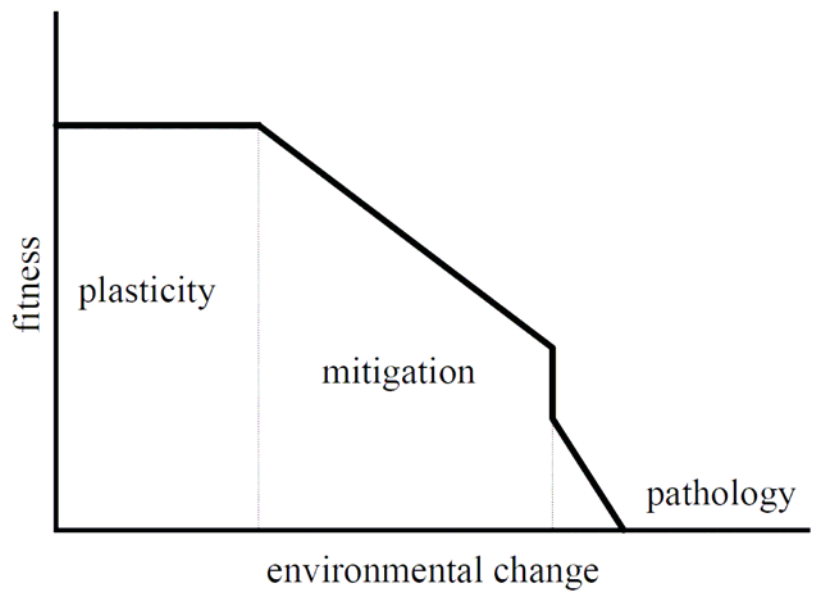


Figure 1. Effets d'un changement environnemental sur la fitness, à l'intérieur de la norme de réaction de l'espèce. Quand l'environnement change durant le développement (axe des abscisses), des changements phénotypiques seront déclenchés. Au sein d'une certaine gamme de changements, le développement d'un phénotype alternatif n'aura pas de conséquences négatives sur la fitness. Au delà de cette gamme, la fitness décline lorsque le développement d'un phénotype optimal est contraint. Le déclin de la fitness est initialement lent, puisque les ajustements phénotypiques pourraient mitiger les effets négatifs sur la fitness, et des compromis entre les traits, ou à travers les stades d'histoires de vie, pourraient apparaître. Au delà de cette zone de mitige, des pathologies se développent et la fitness chute dramatiquement.

Source : Monaghan 2008.



Figure 2. Changement développemental du crâne dépendant du régime alimentaire chez des hyènes tachetées sauvages. Les crânes collectés après la mort des animaux (de droite à gauche), de 3 mois, 24 mois et 11 ans montrent des changements marqués des sites d'attachements des muscles liés à l'alimentation (crête sagittale, les pommettes, et le front). Chez les animaux élevés en captivité, qui se nourrissent rarement d'os, ces structures alimentaires sont peu développées ; les hyènes captives âgées ont des crânes qui ressemblent à ceux des jeunes.

Source : West-Eberhardt 2003



Les influences peuvent ainsi être néfastes pour les organismes avec pour résultat l'engendrement de phénotypes délétères (Hales and Barker 1992, Hales and Barker 2001), et/ou des conséquences plus ou moins long termes sur la fécondité future, le succès reproducteur ou bien même la survie elle-même de l'individu. Ainsi l'environnement va agir de manière complexe sur l'expression phénotypique des individus, entraînant des effets plus ou moins long termes, réversibles ou non, adaptatifs ou bien au contraire tératogènes. Ces effets restent étroitement dépendants de l'intensité et la nature du stimulus environnemental, mais également de la sensibilité individuelle.

Si les stades de la vie adulte peuvent développer des réponses phénotypiques adaptatives ou compensatoires face aux variations environnementales, les phases précoces de la vie (vie embryonnaire et vie fœtale) sont particulièrement sensibles. Classiquement, la notion de plasticité phénotypique au sens large peut se scinder en deux sous-catégories, selon l'échelle de temps considérée, et la labilité des modifications :

- La flexibilité phénotypique, consiste en des changements plus continus, et souvent réversibles, de la morphologie, du comportement, de la physiologie, lorsque les conditions environnementales varient rapidement sur de courtes échelles de temps (Piersma and Drent 2003 ; West-Eberhardt 2003) ; Elle traduit une plasticité durant la phase adulte.
- La plasticité développementale résulte d'une orientation, généralement irréversible, des traits des individus lors des processus ontogéniques. Elle traduit ainsi une plasticité lors des processus développementaux (vie embryonnaire et juvénile).

1-3- Influences environnementales précoces

Plasticité et développement sont deux termes étroitement liés qui ont été de plus en plus communément utilisés en écologie évolutive. Des progrès ont été réalisés afin d'intégrer le développement, à travers le domaine de la biologie développementale évolutive (Evo Devo, Arthur 2000 ; 2002). Dans le contexte de l'Evo-Devo, la plasticité développementale devient un point central, comme étant la base de la reconnaissance que les phénotypes des organismes ne sont pas uniquement déterminés par leur génotype. Le développement phénotypique est le résultat d'une interaction complexe impliquant la base génétique propre à l'organisme et l'environnement dont il fait l'expérience durant son développement. Si la production de phénotypes est conditionnelle et dépendante de contributions environnementales ou externes, alors l'évolution peut procéder par une voie favorisant « le phénotype en premier », les changements génétiques suivant, plutôt qu'initiant la formation de nouveautés morphologiques ou phénotypiques. Ainsi l'environnement est susceptible d'induire des modifications morphologiques, physiologiques de l'individu en développement et serait ainsi responsable de l'évolution de réponses adaptatives plastiques



morphologiques chez les animaux (West-Eberhardt 2003). Cependant cette capacité implique que les indices de l'environnement agissent suffisamment tôt dans l'ontogénie pour générer le développement d'une morphologie appropriée. Par ailleurs, ces indices doivent être suffisamment prédictifs des circonstances futures, à la fois dans le temps et dans l'espace.

Les champs d'investigation sur l'étude de la plasticité développementale, incluent notamment les polyphénismes morphologiques densité-dépendant, l'altération des taux de développement induite par la présence de prédateurs, les progressions au cours du cycle de vie contexte-dépendant (par exemple, la métamorphose dépendante de la température (Fig.3a et 3b) et la photopériode), la résistance des œufs aux radiations (Marco *et al.* 2001 ; Belden *et al.* 2003), l'alimentation mais également l'implication des effets maternels. Une autre forme bien étudiée de modulation environnementale durant le développement est la détermination du sexe par la température. Ce mécanisme est connu depuis longtemps chez de nombreuses espèces de reptiles, chez qui le sexe n'est non pas déterminé génétiquement mais par la température de développement (Desvages *et al.* 1993 ; Pieau *et al.* 1999 ; Shine 1999 ; Valenzuela 2004).



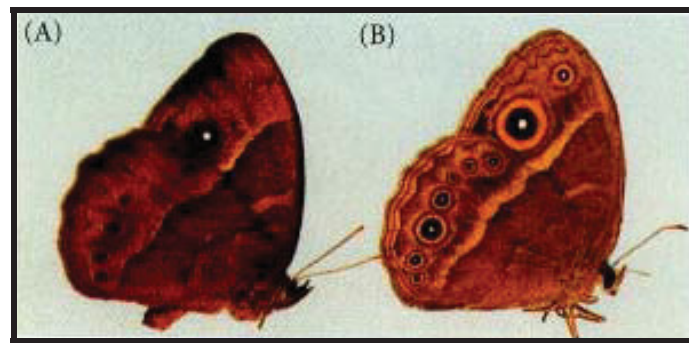


Figure 3a. Les deux morphes saisonniers du papillon, *Bicyclus anynana* de Malawi. (A) La forme de la saison sèche se confond avec les litières des feuilles mortes. (B) La forme de la saison humide a des ocelles bien visibles sous l'aile. La forme de la saison humide peut être mimée en élevant des larves à des températures élevées (23°C), tandis que les larves qui grandissent à des températures plus basses (17°C, approximativement la température au moment de la transition vers la saison sèche) développent le morphe de saison sèche.

Source : Gilbert 2000

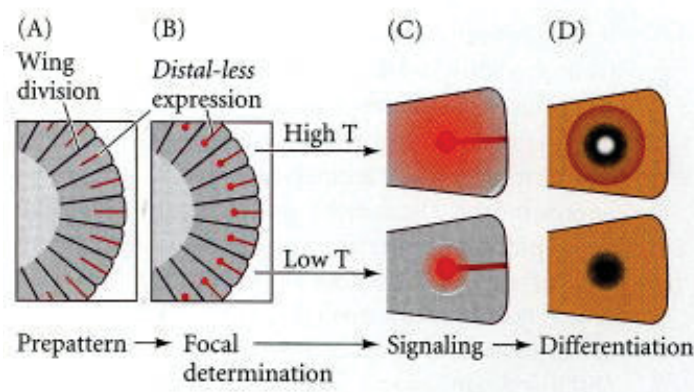


Figure 3b. Les stages développementaux conduisant à la formation des ocelles. (A) L'expression du gène *Distal-less* a lieu dans les régions du disque imaginaire de l'aile où les ocelles ont leur forme potentielle. (B) Les foyers de l'expression du gène *Distal-less* sont stabilisés dans des régions particulières de l'aile. (C) Dans la puppe, le foyer *Distal-less* s'agrandit. (D) Les cellules environnantes répondent au signal en produisant des pigments particuliers, dépendant de leur distance au foyer et leur position sur l'aile. Chez *Bicyclus*, les deux morphes sont indistinguables jusqu'au stade de signalment (C).

Source : Gilbert 2000



Il est également important de considérer que les changements induits ne présentent pas nécessairement un caractère adaptatif. En effet, les conditions de l'environnement précoce peuvent avoir un effet négatif sur les traits d'histoire de vie adultes, tels que la taille, la survie ou l'expression des caractères sexuels secondaires (Lindstrom 1999 ; Metcalfe and Monaghan 2001). Cependant, les organismes sont capables d'emprunter des stratégies compensatoires pour contrebalancer certains effets des conditions défavorables initiales (Niecieza and Metcalfe 1997 ; Birkhead *et al.* 1999), par exemple en développant une croissance compensatoire après la naissance (Metcalfe and Monaghan 2001). Alternativement, les actions de l'environnement peuvent avoir pour conséquences des effets tératogènes sur l'organisme en développement, sans possibilité de compensation. En effet, les embryons ne sont pas toujours en mesure de répondre favorablement aux indices environnementaux notamment lorsque les perturbations sont trop importantes. Il apparaît également essentiel de considérer que la nature et l'amplitude des perturbations, et le moment auquel elles se produisent au cours de l'ontogénie, conditionnent les réponses possibles des individus.

2- Sensibilité du développement

2-1- Spécificités du développement embryonnaire

La biologie moléculaire et la biologie du développement ont permis de développer les connaissances en embryologie. Notamment, la biologie moléculaire a été un outil essentiel dans la détermination de la base génétique des patrons de développement (Holland and Hogan 1988 ; Murtha *et al.* 1991 ; Krumlauf 1994 ; Lawrence and Morata 1994). Les phases précoces de la vie constituent des étapes majeures dans la constitution des individus (Henry and Ulijaszek 2009 ; Andrews 2004). Notamment, la vie embryonnaire est particulièrement sensible aux fluctuations de l'environnement de développement (Chasnoff *et al.* 1987 ; Henry and Ulijaszek 2009). Le développement embryonnaire est relativement conservé chez les vertébrés, particulièrement chez les oiseaux et les reptiles, et se caractérise par un processus continu et multi-phases constitué de grandes étapes (Andrews 2004 ; Fig.4). Les étapes précoces correspondent aux phases de neurulation et d'organogénèse, tandis que les phases plus tardives se caractérisent par des processus de croissance et de maturation.



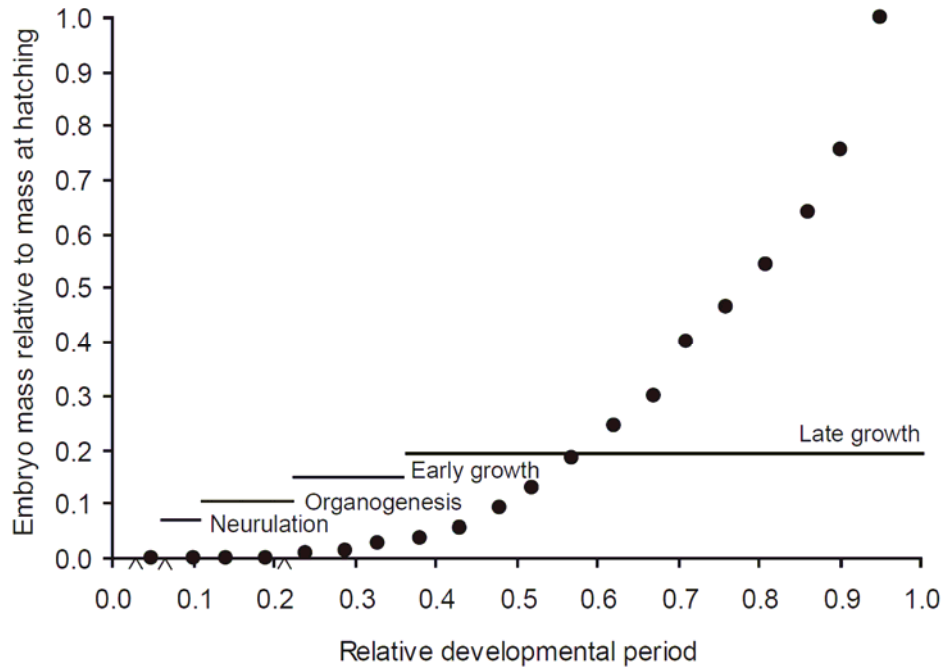


Figure 4. Différenciation et croissance (masse vivante) chez l'embryon de poulet. Les axes sont la proportion de la masse finale obtenue à l'éclosion (Y) et la proportion de la période totale de développement accomplie (à partir de l'ovulation). Les points noirs représentent les jours consécutifs de développement pour l'embryon d'oiseau. La gastrulation a lieu du jour 0 au jour 1. La forme de la courbe de croissance et les stades de développement associés sont typiques des reptiles et des oiseaux. Les trois accents circonflexes (^) sur l'axe des X, de gauche à droite, indiquent le stade moyen à l'oviposition, chez les tortues, les crocodiles et les reptiles squamates.

Source : Andrews 2004.



2-2- Périodes de sensibilité embryonnaire

Les effets environnementaux sur le développement physique et psychique des humains sont considérables et ont été bien documentés (Henry and Ulijaszek 2009). Cependant, les conséquences à long-terme des processus ayant eu lieu pendant les phases de croissance et de développement ont suscité un intérêt plus tardif, mais sont devenus plus récemment, un questionnement central dans de nombreuses études (Lumma 2003 ; Gluckman *et al.* 2007 ; Somm *et al.* 2008). L'environnement précoce dans lequel nous grandissons (vie embryonnaire, fœtale et enfance) a des conséquences à long-termes et souvent irréversibles tout au long de la vie. Chez les humains, les conditions nutritives (abondance et qualité) pendant la vie utérine prédisent l'apparition de maladies chroniques durant la vie adulte (« Thrifty phenotype hypothesis », Hales and Barker 1992 ; Hales and Barker 2001 ; Wu *et al.* 2004). Ainsi le stress dû à la sous-alimentation peut induire à l'âge adulte des individus plus petits, plus sensibles aux maladies, avec une plus faible espérance de vie (Goode and Russell 1968, Ewert 1991, Lumma 2003 ; Andrews 2004, Gluckman *et al.* 2007, Fig.5). Les effets des substances toxiques, tels que la nicotine (Somm *et al.* 2008), ou bien l'alcool (syndrome d'alcoolisation fœtale; Sulik *et al.* 1981 ; Kenneth and Jones 1986) ont également été bien étudiés, et impliquent des conséquences irréversibles et long-termes sur les individus.



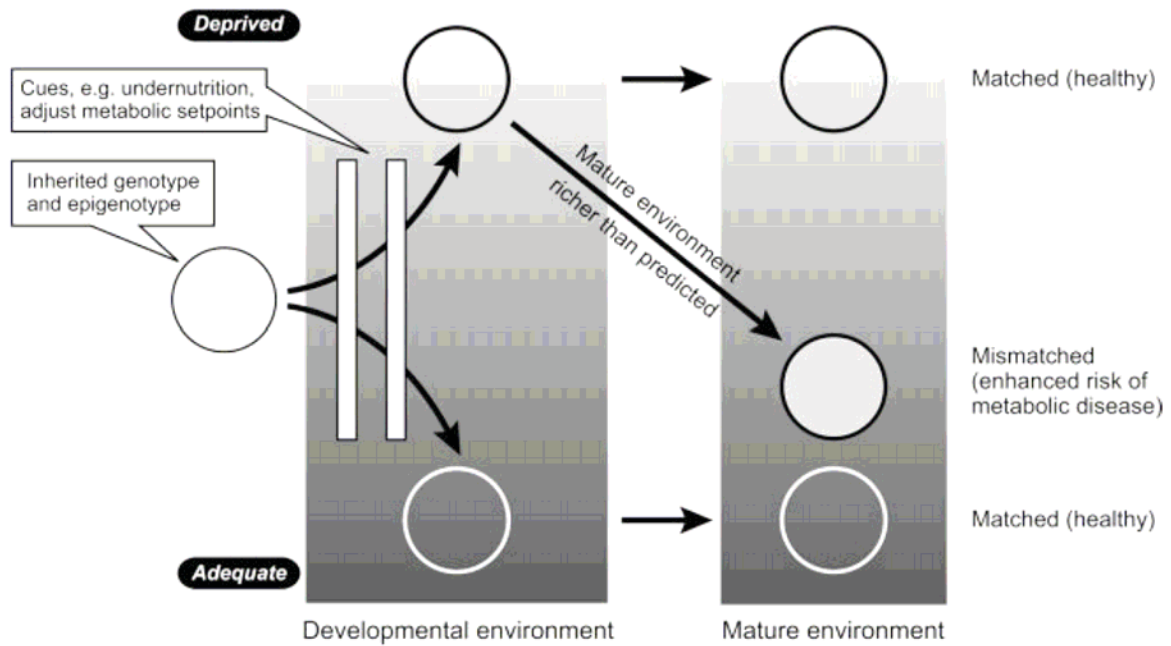


Figure 5. Le paradigme coïncidence-décalage des maladies métaboliques. L'organisme en développement détecte les indices environnementaux transmis par la mère, tels que la sous-alimentation, pendant la vie prénatale et la vie postnatale précoce. En réponse à ces indices, la plasticité développementale modifie la trajectoire par défaut définie par le génome fœtal et l'épigénome hérités, selon si l'environnement est perçu comme étant adéquate (fond foncé) ou défavorisé (fond clair), résultant en l'ajustement des réglages métaboliques. Si l'environnement adulte qui s'en suit, qu'il soit adéquat ou défavorable, coïncide avec la prédiction, alors le risque de développer des maladies métaboliques plus tard dans la vie est faible. Si un décalage existe entre les environnements adultes prédits et réels, particulièrement si l'environnement adulte est plus riche que celui anticipé, alors le risque de développer des maladies métaboliques est augmenté.

Source : Gluckman *et al.* 2007.



Cependant, la sensibilité du développement apparaît variable entre les différents taxons : ainsi, le développement embryonnaire peut être temporairement stoppé comme réponse facultative aux conditions environnementales immédiates chez certaines espèces (Hébert 2002 ; Andrews and Donoghue 2004 ; Podrabsky *et al.* 2010). Ces mécanismes de diapause apparaissent notamment chez les insectes pour le passage de l'hiver, et chez certains mammifères, dans le cas d'implantation embryonnaire différée (Gilbert 2001). Malgré ces variations observées, la sensibilité embryonnaire reste une caractéristique universelle (Farmer 2000). Notamment les stades les plus précoces du développement apparaissent plus sensibles puisqu'ils correspondent aux processus majeurs d'organisation des individus (Henry and Ulijaszek 2009 ; Andrews 2004).

De manière plus spécifique, l'existence de périodes de sensibilité accrue au cours du développement a clairement été démontrée, à la fois chez l'humain (Henry and Ulijaszek 2009; Wells 2003 ; Mueller *et al.* 2006 ; Williams and Casanova 2010 ; Fig.6) et chez les espèces animales (Oxendine *et al.* 2006 ; Zambrano *et al.* 2006 ; Dumortier *et al.* 2007; Auperin and Geslin 2008; Denver 2009). Par exemple, la restriction maternelle en fer chez le rat entraîne des changements plus profonds chez le fœtus, durant le 1^{er} trimestre de développement, par rapport à un déficit en fer en fin de gestation (Mihaila *et al.* 2011). Au contraire, un déficit en vitamine D en fin de gestation entraîne une altération prononcée sur le développement du cerveau adulte chez le rat, par rapport à des déficits en début de gestation (O'Loan *et al.* 2007). Ces phases de sensibilité accentuée vont jouer un rôle primordial dans l'établissement de stratégies visant à canaliser les processus développementaux les plus contraints.



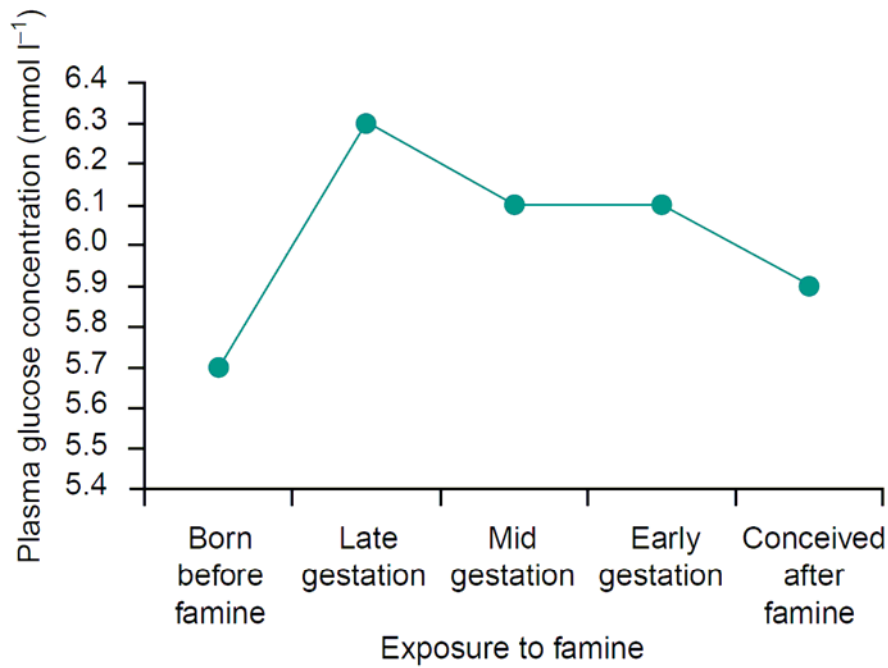


Fig. 6. Tolérance au glucose chez les humains adultes (âgés de 50 à 55 ans) en relation à l'exposition fœtale à la famine. Les valeurs sont les concentrations de glucose dans le plasma sanguin 120 minutes après la prise orale d'une dose de glucose ; les valeurs élevées indiquent une tolérance au glucose altérée. Une exposition à la famine en tant que fœtus conduit à une intolérance au glucose significative à un âge adulte moyen en comparaison aux adultes « contrôle » qui sont nés avant la famine, ou qui ont été conçus après la famine ; ceci est particulièrement vrai pour une exposition en fin de gestation ($P < 0.006$, basé sur 702 adultes).

Source : Metcalfe and Monaghan 2001.

2-3- La sensibilité thermique: une caractéristique universelle

La température est un paramètre abiotique majeur qui influence directement la vitesse des réactions chimiques et la physiologie de tous les organismes. La sensibilité thermique embryonnaire est une caractéristique universelle chez les vertébrés (Deeming and Fergusson 1991 ; Farmer 2000 ; Gillooly and Dodson 2000) mais est également bien documentée chez les invertébrés (Johnston and Benett 1996; Byrne *et al.* 2009). Le taux de développement embryonnaire est ainsi fortement influencé par la température (Gillooly and Dodson 2000; Gillooly *et al.* 2002, Fig.7).

Des pressions de sélection élevées pour réguler les conditions de développement pourraient avoir contribué à l'évolution des stratégies des soins parentaux chez les vertébrés (Farmer 2000).



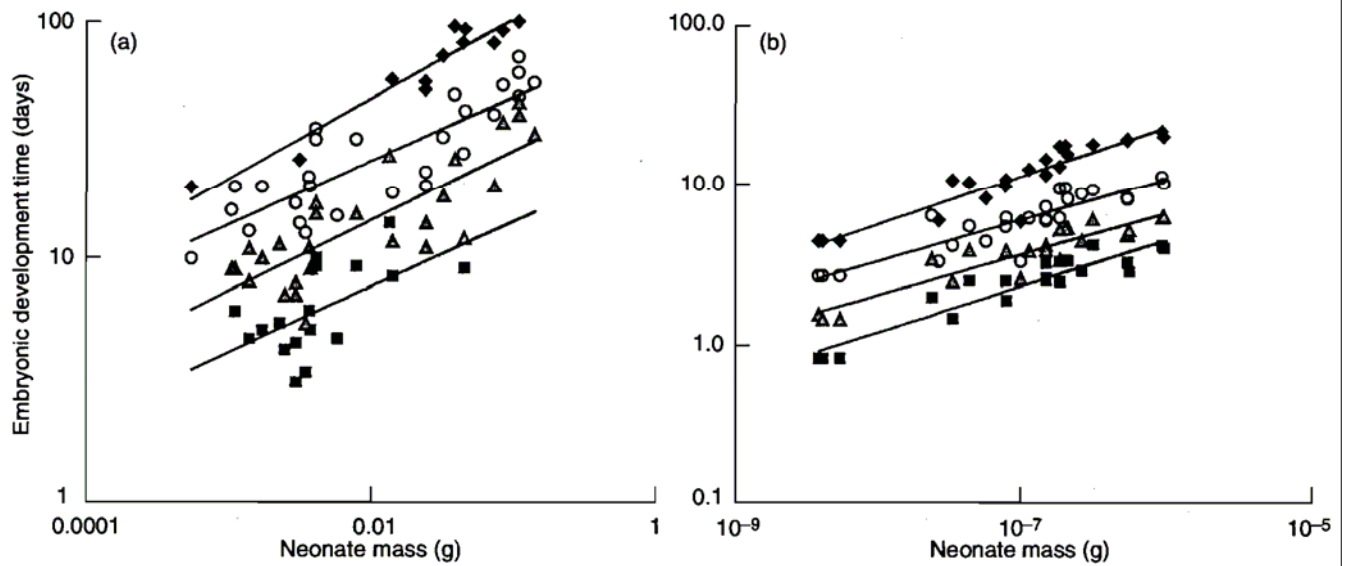


Figure 7. Durée de développement embryonnaire en fonction de la masse des embryons pour : (a) : les amphibiens et les poissons et (b) le zooplancton, incubés à 4 températures constantes (, 5°C ; ○ , 10°C ; △ , 15°C ; ■ , 20°C).

Source : Gillooly and Dodson 2000.



3- Effets maternels et évolution des soins parentaux

3-1- Quand la mère devient l'environnement...

L'environnement de développement peut être largement influencé par la mère chez une diversité d'organismes. En effet, les embryons se développent généralement, tout ou partie, dans le corps de la mère, ou bien sont soumis à une diversité d'influences maternelles (De Fraipont *et al.* 2000 ; Uller and Olsson 2003 ; Müller *et al.* 2007 ; Love and Williams 2008 ; Gagliano and McCormick 2009 ; Okuliarova *et al.* 2011). L'ensemble de ces influences est classiquement regroupé sous le terme d'« effets maternels ». Ces effets peuvent également impliquer le père chez une diversité d'espèces (Clutton-Brock 1991) notamment avec inversion des rôles reproducteurs. Il serait donc préférable de parler d'« effets parentaux » au sens large.

Une définition consisterait à considérer les effets maternels comme « une part du phénotype des jeunes qui ne résulte pas de l'action de ses propres gènes, ni de l'interaction de ceux-ci avec l'environnement » (Bernardo 1996). A l'origine, les effets maternels étaient considérés comme des sources de variations problématiques (un « bruit de fond ») dans les études de génétique quantitative (Falconer 1981). Désormais les écologistes évolutifs reconnaissent les effets maternels comme étant l'une des influences les plus importantes sur le phénotype des jeunes (Bernardo 1996; Mousseau and Fox 1998). Ce terme est suffisamment large pour regrouper une diversité d'effets qui relèvent soit des influences maternelles directes, soit des influences de l'environnement via la mère (Fox *et al.* 1997; Agrawal *et al.* 1999; Groothuis *et al.* 2005; Marshall and Uller 2007 ; Marshall *et al.* 2008 ; Latzel *et al.* 2010 ; Burgess and Marshall 2011). La mère peut donc être vue comme une interface entre les influences de l'environnement extérieur et les embryons en développement.

Les effets maternels peuvent donc influencer les cibles possibles de la sélection et permettre des réponses dynamiques face à des environnements hétérogènes (Mousseau and Fox 1998). Les effets maternels sont parfois interprétés comme un mécanisme permettant une réponse (présumée adaptative) des jeunes aux indices de l'environnement perçus par la mère (Mousseau *et al.* 2009 ; Marshall and Uller 2007). Lorsque les effets maternels augmentent la fitness des jeunes, on parlera de « plasticité phénotypique transgénérationnelle adaptative » ou encore d'« effets maternels anticipateurs ». Si la majorité des études considère traditionnellement les effets maternels comme une régulation active de la mère ayant une portée adaptative (aux conditions locales), les effets maternels peuvent également impacter négativement les embryons



en développement à travers par exemple, des influences passives (transmission de substances toxiques).

3-2- Soins parentaux et régulation du développement

3-2-1- Sensibilité thermique et évolution des soins parentaux

Les « soins parentaux » sont une forme particulière d' « effets parentaux » (Bernardo 1996) qui impliquent un investissement actif et comportemental de la part du (des) parent(s) visant à optimiser les conditions de développement des jeunes. Les soins parentaux sont extrêmement diversifiés dans le règne animal, aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés (Clutton-Brock 1991). La prise en charge des jeunes permet ainsi aux parents de garantir leur fitness en contrôlant l'environnement de développement et de croissance (pour les espèces à soins parentaux post-nataux) de leurs descendants. Chez les vertébrés, les soins parentaux post-nataux restent majoritairement l'apanage des mammifères et des oiseaux (reptiles aviaires) et intègrent les comportements de prise en charge alimentaire (lactation, approvisionnement en nourriture, Koteja 2000), de défense des jeunes, ou d'apprentissage (Clutton-Brock 1991). Généralement, il s'agit de soins dépréciables, c'est-à-dire que l'investissement parental dépend fortement de la taille de la nichée ou de la portée, et que les ajustements comportementaux (soins) des parents seront déterminés par le niveau de sollicitation des jeunes (Clutton-Brock 1991 ; Sinervo and Svensson 1998; De Heij *et al.* 2006; Harding *et al.* 2009).

Selon Farmer, l'endothermie (production endogène de chaleur) aurait initialement évolué comme un moyen de stabiliser l'environnement de développement pendant la vie embryonnaire (Fig.8) en raison de ses bénéfices substantiels en termes de succès reproducteur (survie embryonnaire, qualité phénotypique des jeunes, Shine *et al.* 1997, Farmer 2000). Chez les endothermes, les taux métaboliques élevés et la thermogénèse permettent le maintien de températures corporelles élevées. En outre, les changements physiologiques maternels pendant la période du développement embryonnaire réduisent la déviation de la température corporelle fœtale (Scribner and Wynneedwards 1994; Farmer 2000; Laburn *et al.* 2002). Selon Farmer, les bénéfices additionnels associés à l'évolution de l'endothermie, telle que la capacité d'une activité physique prolongée auraient ensuite permis l'émergence de soins parentaux post-nataux intensifs (Etape 2 du scénario, Fig. 8) incluant l'approvisionnement de nourriture à la progéniture, après la parturition ou l'éclosion.



Résultats- Chapitre 1 : Sensibilité thermique embryonnaire

Cette théorie est actuellement la seule fournissant une explication commune pour les nombreuses convergences entre les oiseaux et les mammifères (« sang chaud », soins parentaux intensifs). Signalons que la théorie de Farmer peut être testée empiriquement, au moins en partie. L'existence d'une sensibilité thermique élevée chez les vertébrés est une hypothèse centrale de la théorie de Farmer, et le début de la vie embryonnaire semble particulièrement sensible aux perturbations. L'étude de certains modèles peut fournir des évaluations quantitatives de l'étape initiale de la théorie (Fig.8) et l'influence de la sensibilité thermique sur les stratégies parentales aux stades prénataux. Une des hypothèses associées à la théorie de Farmer est qu'une amélioration, même légère, des conditions de vie embryonnaire serait extrêmement avantageuse. Contrairement aux endothermes, les vertébrés ectothermes possèdent des moyens réduits de régulation physiologique de leur température. Ils sont donc particulièrement sensibles aux fluctuations thermiques de leur environnement. Cependant, si les vertébrés ectothermes produisent une chaleur métabolique négligeable, ils ont développé une diversité de stratégies parentales pour protéger les embryons en développement des variations thermiques.

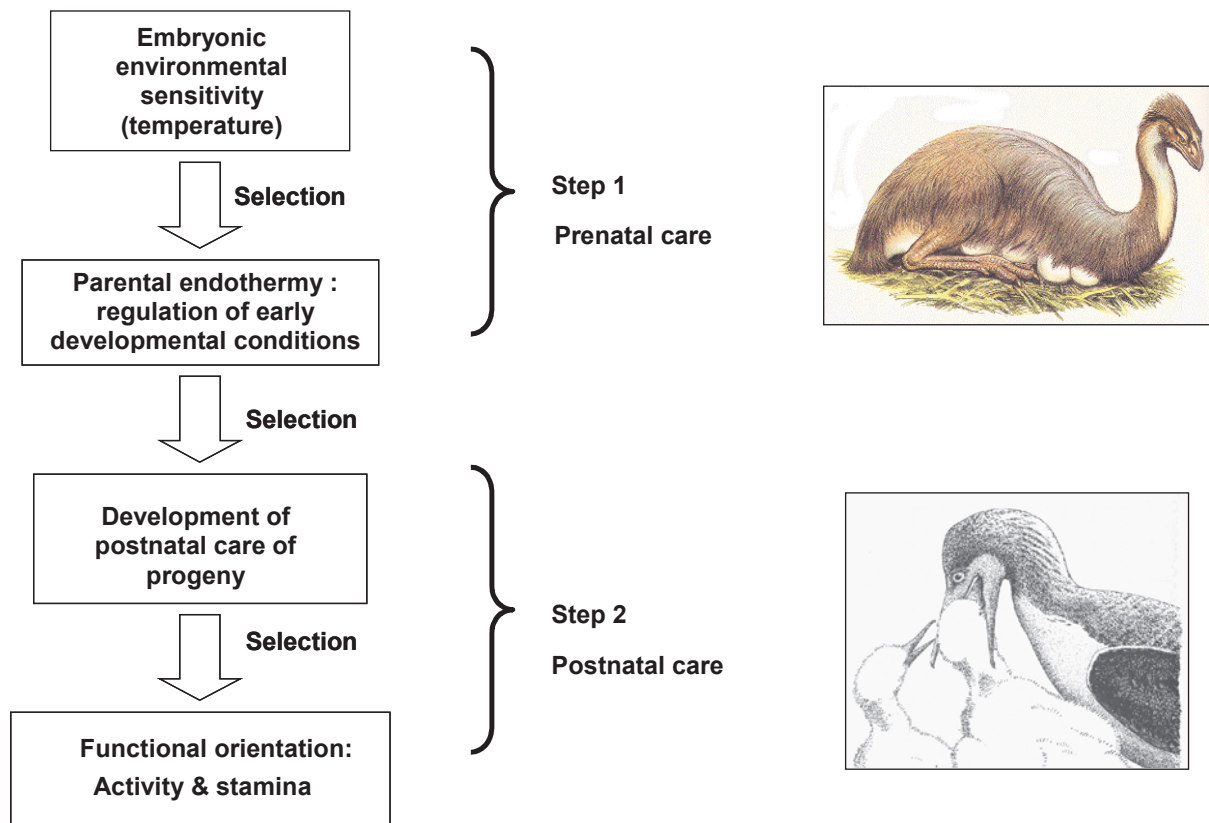


Figure 8. Selon la théorie de Farmer (2000) la production de chaleur interne aurait tout d'abord été retenue en raison des bénéfices associés au meilleur contrôle de l'environnement thermique des embryons (e.g., survie embryonnaire et qualité phénotypique). Le développement de l'endothermie aurait ensuite amélioré le succès reproducteur en permettant une augmentation d'activité parentale et l'expression de soins post-nataux intensifs.

3-2-2- Les soins parentaux prénataux

Souvent moins considérés et moins intuitifs, les soins parentaux prénataux consistent en une prise en charge des embryons en développement, de la conception à la mise-bas ou l'éclosion. Il existe une diversité de comportements parentaux visant à optimiser les conditions de développement embryonnaire. Ces soins vont s'exprimer selon un gradient d'investissement et de comportements, avec de fortes variations inter taxons. La première « prise en charge » parentale réside dans la formation des œufs et à la constitution des réserves énergétiques (Clutton-Brock 1991 ; Speake and Thompson 2000 ; Stewart and Thompson 2000), ou de l'alimentation directe chez les formes placentaires (Blackburn 2005 ; Blackburn 2006).

Les soins aux œufs (*sensus lato*) sont relativement répandus chez la plupart des espèces. On pourra ainsi définir plusieurs catégories de soins aux œufs (Fig. 9), selon la classification de Clutton-Brock (1991) :

(1) les soins aux œufs pondus directement sur le substrat ou attachés dessus, ou bien pondus dans les nids ou les terriers, comme on retrouve chez de nombreux invertébrés, poissons, amphibiens, et oiseaux (Peronne and Zaret 1979 ; Hinton 1981 ; Mc Diarmid 1978),

(2) les soins aux œufs attachés à l'extérieur ou portés par le(s) parent(s), tel que chez certaines espèces d'araignées, certains hémiptères, certains amphibiens ou certains poissons,

(3) la rétention des œufs fertilisés à l'intérieur du tractus reproducteur de la femelle, à travers un gradient de mode de reproduction entre espèces ovipares à rétention prolongée et espèces vivipares, au sein desquelles le développement des œufs se fait dans le corps de la mère tout au long du développement,

(4) soins des œufs dans le corps du parent, mais pas dans le tractus reproducteur.

Les « soins aux œufs » vont donc inclure la sélection de sites de pontes appropriés ou la construction de nids pour les espèces ovipares, le gardiennage et la protection des œufs, le transport, la couvaison chez certaines espèces, et le maintien de températures optimales de développement, soit par voie métabolique, soit par voie comportementale, notamment chez les espèces ectothermes.





Figure 9. Exemples de soins aux œufs. (a) : Gardiennage des œufs chez l’araignée crabe, *Misumenops asperatus*, (b) : Sterne néréis, *Sterna nereis*, couvant ses œufs, (c) Femelle calmar-agate, *Gonatus onyx*, transportant une masse d’œufs importante.

3-2-3- Rôle des systèmes endocrines dans l’expression des soins parentaux

Les systèmes neuroendocrines jouent un rôle fondamental dans l’expression des soins parentaux des vertébrés à travers un contrôle hormonal des aspects majeurs de la reproduction avec notamment, l’engagement/désengagement des parents et l’étendue de l’investissement maternel. Les mécanismes hormonaux sont donc des cibles directes de la sélection naturelle, (Sinervo and Litch 1991; Ricklefs and Wikelski 2002). Par exemple, chez les vertébrés, la réponse adrénocorticale s’exprime au travers d’un relargage d’hormones glucocorticoïdes (ex. : la corticostérone) et est régulée par l’axe hypothalamus/hypophyse/surrénales. Elle représente notamment un mécanisme endocrine important dans la régulation des compromis adaptatifs et de l’investissement reproducteur (Wingfield and Sapolsky 2003 ; Lendvai *et al.* 2007 ; Angelier and Chastel 2009 ; Fig.10). L’intensité de la réponse au stress peut être modulée selon l’étape de la vie de l’organisme (Lendvai *et al.* 2007). Par exemple elle peut être atténuée pour faciliter l’expression des comportements parentaux. La modulation de la réponse adrénocorticale maternelle apparaît comme un excellent outil pour détecter l’existence d’éventuels compromis entre l’optimisation de la qualité des conditions de développement et la survie parentale (Wingfield and Sapolsky 2003; Meylan and Clobert 2004, 2005; Lendvai *et al.* 2007). L’expression des comportements parentaux prénataux (exposition) devrait augmenter l’exposition aux sources extérieures de stress (prédateurs) et l’atténuation/suppression de la réponse au stress est peut être nécessaire pour permettre l’expression optimale des soins parentaux (Wingfield and Sapolsky 2003).



Figure 10. Niveau maximal de corticostérone en fonction de la manipulation de la taille de ponte durant la première tentative (a) ou la deuxième tentative (b) de reproduction, chez le moineau domestique, *Passer domesticus*.

Source : Lendvai *et al.* 2007.



4- Sensibilité thermique des ectothermes et intérêt des reptiles Squamates

4.1. Cadre théorique

Les ectothermes ne produisent généralement que très peu de chaleur métabolique. Ils présentent une forte sensibilité thermique car leur température corporelle dépend directement de la température du milieu extérieur. Cependant des mécanismes comportementaux de thermorégulation (héliothermie, thigmothermie), ou des ajustements posturaux leur permettent d'atteindre des températures compatibles à la réalisation de l'ensemble de leurs fonctions physiologiques (Angilletta 2009).

4.1.1 Notion de courbe de performance

Les performances des squamates ectothermes peuvent être modélisées sous forme de normes de réaction des performances en fonction de leur température corporelle (Huey and Slatkin 1976 ; Fig.11). La température corporelle exerce une influence sur des fonctions majeures telles que la locomotion, la digestion ou la croissance. La relation entre la température du corps et un type spécifique de performance est généralement décrite par une fonction asymétrique (Fig.11). Ainsi pour une performance donnée, la performance relative va progressivement augmenter avec la température pour se stabiliser autour d'une valeur maximale, et ensuite s'effondrer de manière plus abrupte. L'optimum thermique est la température du corps où la performance est maximale.

Ainsi la thermorégulation résulte d'un compromis entre des coûts et des bénéfices (Huey and Slatkin 1976). Le modèle d'optimalité de Huey and Slatkin prédit notamment que la thermorégulation est bénéfique seulement lorsque les coûts associés sont faibles. Ainsi les individus devraient se comporter d'une manière qui maximise leur gain énergétique net (c'est-à-dire, les bénéfices moins les coûts de la thermorégulation). Cependant les stratégies visant à optimiser la thermorégulation répondent à des contextes écologiques précis, mais répondent aussi à des facteurs intrinsèques tels que les préférences thermiques ou le statut physiologique. Ainsi, si les animaux thermorégulent de manière optimale, alors leurs performances devraient être optimisées, avec des bénéfices supposés en termes de fitness. Cependant, dans certains contextes, le pouvoir explicatif de ce modèle semble faible.



Figure 11. Relation classique entre température corporelle et performance chez les ectothermes. L'optimum thermique (T_0) est la température qui maximise la performance, et la largeur de la courbe de performance correspond à la gamme de températures permettant à la performance d'être égale ou supérieure à un niveau donné. Par exemple, la gamme de performance à 80% (B_{80}) est l'intervalle de températures au dessus de laquelle la performance est supérieure à 80% du maximum. Les seuils critiques minimum (CT_{min}) et maximum (CT_{max}) correspondent aux températures minimales et maximales entre lesquelles la performance est possible.

Source : Angilletta *et al.* 2002 (d'après Huey and Stevenson 1979).

4-1-2- Le cas des embryons

Les courbes de performance pour la survie durant les stades embryonnaires ou larvaires possèdent une forme qui diffère d'une courbe typique de performance (Angilletta 2009). Au lieu d'être asymétriques, ces courbes tendent à être plus symétriques avec des transitions très brusques entre la largeur de performance et les limites thermiques. Cette relation serait le résultat de l'inactivation réversible de protéines qui dirigent la division cellulaire (van der Have 2002 ; Fig.12). L'inactivation graduelle des enzymes avec l'augmentation ou la diminution de la température peut résulter en un seuil thermique pour la transcription. Si les protéines impliquées dans la transcription ne peuvent pas maintenir leur conformation fonctionnelle, l'embryon ou la larve devrait finir par périr.

Cependant, contrairement aux autres performances, la sensibilité thermique du développement embryonnaire chez les ectothermes ne semble pas toujours correspondre aux courbes de performances développées (Angilletta 2009), notamment pour la compréhension des variations latitudinales observées (Berven and Gill 1983 ; Lamb *et al.* 1987; Laugen *et al.* 2003).



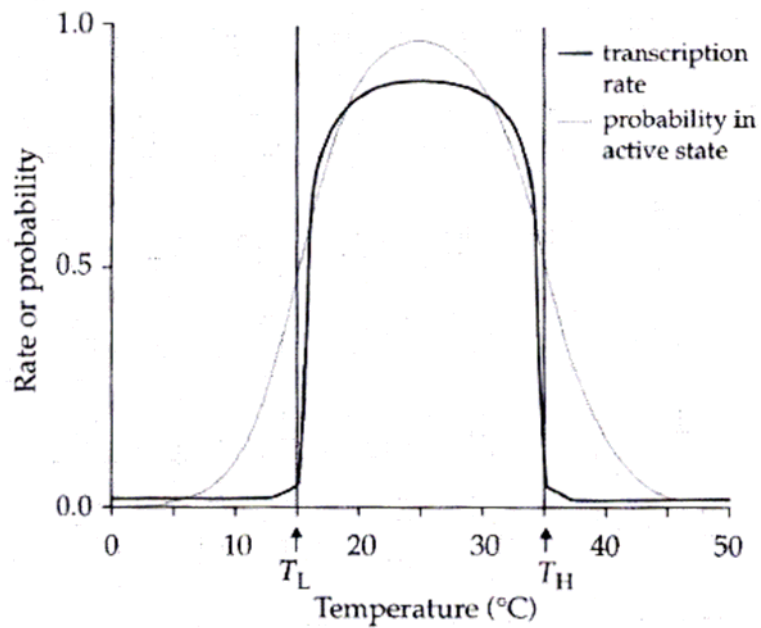


Figure 12. La température affecte la probabilité qu'un inducteur active la transcription d'un opéron. Le taux de transcription s'effondrent brutalement quand la température approche le point auquel le transducteur a la même probabilité d'être actif ou inactif.

Source : Angilletta 2009 (d'après van der Have 2002).



4-2-Les reptiles Squamates (lézards et serpents)

Les Squamates représentent une opportunité pour examiner les avantages sélectifs de la régulation des conditions de développement prénatales, indépendamment des bénéfices associés aux soins parentaux postnataux. Tous les oiseaux et les mammifères utilisent une combinaison de soins prénataux et postnataux, ce qui rend impossible la compréhension des bénéfices des soins prénataux sans prendre en compte l'investissement postnatal. Sans constituer une étape de transition dans l'évolution de l'endothermie, les stratégies de régulation prénatale des ectothermes peuvent aider à clarifier les avantages sélectifs d'une thermorégulation améliorée. Si les squamates produisent une chaleur métabolique négligeable, ils ont cependant développé une diversité de stratégies parentales pour protéger les embryons en développement des variations thermiques.

4.2.1. Diversité des moyens de régulation maternelle du développement

Les femelles reproductrices vont contrôler plusieurs aspects du phénotype de leurs jeunes, mais les voies par lesquelles elles vont exercer ce contrôle sont diversifiées. Le choix du partenaire ou les décisions d'allocation sont un moyen d'exercer ces influences maternelles et ont reçu un intérêt considérable (Shine 2004). Etant majoritairement lécithotrophes, les femelles investissent en premier lieu dans des réserves énergétiques placées dans les « œufs », qui contiennent tous les nutriments nécessaires à entretenir le développement des embryons (Deeming 1991). Ces réserves sont principalement constituées de lipides (Noble 1991 ; Speake and Thompson 2000) et leur utilisation est rapide durant les stades plus tardifs du développement embryonnaire, quand la croissance est maximale (Romanoff 1960).

Un autre procédé par lequel les femelles vont pouvoir modifier les attributs de leurs jeunes est de contrôler les conditions physiques (hydriques et thermiques) de l'environnement de développement.

Les espèces ovipares :

Chez les reptiles ovipares, la présence parentale auprès des œufs et des jeunes existe seulement chez un petit nombre de taxons (Shine 1988 ; Somma 1990, 2003). Le contrôle des conditions thermiques de développement va se réaliser à différents stades du développement :



Tout d'abord, la plupart des squamates retiennent leurs œufs dans les voies génitales pendant environ un quart de l'embryogénèse (Shine 1983 ; Blackburn 2005 ; Andrews 2004). La thermorégulation maternelle entre l'ovulation et la ponte est susceptible de modifier les conditions thermiques des embryons (Shine 1995 ; Shine 2006 ; Lourdais *et al.* 2008). Les femelles gravides montrent des comportements de thermorégulation accentués, ainsi qu'une modification de leurs préférences thermiques par rapport aux femelles non-gravides (Shine and Madsen 1996 ; Robert *et al.* 2006; Shine 2006; Webb *et al.* 2006 ; Lourdais *et al.* 2008). Chez certaines espèces, les femelles gravides vont sélectionner des températures plus élevées, tandis que chez d'autres, les températures choisies seront plus basses que celles maintenues à l'état non-reproducteur (Shine 1980 ; Charland and Gregory 1990 ; Andrews *et al.* 1997 ; Robert *et al.* 2006; Shine 2006; Webb *et al.* 2006). De manière plus anecdotique, certaines femelles pythons expriment un comportement typique de thermorégulation inversée (les deux tiers inférieurs de la face ventrale du corps étant retournés vers le haut ; Ross and Marzec 1990 ; Barker and Barker 1994 ; Lourdais *et al.* 2008), durant la phase de gravidité.

Juste avant la ponte, les femelles vont sélectionner des sites de ponte appropriés. En effet, des variations importantes des conditions thermiques et hydriques peuvent apparaître entre les différents sites de ponte potentiels (Packard and Packard 1988). Il apparaît que les femelles vont choisir de manière non-aléatoire les sites pour déposer leurs œufs (Bull *et al.* 1988 ; Shine and Harlow 1996 ; Warner and Andrews 2002 ; Stahlschmidt *et al.* 2011).

Chez certaines espèces, les femelles vont rester auprès des œufs, ce qui aurait pour bénéfice d'augmenter substantiellement le taux de survie des œufs (Hasegawa 1985). Ce comportement apparaît ainsi chez le scinque *Eumeces fasciatus*, où les femelles vont également transloquer les œufs à l'intérieur du nid afin de maintenir des conditions thermiques et hydriques favorables (Fig.13). Le comportement de couvaison chez les pythons pourrait fournir également des bénéfices thermiques aux œufs (Shine *et al.* 1997b ; Madsen and Shine 1999). Enfin chez certaines grandes espèces de pythons, les femelles vont pouvoir fournir à leur ponte de la chaleur métabolique produite par un processus de thermogénèse par tremblement (Vinegar *et al.* 1970 ; Harlow and Grigg 1984 ; Slip and Shine 1988).

La composante hydrique est également essentielle dans le développement embryonnaire (Packard 1991, 1999 ; Booth 2004), et de nombreuses études ont démontré que les œufs et les embryons des reptiles étaient fortement affectés par la disponibilité en eau de leur environnement (Packard 1991 ; Warner and Andrews 2002 ; Brown and Shine 2004). Le contrôle des conditions hydriques du développement par les femelles s'exerce notamment par la sélection de sites de pontes appropriés (Brown and Shine 2004 ; Stahlschmidt *et al.* 2011). Enfin, après la ponte,



certaines femelles vont rester auprès des œufs, qu'elles pourront déplacés au sein du nid afin d'optimiser les conditions de développement (Fig.12) Plus particulièrement, chez les pythons, les femelles vont présenter un comportement de couvaison des œufs jusqu'à l'éclosion (Shine 2004; Aubret *et al.* 2003 ; Aubret *et al.* 2005; Lourdais *et al.* 2007). Ce comportement serait à l'origine de la régulation hydrique de la ponte (Lourdais *et al.* 2007 ; Stahlschmidt *et al.* 2008a).

Fig. 13. Femelle *Eumecies fasciatus*
auprès de ses œufs.

Les espèces vivipares

Le mode de reproduction vivipare est apparu de façons indépendantes dans plus de 105 lignées distinctes de squamates ce qui est un cas unique chez les vertébrés (Blackburn 2005). Les bénéfices de la viviparité semblent associés à la thermorégulation maternelle accentuée qui garantiraient aux embryons l'accès à des températures plus élevées que celles disponibles dans les sites de pontes (Shine 1995 ; Shine 2004). La gestation modifie profondément les stratégies de thermorégulation des femelles (Shine 1980 ; Charland and Gregory 1990 ; Andrews *et al.* 1997 ; Robert *et al.* 2006; Shine 2006; Webb *et al.* 2006). Les femelles gravides allouent leur budget temps dans la thermorégulation (Shine 2006; Le Galliard *et al.* 2003a), modifient leur déplacements (Naulleau *et al.* 1996) et réduisent leurs prises alimentaires (voire cessent de s'alimenter ; Saint Girons 1952, 1957) Enfin, les températures sélectionnées par les femelles gravides apparaissent généralement bien plus stables, que celles sélectionnées par les femelles non-reproductrices ou les mâles (Shine 2006).

Les pressions de sélection responsables de la transition vers la viviparité chez les reptiles ont attiré un intérêt scientifique considérable : en premier lieu, la thermorégulation active des femelles confère des avantages en augmentant la vitesse de développement des embryons,



notamment sous les climats froids (« Cold climate hypothesis » ; Tinkle and Gibbons 1979; Shine and Bull 1979; Shine 1983b) et les bénéfices associés à une date de naissance précoce. L'autre avantage sélectif d'une prise en charge maternelle, sur l'ensemble de la durée du développement, est une amélioration de la qualité phénotypique des jeunes (« Maternal manipulation hypothesis » ; Shine 1995; Shine 2004b; Shine 2006).

Enfin la régulation hydrique du développement est également essentielle chez les espèces ovipares, et l'apport hydrique est fourni par les femelles gestantes. Des études ont ainsi montré une prise en eau conséquente des embryons en fin de développement (Dauphin-Villemant and Xavier 1986 ; Mathies and Andrews 1996) suggérant des besoins hydriques embryonnaires forts.

4.2.2. Sensibilité thermique du développement

Les squamates sont principalement lécithotrophes (Stewart and Thompson 2000 ; Blackburn 2005) et les influences maternelles pendant le développement sont majoritairement d'ordre thermiques (Tinkle and Gibbons 1979; Shine and Harlow 1993; Shine 1995; Bernardo 1996). Les conditions thermiques d'incubation vont ainsi affecter une diversité de caractéristiques des jeunes, détaillées ci-dessous.

Durée du développement

Les conditions d'incubation chez les reptiles vont tout d'abord conditionner la vitesse de développement des embryons, et ainsi la date d'éclosion des œufs (espèces ovipares) ou la date de mise-bas (espèces vivipares). Des conditions thermiques favorables augmentent la vitesse du développement, et entraîne des dates de naissance plus précoces. Des études ont montré qu'une naissance précoce serait favorable pour les jeunes notamment dans les régions tempérées (Olsson and Shine 1998a, 1998b; Shine and Elphick 2001; Lourdais *et al.* 2004b ; Warner and Shine 2007) où la dispersion et la recherche alimentaire conditionnent la survie hivernale (Altwegg *et al.* 2005). Une naissance précoce serait alors associée à une meilleure survie (Olsson and Shine 1998; Warner and Shine 2007) ainsi qu'un meilleur rendement reproducteur plus tard dans la vie adulte (Uller and Olsson 2010).

Morphologie

La morphologie peut être modifiée par les températures de développement et de nombreuses études ont rapporté des modifications de la taille corporelle et des proportions corporelles des



jeunes en fonction des variations des conditions d'incubation (Burger *et al.* 1987 ; Elphick and Shine 1998 ; Qualls and Andrews 1999 ; Ji and Braña 1999; Braña and Ji 2000 ; Parker and Andrews 2006). Les anomalies d'écaillures et de pigmentation sont également influencées par les conditions thermiques du développement (Vinegar 1973, 1974 ; Osgood 1978 ; Forsman *et al.* 1994; Shine *et al.* 2005; Löwenborg *et al.* 2010), les premières reflétant très probablement une perturbation de l'expression des gènes du développement (Löwenborg *et al.* 2010, Fig. 14). Enfin, chez certaines espèces de reptiles, le sexe des individus est déterminé après la conception par la température environnementale pendant l'incubation (Ewert *et al.* 1994 ; Lang and Andrews 1994 ; Pieau *et al.* 1999 ; Valenzuela 2004).

Fig. 14. Photographies de couleuvres à colliers (*Natrix natrix*) capturées dans la nature, issues de la collection du muséum d'histoires naturelles de Suède, montrant (a) des asymétries de l'écaillure ventrale et (b) une image aux rayons X illustrant des duplications de côtes, reflétées par la présence des asymétries ventrales.

Source : Löwenborg *et al.* 2010.

Comportement, performances et physiologie

De nombreuses études ont démontré l'influence des conditions d'incubation sur le comportement des nouveaux nés à la naissance tel que le comportement anti-prédateur (Burger 1989; Burger 1998; Downes and Shine 1999 ; Webb *et al.* 2001; Blouin-Demers *et al.* 2004), les comportements sensoriels (notamment via les sorties de langues qui permettent de collecter les informations chimiques de l'environnement ; Burger 1991 ; Aubret *et al.* 2003), les comportements alimentaires (Burger 1991 ; Shine *et al.* 1997), la thermorégulation (O'Steen 1998 ; Qualls and Andrews 1999; Blouin-Demers *et al.* 2000 ; Blumberg *et al.* 2002), ou bien encore les comportements sociaux ou reproducteurs (Gutzke and Crews 1988 ; Sakata and Crews 2003).



Les conséquences des conditions d'incubation sur les performances des jeunes ont également été largement abordées, parmi lesquelles les capacités de nage et les capacités locomotrices puisqu'elles peuvent conditionner les capacités à échapper à un prédateur ou au contraire à attraper une proie (Shine and Harlow 1996 ; Shine *et al.* 1997a ; Elphick and Shine 1998 ; Shine and Elphick 2001 ; Webb *et al.* 2001). Enfin, la physiologie des jeunes peut être modifiée sous l'influence de la température de développement, tel que le métabolisme (O'steen and Janzen 1999), les patrons de croissance (Qualls and Andrews 1999 ; Braña and Ji 2000 ; Wapstra 2000 ; Parker and Andrews 2006), mais également les processus liés à la mue (Burger *et al.* 1987 ; Burger 1989).

Survie

Pour la plupart des variables citées précédemment, il existerait un lien possible avec la fitness mais qui reste non prouvé pour la plupart des cas, même si certains traits ont été avancés comme étant de bons prédicteurs de la fitness (Forsman and Lindell 1993 ; Burger 1998 ; Sorci and Clobert 1999). Cependant le seul paramètre présentant un lien direct et évident avec la fitness est la survie. Ainsi des études ont reportées une mortalité différentielle des jeunes en relation avec les conditions thermiques de développement vécues (Burger and Zappalorti 1998 ; Shine and Harlow 1993 ; Brown and Shine 2004 ; Lourdaïs *et al.* 2004 ; Uller and Olsson 2010).

Un bénéfice de l'utilisation de ce groupe comme modèle d'étude est que, tandis que les fluctuations thermiques peuvent être néfastes ou même fatales aux embryons (Shine *et al.* 2003 ; Shine and Elphick 2001), la tolérance thermique est bien plus grande que chez les endothermes. Une telle plasticité fournit une excellente opportunité pour examiner comment une altération expérimentale des conditions d'incubation ou de gestation affecte la qualité des jeunes. De telles manipulations sont extrêmement difficiles, voire impossibles chez les vertébrés endothermes puisque même une légère variation de leur température corporelle est typiquement létale chez ce groupe, et la haute sélectivité thermique embryonnaire pourrait être une adaptation secondaire à la thermogénèse parentale.

4-3- Les coûts associés à la prise en charge maternelle

Chez les reptiles, les coûts associés à l'état reproducteur sont conséquents (Shine 1980 ; Madsen and Shine 1994 ; Bonnet *et al.* 1999 ; Bonnet *et al.* 2002 ; Bonnet *et al.* 2011).



4-3-1- Contraintes physiques, activité et exposition au risque

Tout d'abord la période de gravidité est associée à une charge physique significative (Shine 1980; Seigel *et al.* 1987; Brown and Shine 2004), qui engendre une diminution des capacités locomotrices des femelles (Lima and Dill 1990 ; Miles *et al.* 2000 ; Le Galliard *et al.* 2003a). Généralement, la reproduction est associée à un déplacement plus réduit ainsi qu'à une augmentation des activités de thermorégulation (Robert *et al.* 2006; Shine 2006; Webb *et al.* 2006 ; Lourdais *et al.* 2008). Couplée à la charge physique, cette exposition accrue est ainsi susceptible d'augmenter les risques de prédation (Pianka and Pianka 1970; Hertz *et al.* 1982; Schwarzkopf and Shine 1992; Webb and Whiting 2005 ; Bleu *et al.* 2010). Cependant certaines femelles modifient leurs activités de thermorégulation vers un comportement plus cryptique en situation de danger (Brodie 1989; Schwarzkopf and Shine 1992 ; Bleu *et al.* 2011).

4-3-2- Contraintes énergétiques

Des coûts énergétiques et métaboliques associés à la reproduction ont été clairement identifiés (Bonnet *et al.* 1999; Bonnet *et al.* 2002 ; Schultz *et al.* 2008). Chez les squamates, la gestation représente une période extrêmement coûteuse en énergie pour les femelles (Clutton-Brock 1991), et implique une fourniture en oxygène, en nutriments, en eau pour les embryons en développement. De nombreux coûts physiologiques ont également été recensés tels qu'un métabolisme augmenté (Ladyman *et al.* 2003 ; Lourdais *et al.* 2004b ; Schultz *et al.* 2008), associé à des modifications structurales liées aux mécanismes de protéolyse et lipolyses (Lourdais *et al.* 2004a). Ainsi chez de nombreuses espèces, la demande énergétique élevée associée à la reproduction induit une balance énergétique négative et les femelles se basent sur le catabolisme de leurs propres tissus afin de terminer la reproduction (Lourdais *et al.* 2004a). Ce coût est notamment pertinent dans le cas d'espèces vivipares dites « capital breeder » (Jönsson 1997 ; Bonnet 1998), dont l'engagement dans la reproduction se fait par accumulation de réserves énergétiques sur de longues périodes de temps, et lorsque ces réserves ont atteint un seuil suffisant (Bonnet *et al.* 1999 ; Bonnet *et al.* 2001a ; Bonnet *et al.* 2002).

5 - Problématique de la thèse et prédictions générales



Le but de cette thèse est d'examiner la sensibilité thermique du début du développement et de clarifier la signification des régulations parentales prénatales. Le développement embryonnaire et les comportements parentaux étant liés d'un point de vue fonctionnel, nous avons considéré dans cette thèse, ces deux facettes complémentaires :

Axe 1 : Etude de la sensibilité thermique embryonnaire

Peu d'études sur les reptiles se sont intéressées à la sensibilité relative des stades de développement hormis pour les cas d'études de la TSD. Comme suggéré par les modèles de TSD, les traits phénotypiques pourraient être également affectés à des stades spécifiques durant le développement.

Selon l'hypothèse de Farmer (2000), la sensibilité thermique des embryons (notamment en début de développement) est un trait général des vertébrés. Cette sensibilité aurait favorisé l'émergence de l'endothermie des oiseaux et des mammifères. Si cette théorie est valide, nous pouvons prédire que la sensibilité existe aussi chez les vertébrés ectothermes, caractérisés par des possibilités limitées pour réguler physiologiquement leur température corporelle. Des perturbations aux stades précoces devraient altérer les processus d'organisation et induire des cascades de changements phénotypiques (Wilson and Franklin 2002).

Dans ce contexte, nous prédisons que :

- (1) Des conditions thermiques sub-optimales en début de développement vont profondément altérer les plans corporels, le phénotype et le comportement et donc la "qualité" des jeunes.
- (2) La prédiction conjointe est qu'une amélioration parentale, même transitoire, des conditions précoces du développement devrait conduire à des bénéfices majeurs en terme de qualité de la progéniture.
- (3) Les stades de développement plus tardifs (vie fœtale) devraient être plus tolérants aux perturbations environnementales avec la possibilité d'ajustements phénotypiques, une fois que les étapes cruciales (organisation) se sont déroulées dans de bonnes conditions.

Axe 2 : Etude de l'expression des comportements et contraintes maternelles prénatales

L'étude de la régulation maternelle est une composante essentielle pour le test de la théorie de Farmer. En effet, selon cet auteur, une amélioration parentale, même transitoire des conditions de



développement devrait conduire à des bénéfices majeurs en termes de qualité de la progéniture. L'objectif de cette partie est de décrire l'expression de ces comportements et notamment leur évolution à mesure que le développement embryonnaire progresse, afin de tester l'existence d'ajustements maternels. Par ailleurs, il est important de mieux comprendre la nature de la régulation maternelle (conditions thermiques mais aussi l'allocation en eau) et les contraintes associées, notamment en termes de budget énergétique et hydrique. Ces éléments sont en effet essentiels pour évaluer la nature dépréciable ou non (c'est-à-dire la dépendance à la fécondité) de la régulation, et la nature des compromis auxquels les individus doivent faire face.

En parallèle, nous avons cherché à clarifier les modifications physiologiques endocrines associées à ces modifications comportementales. La modulation de la réponse adrénocorticale maternelle semble un bon outil pour détecter l'existence d'éventuels compromis entre l'optimisation de la qualité des conditions de développement et la survie parentale. L'expression des comportements parentaux prénataux (exposition) devrait augmenter l'exposition aux sources extérieures de stress (prédateurs) et l'atténuation/suppression de la réponse au stress est peut être nécessaire pour permettre l'expression optimale des soins parentaux (Wingfield and Sapolsky 2003).

Dans ce contexte, nos prédictions sont les suivantes :

- (1) Les femelles devraient s'investir dans la régulation du développement de leurs embryons notamment aux stades précoces (plus sensibles). Elles devraient limiter leur exposition et leur activité de thermorégulation en fin de développement.
- (2) La réponse au stress devrait ainsi être modifiée (i.e. atténuée) pour permettre un investissement substantiel dans la thermorégulation.
- (3) L'expression des soins parentaux prénataux devrait être coûteuse à la fois en termes de budget énergétique et hydrique.

Choix des modèles d'études

Nous nous sommes intéressés à deux reptiles Squamates (serpents), avec une espèce ovipare : le python de Children (*Antaresia childreni*) et une espèce vivipare, la vipère aspic (*Vipera aspis*). Le but n'était pas de réaliser une étude comparative entre ces deux espèces, mais plutôt de faire un



parallèle entre deux systèmes qui présentent des modes de reproduction contrastés, mais expriment des soins parentaux prolongés, de l'ovulation à la naissance des jeunes.

L'autre point commun à ces deux modèles est qu'il s'agit d'espèces à faible fréquence d'alimentation et spécialisées dans une faible consommation énergétique. Par ailleurs, leur reproduction est basée sur l'accumulation de réserves énergétiques sur de longues périodes (« Capital breeding »), dont la quantité conditionne l'engagement dans la reproduction (Jönsson 1997 ; Bonnet 1998 ; Bonnet *et al.* 1999). Cette particularité est ainsi généralement associée à une faible fréquence de reproduction.

Ces principales caractéristiques en font de bons candidats pour exprimer des soins parentaux intensifs. Enfin ces deux modèles d'études présentent des soins parentaux prénataux prolongés, avec d'une part une thermorégulation accentuée chez l'espèce vivipare (Ladyman *et al.* 2003) et durant la phase de gravidité chez l'espèce ovipare (Lourdais *et al.* 2008). Enfin les pythons couvent leurs œufs de la ponte jusqu'à l'éclosion des œufs. Cette thèse s'est un peu plus concentrée sur l'espèce vivipare, en raison des bonnes connaissances écologiques déjà disponibles sur l'espèce.



MATERIEL
ET
METHODES



1- Modèles d'études



1-1. une espèce vivipare : la vipère aspic

La famille des vipéridés (Oppel 1811) est divisée en trois ou quatre sous-familles. Elles sont réparties sur tous les continents excepté l'Océanie, et sont toutes constituées de serpents venimeux. La plupart des vipéridés ont un corps épais recouvert d'un grand nombre de petites écailles carénées, et une tête plus ou moins triangulaire. Le mode de développement est vivipare, mais peut être ovipare chez certaines espèces (Vacher and Geniez 2010). Parmi les vipéridés, le genre *Vipera* (Garsault 1764) regroupe 4 espèces en France : la vipère péliade, *Vipera berus* (Linnaeus 1758), la vipère de Seoane, *Vipera seoanei* (Lataste 1879), la vipère d'Orsini, *Vipera ursinii* (Bonaparte 1835) et la vipère aspic, *Vipera aspis*, (Linnaeus 1758).

1-1-1. Caractéristiques et répartition

La vipère aspic est un petit serpent venimeux (en moyenne 55 cm de longueur totale, 150g) avec une morphologie trapue et une tête relativement bien distincte du corps (Fig.1). Cette espèce est extrêmement polymorphe au niveau de la coloration, allant d'un fond clair à presque noir, avec l'existence d'individus mélaniques isolés. Le museau est légèrement retroussé. La vipère aspic est un chasseur à l'affût et tue ses proies par envenimation. Elle se nourrit majoritairement de micromammifères (98%).

Cette espèce a typiquement une répartition médio-européenne (Fig. 2). Ses extensions méridionales atteignent le nord de l'Espagne, la Sicile, la Calabre, et l'extrême nord-ouest de la Slovénie (Paysan *et al.* 2003). La vipère aspic est présente dans tous les massifs montagneux de son aire de répartition. Généralement, elle fréquente les coteaux boisés, les friches et les broussailles. Son affinité se tourne également vers les milieux bocagers (Vacher and Geniez 2010).





Figure 1. Vipère aspic.

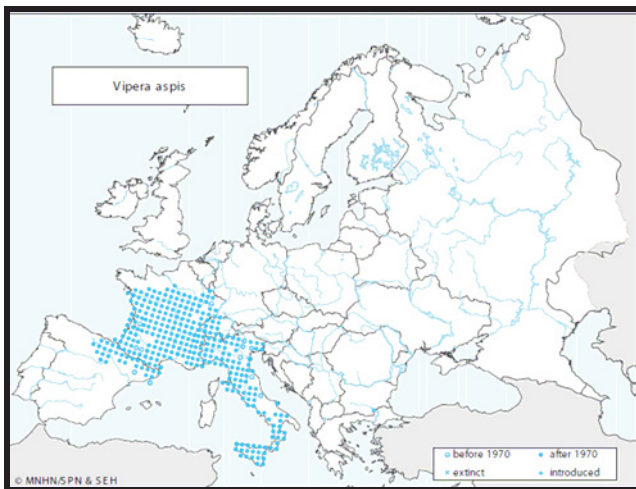


Figure 2. Carte de répartition de la vipère aspic.

1-1-2-Reproduction et nature des soins parentaux prénataux

La vipère aspic a fait l'objet de nombreux travaux (Saint Girons 1952, 1957, 1975, 1980; Saint Girons *et al.* 1985; Naulleau 1979, 1981, 1986, 1996, 1997; Bonnet *et al.* 1999, 2000, 2001, 2002 ; Lourdaïs *et al.* 2004b) notamment en ce qui concerne sa stratégie d'acquisition des ressources basée sur l'accumulation de réserves (Bonnet 1998). Cette particularité confère à cette espèce une faible fréquence de reproduction, tous les deux à trois ans. Cette espèce vivipare met au monde en moyenne 6 vipéreaux (de 1 à 22) après environ 3 mois de gestation. Pendant la gestation, la vie des femelles reproductrices va être affectée par de profonds changements comportementaux. Les femelles reproductrices deviennent nettement plus sédentaires et leur domaine vital se réduit considérablement. Enfin on constate une réduction, voir un arrêt des prises alimentaires (Saint-Girons 1952). Le cycle de reproduction de la vipère aspic (Fig. 3) est constitué d'une première phase d'allocation des réserves dans les œufs (phase de vitellogénèse). Le développement embryonnaire commence au moment de l'ovulation (vers mi-juin, Naulleau 1981), et se termine à la mise-bas en fin d'été (phase de gestation).



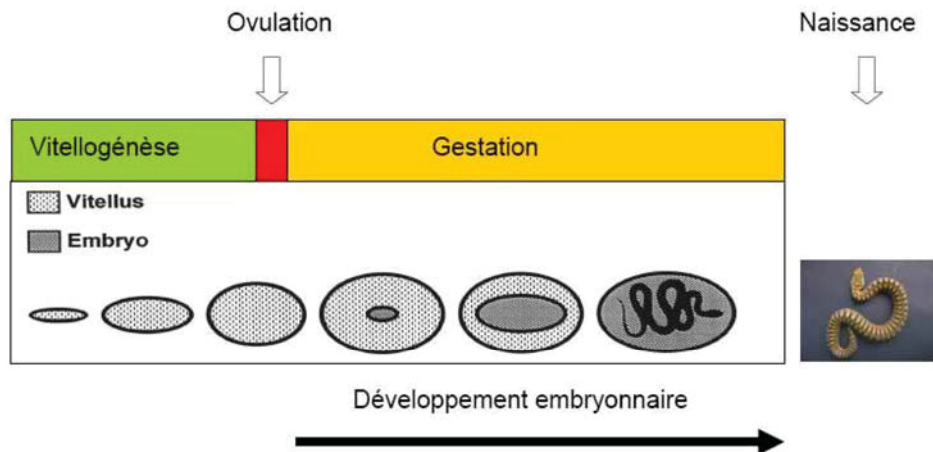


Figure 3. Cycle de reproduction de *Vipera aspis* (modifié de Bonnet *et al.* 2001)

La gestation entraîne des modifications écologiques et physiologiques profondes et non graduelles pendant toute la durée de développement embryonnaire. Elles vont présenter des optimums thermiques différents et plus élevés et passer significativement plus de temps que les non-reproductrices en thermorégulation (Naulleau 1997; Ladyman *et al.* 2003). Ceci s'accompagne d'une augmentation du métabolisme induisant des coûts énergétiques importants, et liés à la fécondité (Ladyman *et al.* 2003). Enfin, des études précédentes ont évoqué une sensibilité importante de la reproduction aux facteurs climatiques (Lourdais *et al.* 2002b ; Lourdais *et al.* 2004b). Ainsi les températures moyennes annuelles sont susceptibles d'influencer la durée de gestation chez cette espèce (Fig. 4), mais également, ont des conséquences sur le phénotype des jeunes à la naissance et sur leur taux de survie (Lourdais *et al.* 2004b).



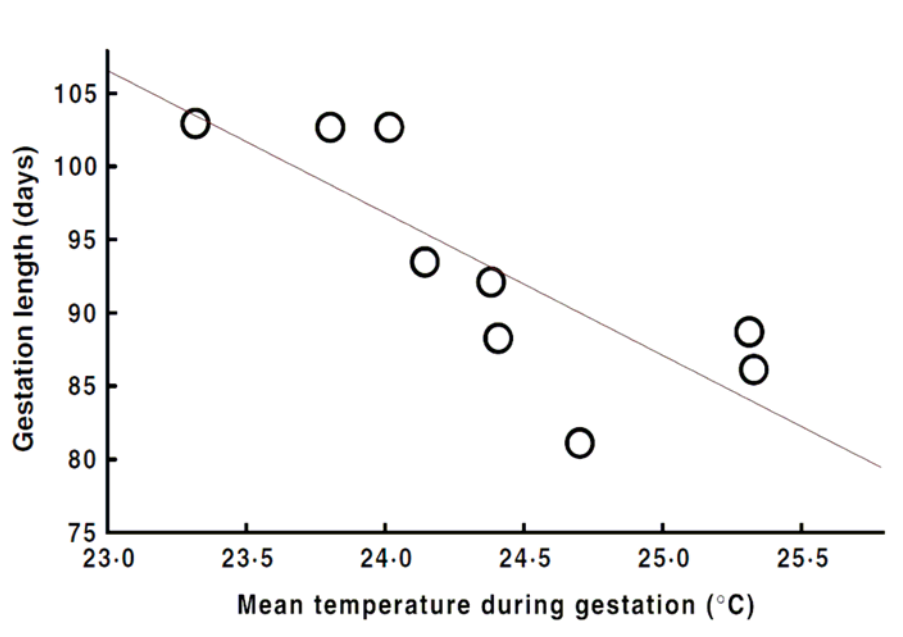


Figure 4. Influence de la température environnementale moyenne pendant la période de gestation (été) sur la durée de gestation chez des vipères en liberté. Pour plus de simplicité, le graphe montre la durée de gestation moyenne annuelle.

Source : Lourdaïs *et al.* 2002

Cependant si l'écologie de cette espèce a largement été étudiée, la majorité des études restent corrélatives. Notamment l'influence des conditions thermiques durant la gestation, et le choix des préférences thermiques des femelles gestantes durant la gestation ont principalement été évalués en conditions naturelles qui sont extrêmement fluctuantes sous les climats tempérés. Ainsi le but de cette thèse était d'obtenir des données complémentaires sur cette espèce en utilisant des conditions contrôlées, afin de définir précisément l'impact de conditions thermiques défavorables sur le développement embryonnaire, et d'accéder de manière fine aux modifications comportementales des femelles durant cette période (comportement et préférences thermiques).



1-2- Une espèce ovipare avec soins aux œufs: le python de Children

1-2-1- Caractéristiques et répartition

Les pythons sont des serpents non-venimeux qui tuent les proies par constriction. Le python de Children, *Antaresia childreni* (Gray 1842 ; Figure 5), est un serpent de taille moyenne (120cm, 600g). Le python de Children se rencontre au nord de l'Australie depuis Kimberley (Australie occidentale ; Fig.6) jusqu'au golf de Carpentaria, Queensland (Wilson and Swan 2003). Cette espèce affectionne les zones d'affleurement rocheux à proximité de prairies et de bois. Cette espèce est un chasseur à l'affût qui se nourrit de grenouilles, d'oiseaux et de mammifères (Shine and Slip 1990) et peut chasser des chauves-souris en étant partiellement suspendu dans les toits de grottes. Cette espèce tue ses proies par constriction. En captivité, elle se nourrit aisément de souris.



Figure 5. Femelle python de Children sur ses œufs. Les premiers ont déjà éclos et laissent apparaître plusieurs nouveau-nés sous la mère.



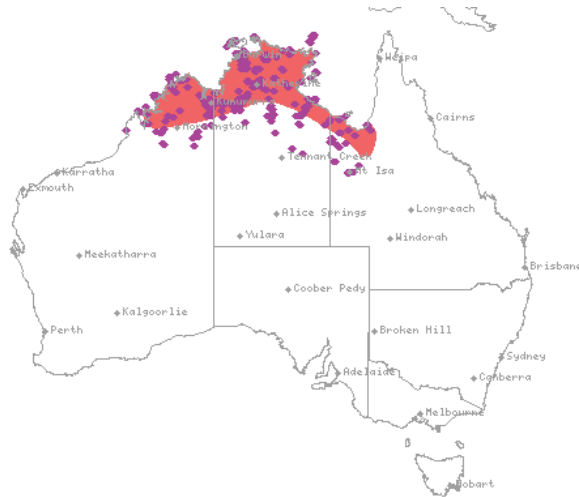


Figure 6. Aire de répartition du python de Children. Les points violets sont issus de la littérature et la zone rose représente l'aire de répartition estimée de l'espèce.

Source : 2008-2011 ReptilesDownUnder.com

1-2-2-Reproduction et nature des soins parentaux prénataux

Le cycle de reproduction du python de Children (Fig.7) se constitue d'une première étape d'allocation des réserves (vitellogénèse) dans les œufs. Le développement embryonnaire commence dès l'ovulation et se poursuit durant la phase de gravidité et l'incubation. Pendant la phase de gravidité, les œufs sont retenus dans les oviductes des femelles où les embryons effectuent un tiers de leur développement, jusqu'au stade 38 (Lourdais *et al.* 2008). Le python de Children pond généralement de 3 à 12 oeufs avec une moyenne de 6.5 (Shine and Slip 1990). La femelle s'enroule autour de sa ponte pour les protéger de la dessiccation (Lourdais *et al.* 2007) mais ne produit pas de chaleur pendant cette période. La durée d'incubation est en moyenne de 50 jours.



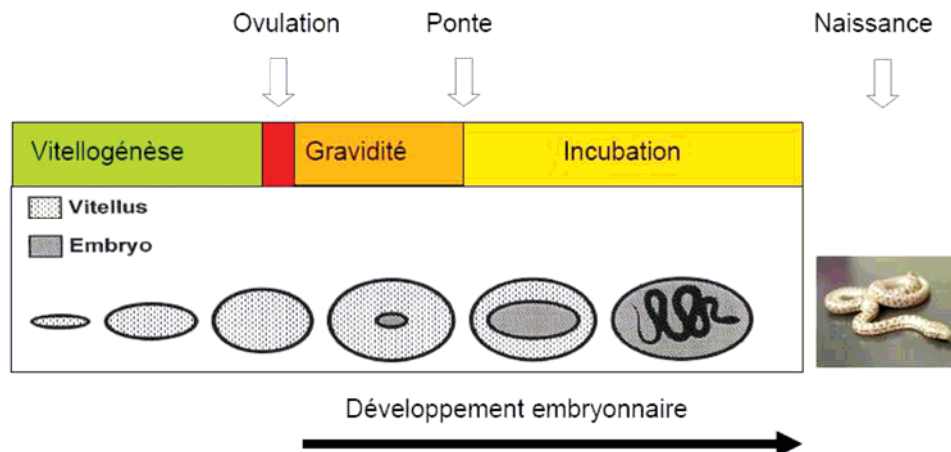


Figure 7. Cycle de reproduction du python de Children. (Modifié d'après Bonnet et al. 2001)

Les pythons tendent à pondre leurs œufs à un stade avancé, alors que les embryons ont effectué plus d'un tiers du développement (Shine 1983a; Lourdais *et al.* 2008 ; Fig.8). Il existe pendant la phase de gravidité (période entre l'ovulation et la ponte) des modifications du comportement maternel avec une thermorégulation accentuée (Lourdais *et al.* 2008), afin de réguler les conditions du développement embryonnaire. Les femelles gravidés maintiennent des températures corporelles plus élevées et moins variables que les femelles non reproductrices (Fig.9). On observe par exemple un comportement spécifique avec le corps en position « inversée ». La femelle a donc la possibilité de contrôler les conditions thermiques en début de développement embryonnaire par la thermorégulation comportementale, à l'image d'une espèce vivipare.

Les pythons présentent également des stratégies parentales spécifiques avec un comportement de « couvaie » qui a largement été étudié (Vinegar 1970; Harlow and Grigg 1984; Slip and Shine 1988; Lourdais *et al.* 2007; Stahlschmidt *et al.* 2008a, 2008b). Ainsi, après l'oviposition, les femelles s'enroulent autour de la ponte jusqu'au point de couvrir entièrement toute la surface des œufs (Shine 2004a ; Aubret *et al.* 2005b ; Lourdais *et al.* 2007). Ces comportements permettent d'éviter les fluctuations environnementales (hydriques et thermiques) comme cela a été démontré dans des études précédentes (Madsen and Shine 1999 ; Lourdais *et al.* 2007 ; Stahlschmidt *et al.* 2008a). Certaines espèces sont même capables de produire de la chaleur par des contractions musculaires régulières (thermogénèse par tremblement ; Vinegar 1970 ; Slip and Shine 1988).

Figure 8. Photographie d'un œuf *Antaresia childreni* ouvert peu de temps après l'oviposition (< 3h). L'embryon reposait sur son côté gauche. Les yeux étaient pigmentés, les mâchoires inférieures sont bien définies et la queue montre 5 spires distinctes. Les lignes sombres sous la coquille intacte correspondent au réseau circulatoire des membranes chorio-allantoïques.

Source : Lourdais *et al.* 2008

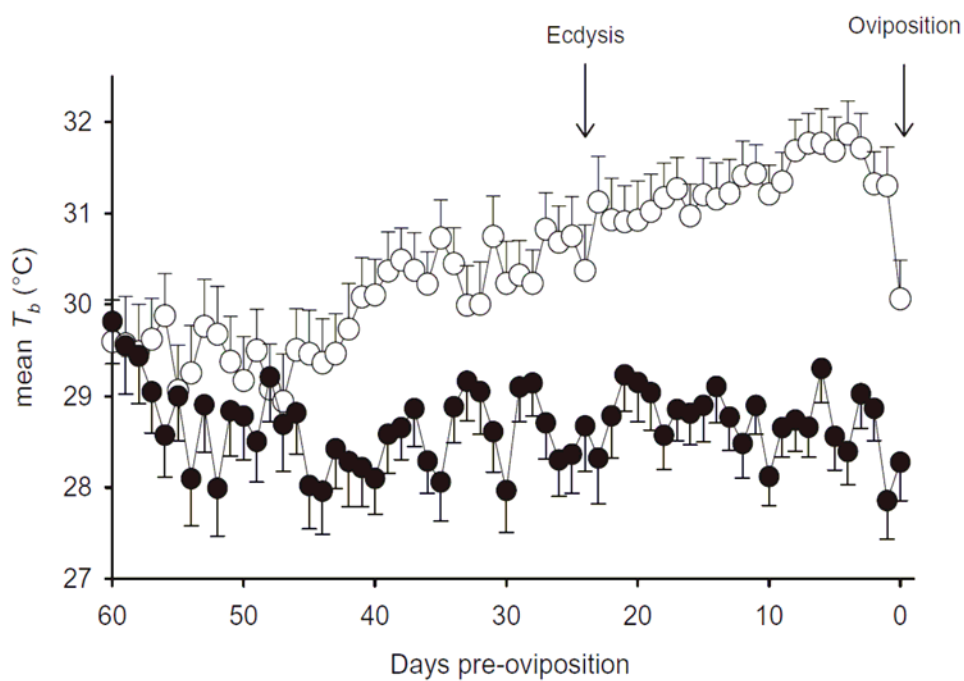


Figure 9. Influence du statut reproducteur sur la température corporelle moyenne journalière. Les serpents reproducteurs (cercles blancs) et les serpents non-reproducteurs (cercles noirs) étaient maintenus dans des cages séparées avec un accès permanent à une source de chaleur additionnelle. La première flèche (« ecdysis ») indique le nombre de jours avant l'oviposition pour que la mue ait lieu chez les femelles reproductrices (23.1 jours). La deuxième flèche (« oviposition ») indique la date d'oviposition (jour 0) pour les femelles reproductrices. Les barres d'erreur représentent les erreurs standard, qui reflètent la variation inter-femelles.

Source : Lourdaïs *et al.* 2008



2- Matériel et techniques

2-1- Manipulations thermiques expérimentales

L'impact des conditions thermiques sur le développement des reptiles a attiré un intérêt considérable (Deeming and Fergusson 1991 ; Deeming 2004). Cependant, dans de nombreux cas, les dispositifs expérimentaux ont reposé sur des températures constantes. Les travaux récents commencent à intégrer les fluctuations journalières. Ce projet repose précisément sur la manipulation des conditions thermiques prénatales afin de clarifier l'importance des cycles thermiques maternels.

Les cycles thermiques et hydriques journaliers ont été manipulés à l'aide d'enceintes climatiques (Vötsch IndustrieTechnik, Baligen Germany ; Fig.10). A partir des données disponibles sur les deux espèces (Lourdais *et al.* 2004b, 2008) ou acquises dans le cadre de ce travail, il a été possible de mettre en place des régimes expérimentaux impliquant un régime contrôle (correspondant au choix maternel) et des régimes contraints impliquant des températures plus basses. Les régimes expérimentaux « contraints » ont été réalisés de manière cohérente en terme écologique et correspondaient à des perturbations auxquelles les animaux peuvent être exposés *in natura*. Cette précaution expérimentale était essentielle afin d'éviter d'appliquer des régimes thermiques non réalistes, qui auraient profondément biaisés les résultats, en affectant de manière trop brutale les embryons. A l'inverse, les perturbations imposées sont plutôt modérées et correspondent à des régimes thermiques observés chez les femelles non-reproductrices.





Figure 10. Enceintes climatiques permettant le contrôle des conditions thermiques et hydriques journalières

Les régimes expérimentaux ont différés selon les études, en raison de l'écologie des espèces et des questions scientifiques adressées. Les régimes utilisés sont détaillés ci-dessous, chez chacune des espèces.

a) Python de children (*A childreni*)

Les manipulations thermiques ont été appliquées durant la phase de gravidité (flèche orange, Fig. 11). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'importance pour les femelles gravides d'atteindre leur température préférée (T_{set}). Ceci constituait la manipulation expérimentale complémentaire à l'étude de Lourdaïs *et al.* (2008) qui avait exploré le comportement maternel de thermorégulation durant cette même période. Le choix de nos régimes thermiques s'est donc appuyé sur ces données déjà disponibles. Trois régimes thermiques expérimentaux ont ainsi été réalisés et différaient dans le temps passé à T_{set} (Fig.12). Les conditions d'incubation étaient ensuite les mêmes pour chacun des trois traitements (conditions optimales).



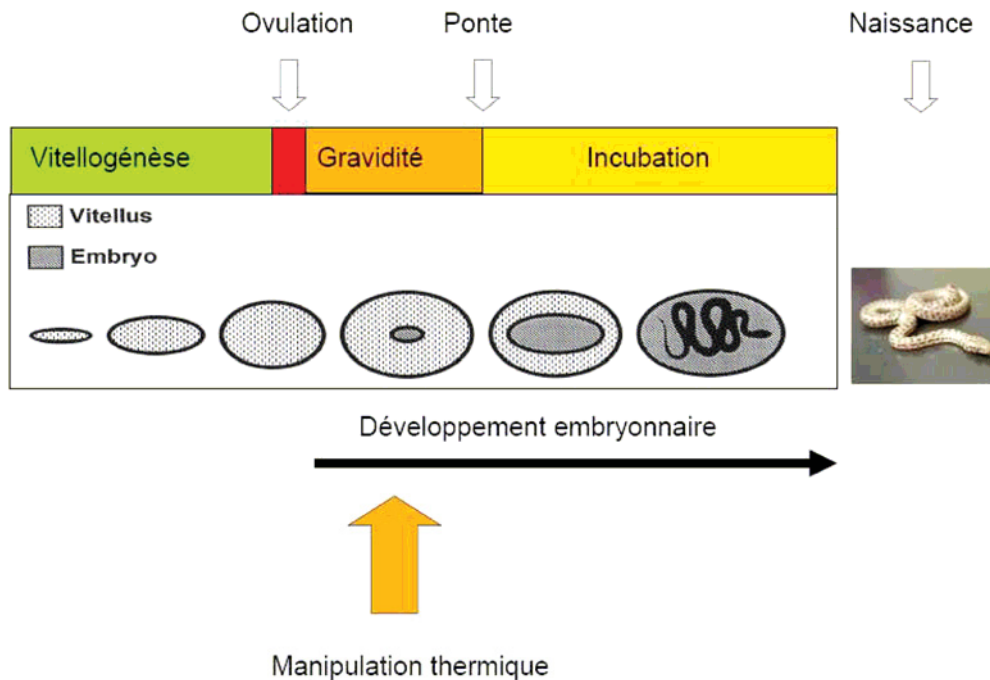


Figure 11. Les perturbations thermiques ont été appliquées durant la phase de gravidité chez le python de Children, comme indiqué par la flèche orange.

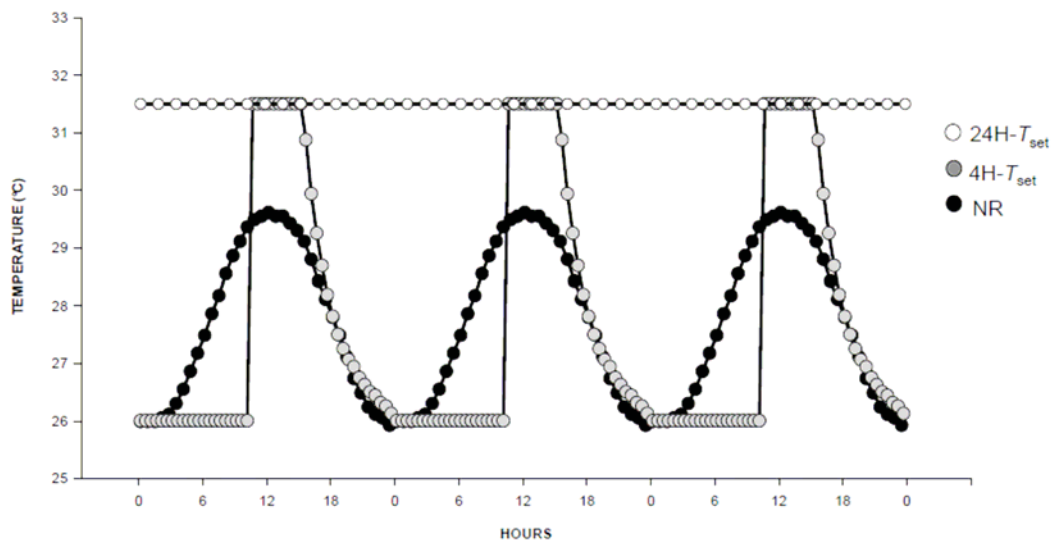


Figure 12. Représentation des 3 régimes thermiques appliqués durant la phase de gravidité chez le python de Children. Le régime « 24H- T_{set} » correspond au régime optimal durant lequel les femelles étaient exposées à des températures constantes (31.5°C). Les deux autres régimes (sub-optimaux) avaient la même moyenne thermique journalière mais différaient dans le temps passé à T_{set} avec 4h d'accès à T_{set} (« 4H- T_{set} ») et aucun accès (« NR »).



b) Vipère aspic (*V. aspis*)

Les manipulations thermiques ont été réalisées au cours de la gestation, à différents stades du développement embryonnaire (début, milieu et fin ; flèches oranges, Fig. 13). Nous avons réalisé deux cycles thermiques différents : un optimal et un sub-optimal (« frais »). Cinq traitements expérimentaux ont ainsi été établis: un groupe optimal (O) dans lequel les femelles étaient exposées à des températures optimales durant toute la gestation, un groupe témoin négatif (C) au sein duquel les femelles étaient soumises à des températures fraîches sur la durée totale de la gestation, et 3 traitements intermédiaires (C1, C2 et C3) qui différaient dans le moment de la gestation où le régime frais était appliqué. (Fig. 14).

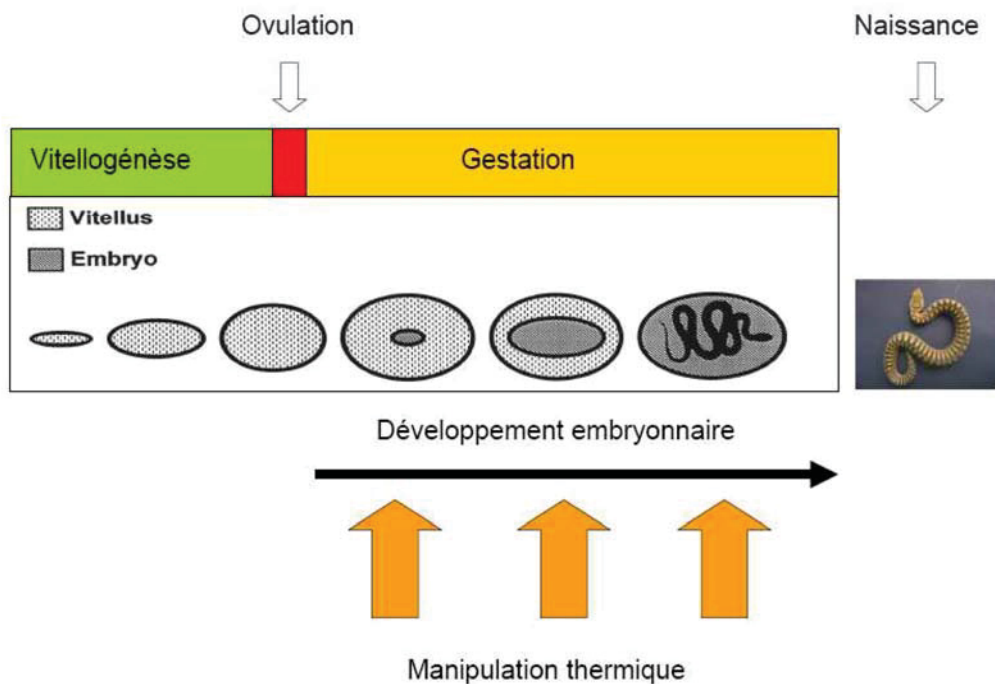


Figure 13. Les perturbations thermiques ont été réalisées à différents stades de la gestation chez la vipère aspic (début, milieu et fin).



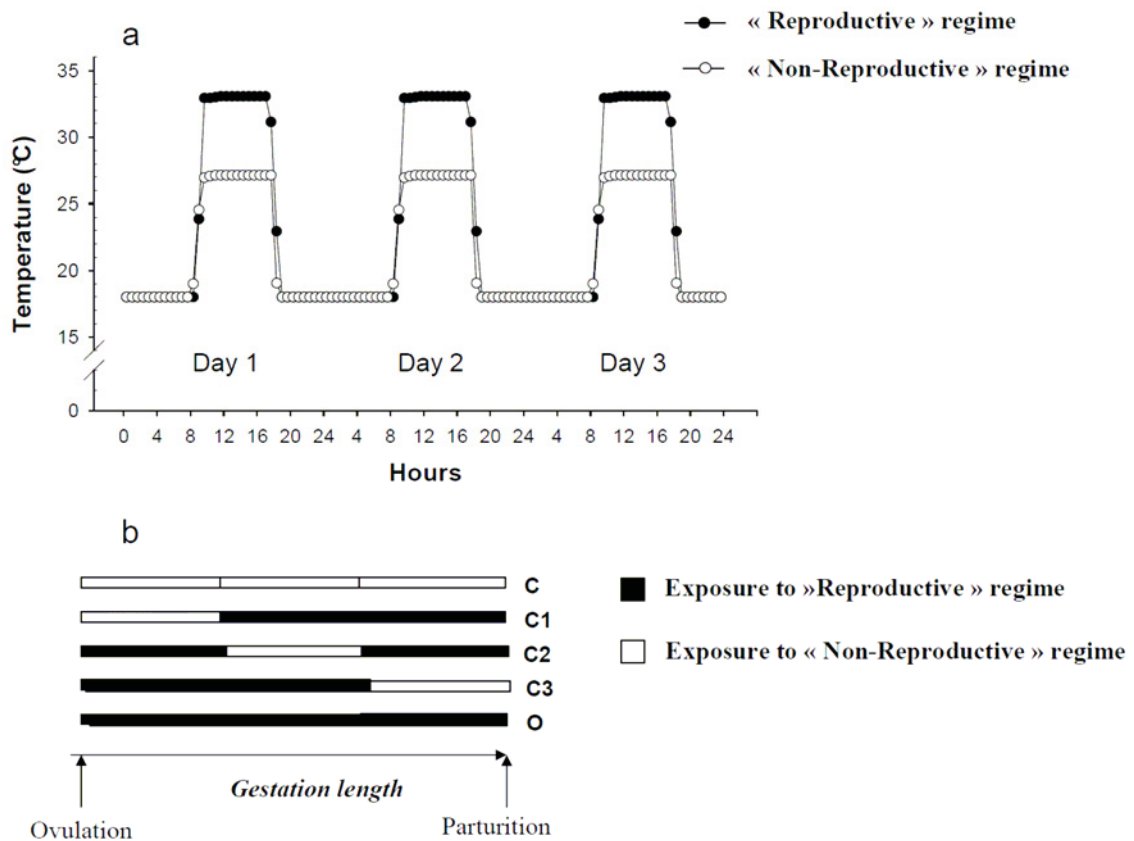


Figure 14. Choix des cycles thermiques appliqués au cours de la gestation chez la vipère aspic et périodes d'exposition. Deux cycles journaliers ont été créés (a), un régime optimal (« Reproductive regime ») et un régime suboptimal frais (« Non-reproductive regime »). Les traitements expérimentaux ont été réalisés en appliquant les différents régimes à différentes périodes de la gestation (b).



2-2- Suivi échographique

Un suivi échographique nous a permis de réaliser un suivi fin de l'engagement dans la reproduction et du développement embryonnaire. Nous avons utilisé un échographe Sonosite Micromaxx (Inc., Bothell, WA, USA) avec une sonde linéaire à haute fréquence (13Mhz). Cet outil a également été requis pour l'étude du comportement maternel. Il aura été essentiel en conditionnant plusieurs aspects majeurs de cette thèse et du suivi des paramètres détaillés ci-dessous :

2-2-1- Engagement dans la reproduction chez le python de Children

Il n'existe pas de signes ostensibles témoignant du lancement du développement embryonnaire. Le suivi échographique nous a permis de déterminer les périodes d'ovulation et de pouvoir lancer les expérimentations en conséquence (Fig.15). L'ovulation peut être aisément déterminée par la forme caractéristique des œufs (ovoïdes et enflés), distinctement séparés et alignés dans l'oviducte de la femelle. Avant l'ovulation, les œufs sont de forme arrondie, de plus petite taille, et assemblés en grappe dans l'oviducte de la femelle.



Figure 15. Détermination de l'ovulation chez une femelle de python de Children, *Antaresia childreni*, à l'aide de l'échographe. La forme de l'œuf indique une ovulation récente et le démarrage du développement embryonnaire. Ce diagnostic est associé au lancement des traitements thermiques expérimentaux.

2-2-2- Ovulation et suivi du développement embryonnaire chez la Vipère aspic)

Le développement embryonnaire de la vipère aspic a été étudié (Hubert and Dufaure 1968) avec des descriptions précises des différents stades mais sans lien dynamique avec les conditions thermiques. Grâce au suivi échographique (Fig.16a, 16b, 16c), il a été possible de déterminer les



stades de développement et d'appliquer les régimes thermiques en conséquence. Ce diagnostic était essentiel car il existe des variations significatives entre femelles dans la phénologie de la reproduction. Par ailleurs, du fait de l'absence de données reliant stades de développement et température, un suivi régulier du développement embryonnaire était nécessaire (tous les 15 jours environ).

L'ensemble de nos travaux sur la vipère aspic reposait sur une étude à différents stades de la gestation. Ainsi, l'étude du comportement maternel et des ajustements selon le stade embryonnaire à également impliqué le suivi échographique fin des conditions de développement, afin de déterminer les moments précis où les mesures comportementales et physiologiques devaient avoir lieu.

Enfin, grâce aux mesures échographiques, nous avons pu suivre l'évolution de la taille des œufs (volume) et pu mettre en relation ce paramètre avec la prise en eau au cours du développement.



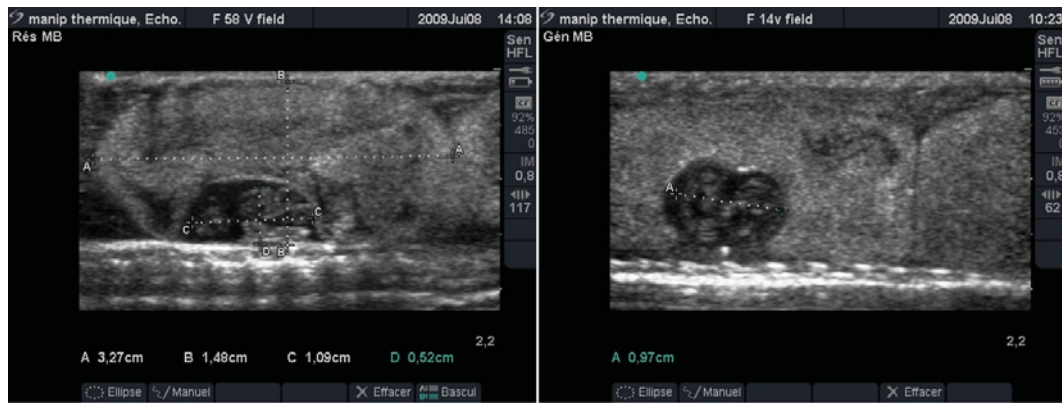


Fig. 16a. Début de gestation (à gauche = vue sagittale, à droite = vue frontale). On note l'embryon de petite taille et la masse importante de vitellus (couleur grise homogène)

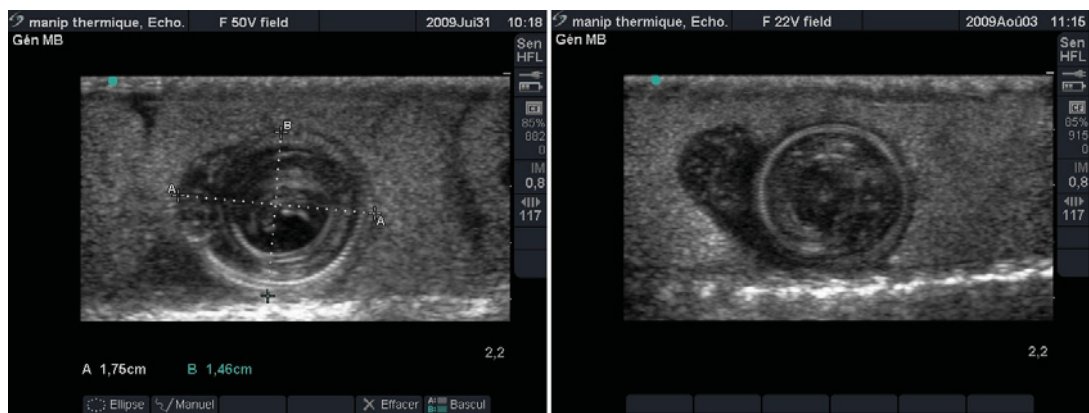


Fig. 16b. Deux exemples d'échographies en milieu de gestation (vues frontales). La tête avec les mâchoires et les yeux sont clairement visibles. On remarque l'enroulement en spirale caractéristique. Les réserves de vitellus sont encore importantes.

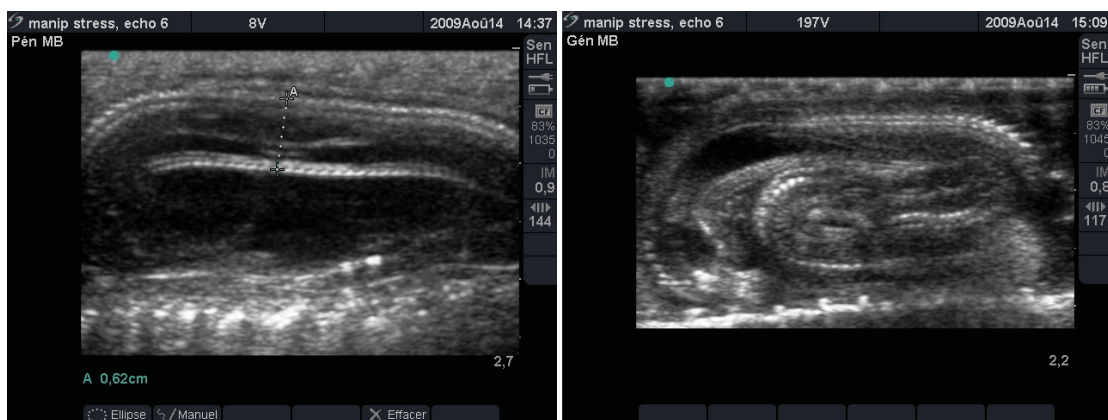


Fig. 16c. Deux exemples d'échographies prises en fin de gestation (vues frontales). Le fœtus se déroule, les réserves vitellines sont réduites et le gain en taille est évident.



2-3- Suivis physiologiques

2-3-1- Suivis hormonaux et réponse au stress

L'étude des mécanismes hormonaux à l'interface entre environnement et comportements et des soubassements endocriniens de la reproduction est une facette essentielle de l'étude. Les prélèvements sanguins ont été réalisés par ponction cardiaque (Figure 17) à l'aide d'une seringue 1ml munie d'une aiguille de petite taille (Microlance 30G) afin d'éviter d'impacter la musculature cardiaque. Les prises de sang ont été centrifugées (3000 tour/minute pendant 5 minutes) afin de séparer le plasma des hématocrites. Les taux d'hormones (corticostérone) ont été déterminés par dosage radioimmunologique (RIA), au Centre d'Etudes Biologiques de Chizé.

Chez la vipère aspic, nous avons également étudié la modulation de la réponse adrénocorticale. Le protocole de prise de sang consistait à capturer les animaux dans leurs cages expérimentales, après les avoir placés dans un tube (premier tiers du corps). Une première prise de sang a été réalisée en moins de 3 minutes et l'animal a ensuite été placé 1h dans une boîte transparente, en enceinte climatique à 25°C afin de créer une situation de stress. Une heure après, l'animal était récupéré et une deuxième prise de sang effectuée afin de mesurer la réponse allostasique.

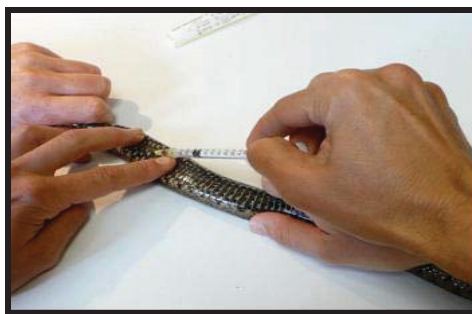


Figure 17. Illustration d'une prise de sang par ponction cardiaque chez *Vipera aspis* à l'aide d'une seringue préalablement héparinée. Le sérum est ensuite séparé des hématies par centrifugation



2-3-2- Suivis énergétiques

En parallèle, nous avons considéré l'évolution de la musculature et des performances au cours de la reproduction. Les deux espèces sont des reproducteurs sur « réserves » et les prises alimentaires sont généralement absentes pendant les soins prénataux (gravidité et soins aux œufs). La quantification de l'impact énergétique du jeûne et de la reproduction peut être réalisée en mesurant la musculature dorsale (musculature épaxiale) chez le python. Nous avons suivi la méthode développée par Lourdaïs *et al.* (2005). Pour la vipère aspic, nous avons adapté la méthode basée sur des mesures de la largeur de la queue, car la musculature épaxiale est difficilement accessible pour cette espèce.

Nous avons également mesuré l'impact de la reproduction sur les performances avec des mesures de forces de tractions. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un dynamomètre (Gauge Force Bioblock) en suivant la méthode développée par Lourdaïs *et al.* (2005) (Fig. 18).

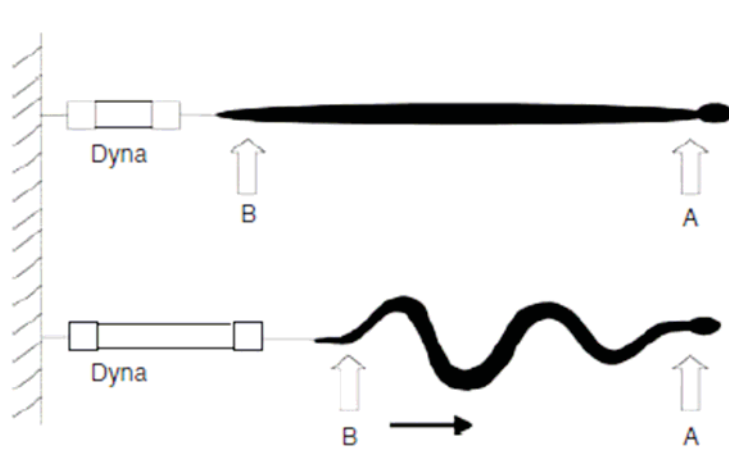


Figure 18. Représentation schématique de la méthode utilisée pour quantifier la force de traction. Le serpent était maintenu sur le sol : un opérateur (A) immobilisait la première section du corps tandis qu'un autre (B) maintenait le serpent dans une position tendue. Un dynamomètre (Dyna) était attaché au poignet de l'opérateur B et ajusté pour maintenir une faible traction (0-5 newtons). Ensuite, l'opérateur B relâchait simplement sa force de traction permettant à sa main d'être déplacée latéralement par la force de traction du serpent en maintenant une prise sur la queue du serpent.

Source : Lourdaïs *et al.* 2005

2-3-3- Pertes hydriques totales et osmolalité

La thermorégulation accentuée des femelles peut imposer des contraintes en termes hydriques. Ainsi, en choisissant des températures élevées, les pertes hydriques cutanées et respiratoires peuvent être augmentées. Il peut donc exister un compromis fonctionnel entre la thermorégulation et le budget hydrique. Nous avons étudié l'impact de la reproduction sur le



budget hydrique chez l'espèce vivipare. Pour ce faire nous avons utilisé une chambre calorimétrique en système ouvert. Les mesures d'oxygène ont été réalisées à l'aide d'analyseur FC10a. La densité de vapeur (mg) a été mesurée à l'aide d'un hygromètre (RH300).

2-4- Suivi comportemental adulte

L'étude du comportement des femelles et de l'investissement parental dans la régulation du développement est une composante essentielle du projet. Nous avons donc quantifié l'investissement dans la thermorégulation et l'utilisation de refuge selon le statut reproducteur. Cet axe a été mené sur l'espèce vivipare (*Vipera aspis*) qui montre une thermorégulation comportementale active en période de gestation. Dans ce contexte nous avons élaboré un dispositif expérimental original (Fig. 19) mis au point par l'équipe technique du laboratoire.

Les individus ont été placés dans des cages équipées d'un point chaud d'un côté et d'un refuge du côté opposé, en zone fraîche. Les animaux ont été placés dans ces enceintes et les comportements exprimés, quantifiés (exposition, refuge). Par la suite nous avons simulé de façon standardisée, l'attaque d'un prédateur. La réponse de chaque individu a alors été suivie en considérant le temps de fuite, puis le temps de réapparition et de retour en thermorégulation. L'ensemble des comportements a été filmé avec une caméra HD (Sony HDR, XR100). Les suivis ont été conduits à différentes étapes de la gestation (début / milieu /fin/ post-reproduction).





Figure 19. Dispositif expérimental pour l'étude du comportement des femelles gestantes de vipères aspic. Chaque système est basé sur une cage de 1m de long, avec d'un côté une source de chaleur et de l'autre un refuge. On peut distinguer 2 femelles en thermorégulation. Chaque session était d'une durée standard de 3h30 et les comportements des individus ont été intégralement enregistrés.



2-5- Mesures de la qualité phénotypique chez les jeunes

Par ailleurs, les Squamates fournissent des soins postnataux limités, sinon absents, et les jeunes sont autonomes à la naissance. Les nouveau-nés disposent de grandes quantités de réserves, ils peuvent supporter un jeûne conséquent (plusieurs mois), ce qui permet une exploration détaillée de paramètres morphologiques, physiologiques et comportementaux. La qualité des jeunes squamates est assez facile à estimer puisque leur morphologie, leur écaillure, leurs performances locomotrices et leur comportement anti-prédateur à la naissance constituent des indications directes de leur qualité (Shine *et al.* 1997a; Shine and Elphick 2001; Blouin-Demers *et al.* 2004; Mori and Burghardt 2001).

Enfin, les jeunes dispersent et recherchent un habitat approprié (Massot and Clobert 2000; Massot *et al.* 2002; Le Galliard *et al.* 2003b) peu de temps après la naissance. Durant cette période, les nouveau-nés sont exposés à un grand nombre de stimuli et de facteurs environnementaux. Une réponse appropriée aux indices environnementaux est donc importante. Une évaluation de la personnalité des jeunes, incluant la quantification de l'activité, la réactivité, la prise de risque et la défense, constitue une composante importante de la fitness qui peut être explorée en conditions standardisées.

Les travaux menés en 2009 et 2010 ont permis l'acquisition d'informations sur plus de 300 serpenteaux (120 *V. aspis* (Fig.20) et 210 *A. childreni* (Fig.21)). Nous avons développé une approche intégrée dans l'évaluation de la qualité phénotypique des jeunes à différentes étapes de leur vie.





Figure 20. Nouveau-né *Vipera aspis*.



Figure 21. Nouveau-né *Antaresia childreni*.

2-5-1- Morphologie

Nous avons mesuré les paramètres suivants et dont l'acquisition est réalisée en routine :

- La taille à la naissance (longueur museau cloaque SVL, et longueur totale TL),
- La longueur des mâchoires (JL),
- La longueur de queue (TailL).
- La condition corporelle (résidus de la régression de la masse corporelle sur la SVL)

Nous avons également considéré le nombre d'écailles ventrales (VSN) et la présence d'anomalies qui sont de bons indicateurs des perturbations du développement (Fig.22).

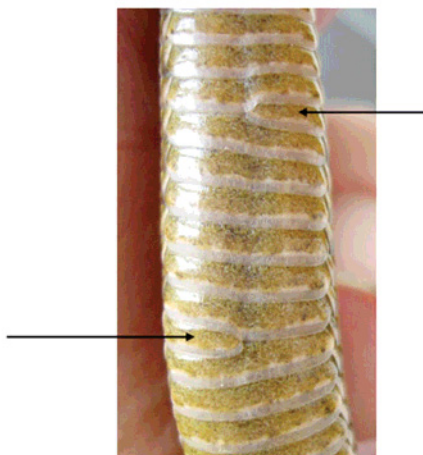


Figure 22. Exemple d'anomalie d'écailles. Les écailles ventrales normalement en un seul tenant, peuvent parfois se scinder en deux (flèches noires), reflétant des malformations au niveau vertébral.



2-5-2- Physiologie

- Métabolisme. La mesure du métabolisme standard (SMR) est un paramètre central car c'est un indice de la dépense énergétique en dehors de l'activité. Nous avons mesuré ce paramètre chez les serpenteaux à l'aide d'une chambre métabolique (FoxBox II (SableSystem) ; Fig.23) en utilisant un système en circuit fermé, du fait de la faible taille des jeunes et de leur faible activité.

Les individus étaient placés en acclimatation dans la chambre de mesure (casseroles ou bocaux) dans une enceinte climatique (31.5°C pour les pythons, et 25°C pour les vipéreaux). Après cette période, les chambres de mesure étaient fermées hermétiquement. De l'air extérieur (prélevé avant chaque série de mesures pour déterminer la concentration initiale) était insufflé dans les chambres pendant 3 minutes par une vanne d'entrée (l'air ressortait par la vanne de sortie), afin de s'assurer que la composition initiale d'air soit standard. Les vannes étaient ensuite fermées et les animaux laissés dans l'enceinte pendant 180 minutes (pythons) ou 480 minutes (vipères) afin d'obtenir un taux de suppression minimal d'oxygène (0.1%). Au bout de ce temps, à l'aide de seringues, un prélèvement (2 x 148 ml) d'air respiré était effectué pour chaque individu. L'air ainsi récupéré était analysé ultérieurement grâce à des analyseurs. La consommation d'oxygène était calculée selon la formule suivante :

Consommation O_2 (ml/h) = (Concentration d'oxygène initiale - Concentration d'oxygène finale) x volume de la chambre (ml) / durée de l'essai (h).

- Croissance. Les jeunes à la naissance possèdent d'importantes réserves énergétiques qui servent de support à la croissance lors du premier mois de vie. Nous avons mesuré les déterminants de la croissance des serpents nouveaux nés, dans les conditions thermiques d'élevage.



Figure 23. Matériel utilisé pour la mesure de métabolisme standard (SMR, ml O₂ /h)

2-5-3- Performances

Les animaux étaient placés en enceinte climatique 1h avant chaque mesure à la température du test, ceci afin de standardiser les températures corporelles de tous les individus.

-Force de traction (*V.aspis* et *A.childreni*).

Elle a été mesurée chez les nouveaux nés. Il s'agit de l'intensité de traction déployée par l'individu lors de la manipulation. Ce paramètre permet de décrire la puissance de l'individu et la motivation à se dégager d'une prise en main qui simule l'attaque d'un prédateur. Nous avons adapté la méthode disponible (Lourdais *et al.* 2005) aux nouveau-nés. Pour ce faire, la queue des animaux était reliée au système de mesure par une ficelle attachée à la queue (base du cloaque) avec une bande adhésive. Une remise à zéro du système était réalisée avant chaque série de mesures. Trois essais consécutifs de 30 secondes étaient réalisés avec une pause de 10 secondes entre chaque. Les tractions étaient provoquées en stimulant continuellement les serpents avec un pinceau.



-Vitesse de nage (*A.childreni*)

Elle a été mesurée pour estimer les capacités locomotrices (python de Children). Nous avons chronométré le temps de nage pour parcourir une distance de 2.5 mètres. Trois essais consécutifs étaient réalisés pour chaque nouveau-né, et ceci a été répété sur 2 jours consécutifs, juste après la naissance. La température de l'eau était maintenue constante au cours des essais (31.5°C environ). La nage était stimulée en agitant doucement l'eau derrière le serpent durant sa progression. Entre chaque essai les serpents étaient sortis de l'eau pendant 10 secondes.

2-5-4- Comportement des nouveau-nés

L'évaluation des aspects cognitifs et de la relation à l'environnement est l'un des objectifs centraux dans le diagnostic de la qualité des jeunes. En effet, étant autonomes à la naissance, les comportements exprimés et notamment les réactions face aux facteurs environnementaux constituent des paramètres importants de la qualité individuelle. Nous avons considéré plusieurs paramètres :

-Comportement de défense face à un prédateur (*V.aspis* et *A.childreni*).

Le comportement de défense a largement été étudié chez les serpents (Herzog and Burghardt 1986 ; Herzog *et al.* 1992 ; Burger 1998 ; Whitaker *et al.* 2000 ; Gregory *et al.* 2007). Nous avons simulé, en conditions standard (température contrôlée), l'attaque d'un prédateur (oiseau) sur les nouveau-nés. Il a été possible de quantifier la réponse exprimée en considérant le nombre de morsures, le délai pour mordre. Nous avons également dénombré les « sorties de langue » qui représentent une prise d'informations dans l'environnement.



-Prise alimentaire (*V.aspis*)

Nous avons quantifié la prise alimentaire (première proie proposée) des jeunes en sortie d'hivernage, 5 mois après la naissance. La croissance initiale des jeunes repose sur les quantités de réserves disponibles à la naissance (condition corporelle). Etant autonomes, le succès de recherche alimentaire est essentiel pour la survie future. Chaque jeune s'est donc vu proposé un souriceau (représentant entre 25 et 30% de la masse du serpent) fraîchement tué, en fin de journée. Le lendemain matin, un contrôle était effectué afin de quantifier le taux d'acceptation des proies distribuées.

-Comportement exploratoire dans un nouvel environnement (*V.aspis*)

La réponse à un nouvel environnement permet une évaluation de la « personnalité » des individus et des comportements exprimés (Holtzman *et al.* 1999; Almlil and Burghardt 2006 ; Warner and Shine 2008; Cote and Clobert 2007). Nous avons mis en place un dispositif expérimental original (Fig. 24) basé sur quatre compartiments : (2 compartiments éclairés, 2 compartiments non éclairés). Deux abris étaient disponibles dans chaque compartiment. L'animal a été d'abord placé au centre de l'arène et son comportement a été filmé pendant 15 minutes. Nous avons notamment évalué le temps passé en exploration, le temps passé caché, le nombre de compartiment/d'abris visités et l'intensité du comportement exploratoire (nombre de sortie de langue). Ces mesures ont été réalisées à la naissance.



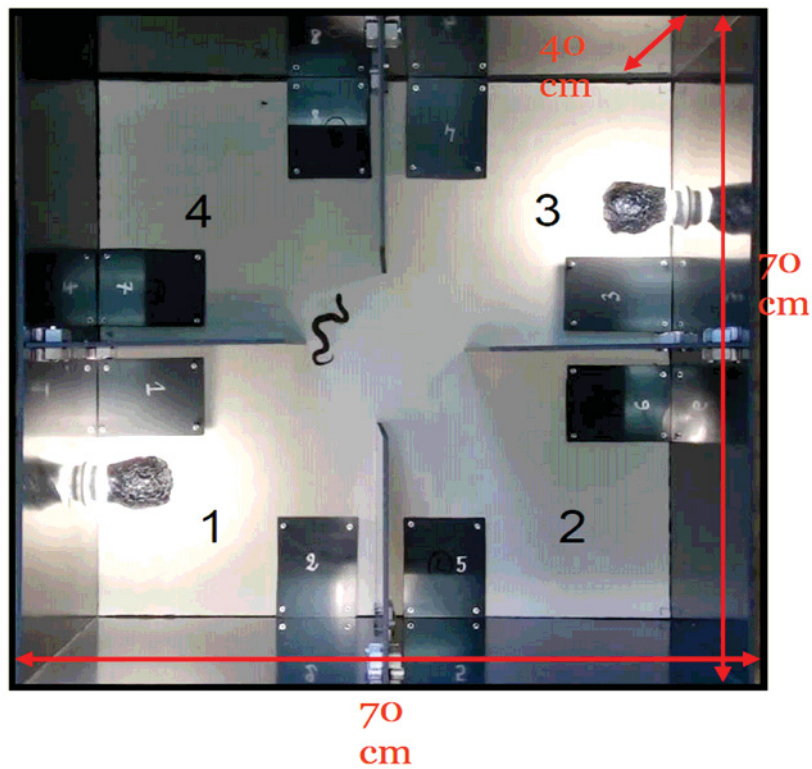


Fig.24. Dispositif expérimental pour l'étude du comportement des nouveaux nés de vipères aspic. On distingue les compartiments avec et sans accès à une source de chaleur. L'animal est tout d'abord placé au centre de l'arène sous une boîte pendant 5 minutes d'acclimatation. Le couvercle est alors retiré et l'ensemble des comportements enregistré.



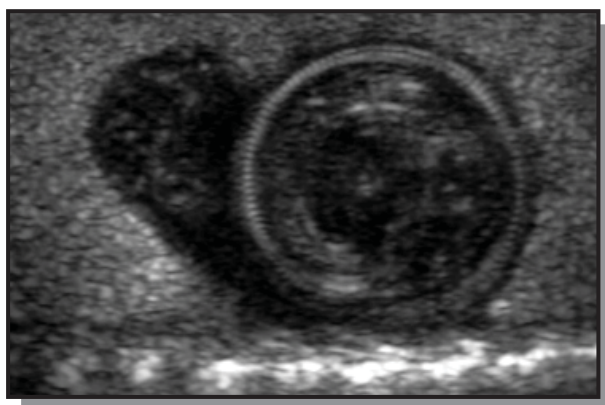
RESULTATS





CHAPITRE 1:

Sensibilité thermique embryonnaire



Résumé du Chapitre 1

Dans ce chapitre, nous avons examiné la sensibilité thermique des premiers stades du développement embryonnaire, à la fois chez une espèce ovipare, le python de Children (Article 1), et chez une espèce vivipare, la vipère aspic (Article 2). Si la sensibilité des premiers stades du développement est souvent invoquée, peu d'études expérimentales ont été conduites jusqu'à présent. Par ailleurs, l'impact de la régulation thermique maternelle pendant la gravidité demeure encore sous étudiée. Nous avons examiné d'une part (i) l'importance de la régulation maternelle, et d'atteindre la température préférée (T_{set}) pour l'optimisation de la qualité de la descendance (python de Children *A. childreni*), et d'autre part (ii) testé les sensibilités relatives des différentes étapes majeures du développement (vipère aspic, *V. aspis*).

Nous avons manipulé expérimentalement les conditions thermiques du développement soit durant la phase de gravidité (période de l'ovulation à la ponte, python de Children), soit sur l'ensemble du développement (vipère aspic). Les conditions thermiques et hydriques ont été contrôlées à l'aide d'enceintes climatiques. Les régimes thermiques ont été élaborés à partir des données de thermorégulation déjà disponibles pour chacune des deux espèces. Les perturbations imposées étaient modérées, mais pertinentes d'un point de vue écologique. En effet, l'utilisation de régimes contraignant et non réalistes (hors de la gamme de tolérance embryonnaire) entraînent des effets tératogènes et ne constituent pas un test réel de la sensibilité thermique du développement.

Chez *A. childreni*, les régimes thermiques ont été créés afin de simuler des traitements qui différaient dans le temps passés à T_{set} (un régime optimal et deux régimes sub-optimaux avec la même moyenne thermique journalière: un mimant 4 heures de thermorégulation à T_{set} , et un où les femelles n'atteignaient jamais T_{set}). Les températures d'incubation étaient ensuite constantes pour l'ensemble des trois traitements expérimentaux. Chez *V. aspis*, nous avons utilisé un régime optimal et un régime contraignant (« frais ») appliqué à différents stades de la gestation (premier, deuxième et dernier tiers), résultant ainsi en 5 traitements expérimentaux : un groupe de femelles exposées au froid sur l'ensemble de la durée de la gestation (contrôle négatif), un groupe exposé à des températures optimales sur l'ensemble de la gestation (témoin), et trois groupes de femelles qui différaient par la période durant laquelle la perturbation thermique avait été appliquée (début, milieu ou fin de gestation).

Afin d'évaluer l'impact des différents traitements thermiques sur les nouveau-nés, nous avons utilisé un ensemble de variables complémentaires : morphologiques, physiologiques



(croissance et métabolisme), comportementales, ainsi que des mesures de performances. Ceci a permis d'avoir suffisamment d'indices fiables pour évaluer au mieux la qualité des jeunes.

Les résultats obtenus soutiennent l'hypothèse d'une sensibilité accrue des premiers stades du développement chez les deux espèces. Chez *A. childreni*, nous avons mis en évidence l'importance du temps passé à T_{set} avec des bénéfices substantiels en terme de durée de gravidité et de qualité phénotypique des jeunes. Les nouveau-nés issus du traitement optimal étaient de meilleure qualité et avaient des performances (nage, traction) supérieures. Parmi les traitements sub-optimaux, un accès même partiel à T_{set} (4h) permettait d'une part, de diminuer la durée de gravidité et donc avancer la date de naissance, et d'autre part d'améliorer la qualité des jeunes au niveau du comportement et des performances.

Chez *V. aspis*, nous avons mis en évidence les bénéfices associés à l'accès aux températures optimales pendant l'ensemble de la gestation avec notamment des dates de naissances plus précoces et des jeunes de meilleure qualité phénotypique. Par ailleurs, nous avons démontré une sensibilité accrue du premier tiers du développement : les nouveau-nés présentaient des impacts morphologiques, avec une plus petite taille corporelle, une plus petite mâchoire, des anomalies d'écaillage, ainsi que des dessins dorsaux et latéraux irréguliers. De plus, ils étaient moins performants, et avaient des comportements altérés, à la fois face à une simulation de prédateur et dans un nouvel environnement à explorer. Au contraire, les jeunes ayant subi des perturbations froides en fin de gestation ont développé des réponses dynamiques aux conditions vécues durant leur développement : ils exprimaient une force de traction supérieure et avaient un métabolisme plus élevé que les jeunes des autres traitements, suggérant une acclimatation métabolique au froid, susceptible de les rendre plus efficaces dans un environnement de croissance supposé similaire.

Les résultats de ces deux études ont ainsi révélé une très grande sensibilité du développement et soulignent l'importance pour les femelles de maintenir leur accès à T_{set} , notamment durant cette période critique. De nombreux travaux chez les squamates ont signalé des changements de préférences thermiques chez les femelles gravides, soit vers les températures élevées (serpents) ou basses (lézards). Plus que la directionnalité du changement thermique, nos travaux soulignent l'importance d'atteindre et de maintenir la température préférée. La sensibilité embryonnaire aux stades précoces est probablement un facteur important pour comprendre la rétention prolongée des embryons (un quart du développement) observée chez reptiles squamates et les modifications conjointes de la thermorégulation maternelle.



**A good start in life: access to preferred temperatures during
gravidity improves offspring quality in the Children's python
(*Antaresia childreni*)**

SOPHIE LORIOUX ^{1,4}, DALE F. DENARDO ², ROOT GORELICK ³ and OLIVIER LOURDAIS ^{1,2}

¹ Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS, 79360, Villiers en Bois, France

² School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

³ Department of Biology, Carleton University, 1125 Colonel By Drive, Ottawa, ON K1S 5B6, Canada

⁴ Université de Poitiers, 40 avenue du recteur Pineau 86022 Poitiers, France

Correspondance:

Sophie Lorion, CEBC-CNRS UPR 1934
79360 Villiers en Bois, FRANCE
Phone: +33 (0) 5 40 09 35 52
Fax: + 33 (0) 5 49 09 65 26

E-mail: lorion@cebc.cnrs.fr

Tables: 2

Figures: 2

In revision for Journal of Experimental Biology

Summary

Embryonic life is particularly sensitive, and high selective pressure to regulate developmental conditions may be a major driving force in the evolution of parental care in vertebrates. We explored the benefits of maternal regulation by manipulating thermal conditions during gravidity in an oviparous snake species, the Children's python (*Antaresia childreni*). We applied an optimal regime that reflected maternal preference in a non-constrained environment (constant preferred body temperature, T_{set} : 31.5°C) and two mildly suboptimal regimes that shared the same mean temperature of 27.7°C, but differed in the time at T_{set} . In one constraining regime, females had



access to T_{set} for 4 hrs daily while, in the other regime, females never reached T_{set} (maximal temperature of 29°C). Thermal treatments were maintained throughout gravidity in all three groups, but, after oviposition, all eggs were incubated at T_{set} .

Compared with the optimal regime, in the two suboptimal regimes, duration of gravidity was longer, translating into delayed hatching. With the two suboptimal regimes, gravidity was significantly shorter when females spent some time at T_{set} . Suboptimal regimes negatively influenced offspring traits at hatching, including body morphology, antipredator behavior, strength, and metabolism. However, partial access to maternal T_{set} significantly enhanced several offspring traits including defensive behavior and performances. Our results demonstrate the adaptive significance of maternal thermoregulation at early life stages, as well as the importance of time at T_{set} on development independent of mean temperature.

Keywords: Prenatal parental care, thermoregulation, early development, oviparity



Introduction

Embryonic development is sensitive to many factors including hormones, toxins, energy availability, and temperature. Minor variation in conditions experienced by an embryo can translate into major phenotypic modifications (Deeming, 2004) and influence key life history traits, such as fecundity or survival (Lindström, 1999; Lumma and Clutton-Brock, 2002). Epidemiological studies in humans and experimental studies in animals have demonstrated that suboptimal developmental conditions have immediate effects that can affect morphology, behavior, and survival (Burger, 1998; Webb *et al.*, 2001; Meylan and Clobert, 2005; Denver, 2009). These conditions can also have long-lasting consequences on adult life (Clark and Galef, 1995; Wells, 2003; Gorman and Nager, 2004; Dolinoy *et al.*, 2007; Gardner *et al.*, 2009).

Embryonic thermal sensitivity is a universal vertebrate feature (Farmer, 2000) and eggs are particularly vulnerable to environmental conditions. Incubation temperature affects offspring phenotype (Shine *et al.*, 1997; Elphick and Shine, 1998; Downes and Shine, 1999; Qualls and Andrews, 1999; Mullins and Janzen, 2006; Eiby and Booth, 2009), e.g. locomotor performance (Shine, 1998; Braña and Ji, 2000; Ashmore and Janzen, 2003), viability (Shine and Harlow, 1993; Eiby *et al.*, 2008; DuRant *et al.*, 2010), behavior (Sakata and Crews, 2003), and even sex determination (Ewert *et al.*, 1994; Lang and Andrews, 1994; Pieau *et al.*, 1999; Valenzuela and Lance, 2004). Selective pressure to regulate early developmental conditions may be a major driving force behind evolution of prenatal parental care strategies in vertebrates (Farmer, 2000). For example, the existence of embryonic thermal sensitivity is a central assumption of Farmer's theory and endothermy in birds and mammals (e.g., endogenous heat production) initially evolved as a means of stabilizing developmental environment during embryonic life because of its substantial benefits to reproductive success (increased embryonic survival and offspring quality; Shine *et al.*, 1997; Farmer, 2000).

Embryonic development is a non-linear process (Andrews, 2004) combining a suite of interrelated steps. Initial stages include neurulation and organogenesis (i.e., set up of the neuroendocrine axis and body plans), while later steps consist of more continuous aspects of embryonic growth and fetal life. Environmental perturbations during these times can lead to dramatic and often times irreversible effects in embryonic organization (Wells, 2003; Kunes and Zicha, 2006; Mueller and Bale, 2006; Oxendine *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2006). Thus, it is important to investigate parental regulation at early developmental stages in a costs-benefits context. Notably, prenatal parental regulation should be highly beneficial because of i) supposedly high thermal sensitivity of embryonic organization and ii) the non-depreciable nature of parental



regulation (all the embryos benefits from the improvement). However, the relevance of thermal influences early in embryonic life has been considered in only a limited number of studies (Shine, 1995, 2006; Kim and Monaghan, 2006, Rodríguez-Díaz and Braña, 2011).

In squamate reptiles, maternal regulation of embryonic development is most notably based on behavioral thermoregulation and temperature-based selection of nest sites (Shine and Harlow, 1996). Significant oviductal egg retention occurs in most squamates (Shine, 1983) and improved maternal control of developmental conditions was likely a key driving force in the repeated (>100) independent transitions to viviparity in squamate reptiles (Shine, 1995, 2006; Andrews, 2000; Webb *et al.*, 2006). Thermoregulatory shifts associated with intra-oviductal development have been reported in many oviparous squamates with gravid females showing modified (either higher or lower) thermal preferences and, perhaps more importantly, more precise thermoregulation (Shine, 2006; Lourdais *et al.*, 2008). Recent experimental work in oviparous lizards suggests that maternal influences on the early developmental environment may provide benefits similar to those typically attributed to viviparous species (Shine, 2006). While modified basking behavior may confer significant fitness benefits, there remains a need to better understand maternal influences on early development.

Oviparous pythons provide complex and extended parental care to their developing embryos. After oviposition, females tightly coil around their eggs and brood their clutch during the entire incubation period (Shine, 2004a; Aubret *et al.*, 2005b; Lourdais *et al.*, 2007). Female pythons also show modified thermoregulatory behavior prior to oviposition (Lourdais *et al.*, 2008). Gravid females display a specific basking behavior where the female lies with the distal half of her body upside down (i.e., the ventral surface facing up, Ross and Marzec, 1990; Greer, 2004; Shine, 2004a; Lourdais *et al.*, 2008). Hence, pythons provide an ideal opportunity to examine the functional significance of accurate maternal thermoregulation early in development.

Our general hypothesis is that access to maternal preferred temperature (31.5°C; Lourdais *et al.*, 2008) during pre-oviposition developmental stages is critical to optimize offspring quality and thus reproductive success. We experimentally manipulated thermal conditions during gravidity (between ovulation and oviposition) in a small species, the Children's python (*Antaresia childreni*, Gray, 1842). We tested the following predictions:

- 1) Maternal temperature during gravidity will influence developmental rate and oviposition date, with gravidity duration shorter when females have a permanent access to their preferred body temperature.



- 2) Thermal condition during early, pre-oviposition development will influence offspring quality, with higher hatchling quality when females have permanent access to their preferred body temperature of $T_{set} = 31.5^{\circ}\text{C}$.
- 3) When thermoregulation is constrained (i.e., suboptimal conditions), limited maternal exposure to preferred body temperature (T_{set}), independent of mean incubation temperature, will increase phenotypic quality of offspring.

Materials and Methods

Study species and maintenance

Snakes used in this study were part of a long-term captive colony of Children's pythons maintained in the Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, France. Children's pythons are medium-sized (up to 1.2 m snout vent length, 600 g body mass) constricting snakes that inhabit rocky areas in northern Australia (Wilson and Swan, 2003). Snakes were housed individually in plastic cages (35.5 x 63 x 15 cm) in a room maintained on a 12:12 light:dark cycle. The snakes were provided a thermal gradient (25-35°C) by maintaining room temperature at 20°C and providing continuous supplemental heat using a sub-surface heating cable under one end of each cage. Water was available *ad libitum* in bowls and snakes were offered one mouse every one to two weeks.

Breeding protocol

To induce reproductive activity, both males and females were moved for six weeks to a 6:18 hr temperature cycle of 31:16°C. Breeding occurred after returning the snakes to their normal thermal regime. Each day a new male was introduced to each female. Courtship and mating generally occurred within a few hours of the male being introduced, and mating typically lasted 4-12 hours. Males were transferred to a new female each day unless copulation was occurring at the time of the intended transfer.

Ultrasonography (Micromaxx, SonoSite, Inc., Bothell, WA, USA) was used to assess reproductive status. Pre-laying ecdysis occurs in many oviparous snakes, providing an additional indicator of reproductive status. Skin shedding occurs approximately one week before oviposition in colubrid snakes (Markel, 1990), but somewhat earlier in pythons (3-4 weeks pre-oviposition in Children's python). In the Children's python, ecdysis occurs, on average, 23.1 ± 2.6 days before oviposition and this delay seems to be temperature dependent (Lourdais *et al.*, 2008). When a female was found to be gravid (as determined by ultrasonic imaging of ovoid ova aligned linearly



down the coelomic cavity), she was randomly assigned to one of the three thermal treatments (see below), removed from her cage, and placed in a smaller opaque plastic container (10.5 x 30 x 16.5 cm) within a climatic chamber (Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany). A few days before oviposition, the female was transferred to a 1.9 l opaque Teflon-coated chamber covered with wire netting to allow gas exchange. At oviposition, the female and her eggs were transferred to a 31.5°C (T_{set} in the Children's python; Stahlschmidt *et al.*, 2011) constant incubation regime until hatching. Eggs were inspected daily, and hatchlings were removed after they all emerged. Hatchlings from the same clutch were maintained in a single plastic cage (10.5 x 30 x 16.5 cm) at a constant temperature of 31.5°C. Females were not fed during the entire reproductive period as they typically are aphagic during this time, but water was available *ad libitum* except when the females were brooding their eggs. Similarly, hatchlings were not fed during the study period, but were provided water *ad libitum*.

Experimental thermal treatments during gravidity

In this species, gravidity induces a significant shift in thermal preferences and basking intensity. Gravid females maintain a higher, less variable body temperature (31.5°C) when compared to non-reproductive females (28.7°C, Lourdais *et al.*, 2008). When given the opportunity, they will maintain this higher body temperature throughout the day and night. Our goal was to examine the significance of maternal thermoregulation on development and offspring quality. Three thermal regimes were designed in the frame of previous information on female thermal preference and behavior:

- **"24H- T_{set} " regime:** Females ($n = 11$) were constantly exposed to the preferred body temperature (31.5°C, Figure 1). This treatment reflects female behavioral choice when given a permanent access to supplemental heat (Lourdais *et al.*, 2008). In natural conditions, the combination of basking activities (during the day) and appropriate burrow selection (at night) can provide such constant temperatures (Shine and Madsen, 1996; Webb *et al.*, 2001).
- **"4H- T_{set} " regime:** Females ($n = 10$) were exposed to T_{set} for a short period (4 hr daily) and then to 26.0°C for 10 hours (mean temperature = 27.7°C, Figure 1). The transition between the two temperatures was rapid during temperature increase (1hr) and longer during the temperature decrease (9hr), mimicking natural asymmetrical fluctuations in body temperature. A rapid shift in body temperature is associated with a basking opportunity and then a progressive decrease after exposure. This cycle reproduces constraining weather with limited basking opportunities.
- **"NR" regime:** Gravid females ($n = 9$) had no access to their preferred temperature (T_{set}). This treatment broadly corresponds to thermal regimes maintained by non-reproductive females



(Lourdais *et al.*, 2008). Thermal regimes are highly variable among females, and this was simplified for experimental purposes. This regime consisted of a 24h sinusoid with 29.6°C and 26.0°C as maximal and minimal temperatures. Mean temperature (27.7°C) was the same as for the 4H- T_{set} group (Figure 1).

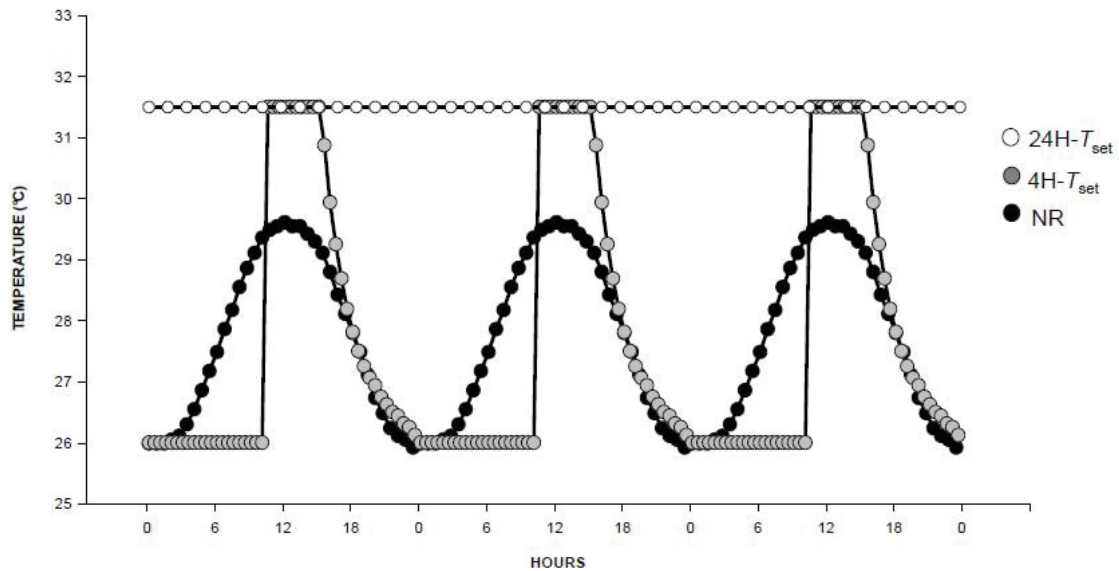


Figure 1. Thermal treatments applied during gravidity in female Children's python (*Antaresia childreni*). Temperature patterns were obtained from temperature loggers placed in climatic chambers housing the animals. In the 24H- T_{set} regime (open circles) gravid females were continuously exposed to their preferred temperature (31.5°C). In the cyclic 4H- T_{set} regime (grey circles) gravid females could reach optimal temperature for 4 hours per day, whereas in the cyclic NR treatment (black circles) gravid females were exposed to the typical thermal cycle of non-reproductive females and thus had no access to their preferred temperature. The mean temperature of the 4H- T_{set} and NR treatments were the same (27.7°C).

This design provided ecologically relevant thermal cycles to evaluate the benefits of the typical shift in female preferred temperature with gravidity (comparing 24H- T_{set} to NR) and to evaluate the influence of exposure to T_{set} independent of mean developmental temperature (comparing 4H- T_{set} to NR). This design does not allow us to fully disentangle the complexity of thermal influences (e.g., the two suboptimal regimes differ in time at T_{set} and variance; Shine and Elphick, 2001; Shine, 2004c). However, these three regimes were relevant considering previously collected information on female behavior. Additionally, we avoided any exposure of females to temperatures above T_{set} since females given a thermal choice rarely elevate body temperature above T_{set} , likely due to the potential for major developmental alterations.



Experimental thermal treatments were applied throughout gravidity using climatic chambers. The impact of chamber treatment on snake body temperature was first validated using physical models made from rubber tubes filled with water (Lelièvre *et al.*, 2010), reproducing the thermal characteristics of the study species (correlation coefficient = 0.95).

Variables measured:

1) Reproduction phenology

For each female, we recorded the dates of pre-oviposition ecdysis, oviposition, and hatching of the eggs. Time period between ecdysis and oviposition provided an estimate of gravidity duration (Lourdais *et al.*, 2008).

2) Offspring traits

In order to quantify the impact of thermal manipulations during gravidity on offspring quality, we considered a set of traits related to fitness:

Morphology

Morphological data were collected at hatching and two weeks after hatching to evaluate growth rates. Since hatching snake size (both mass and length) is well documented to have positive influence on neonatal survival (Sinervo *et al.* 1992; Brown and Shine 2004), we measured snout-vent length (± 0.1 mm), total length (± 0.1 mm), and body mass (± 0.01 g). We also collected tail length (± 0.1 mm) and jaw length (± 0.01 mm). Tail length is an important parameter in snakes since a longer tail positively influences locomotor performance (Aubret *et al.*, 2005a). Since snakes are gape-limited predators, jaw size impacts the range of potential prey items and thereby individual performance and fitness (Forsman and Lindell, 1993). We estimated body condition, which reflects the amount of energy stores, as the residual of the regression of body mass on snout-vent length. We used scan images of neonate ventral surfaces to count ventral scales and determine the prevalence of split ventral scales.

Swimming and Contraction Performance

We measured swimming and contraction force for each neonate. All trials were performed at a room temperature of $20.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$. Swimming speed may be a biologically relevant factor to estimate locomotor and predator evasion abilities (Webb *et al.*, 2001; Stahlschmidt *et al.*, 2009). We conducted swimming trials in a PVC swimming track (3.5 m long, 0.3 m high and 0.16 m wide) with water maintained at 31.5°C . We encouraged snakes to swim at their maximum speed by



gently tapping their tails throughout the trial. Using a stopwatch, we recorded the time (± 0.01 seconds) for the head to traverse the raceway (trial length = 2.5 m). Between each trial, snakes were handled out of the water for 10 seconds and then replaced at the swimming starting point. We conducted three successive trials on two consecutive days within three days of hatching. We used maximum and mean swimming speed over all trials in the analysis.

Contraction force provides an indicator of neonate defensive response to handling (Stahlschmidt *et al.*, 2009), as well as an estimate of strength. This is especially important in constricting snakes that rely on force to subdue their prey (Lourdais *et al.*, 2005). Contraction force was assessed between 2 and 3 weeks after hatching. Snakes react to handling, especially attempts to stretch out their bodies, by vigorous and extended body contraction. We quantified this behavior using a dynamometer (Force Gauge 200N, Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). The tail of the snake was attached to the dynamometer using a string. We then immobilized the body maintaining the snake in a stretched position on the ground. To avoid residual traction, the dynamometer was reset just before the beginning of each test. Body contraction was stimulated by gentle palpation of the back. The highest value (± 0.05 Newtons) obtained during one minute of stimulation was recorded. During the same time, we also collected the number of contractions as an estimate of defensive motivation. Three consecutive trials (one minute each) were performed for each individual. We used maximum and mean contraction force and maximum and mean contraction number in the analyses.

Antipredator behavior

Defensive behavior was quantified within three days of hatching. Two trials were conducted over two successive days. Snakes were placed in an arena and stimulated with a stick to mimic a predator attack (Stahlschmidt and DeNardo, 2009). The number of strikes elicited over one minute was recorded.

Metabolic rate

We used closed system respirometry to measure standard metabolic rate (SMR) two weeks after hatching. Trials were conducted at $31.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$ in opaque test chambers (average internal volume 1900 ml; the exact volume was incorporated into the analyses) covered with a glass lid made airtight using closed-cell foam. Each test chamber contained a small piece of paper towel to allow the snake to hide, and thus remain inactive. To assure that the temperature had stabilized, the animals were placed in their test chambers inside the environmental chamber for 2 hr prior to conducting the SMR trial. Trials were conducted between 11 am and 4 pm. Outside air was drawn into each



chamber using a Bioblock Scientific 5 l air pump for three minutes assuring 99 % air turnover (Lasiewski *et al.*, 1966). Baseline samples of outside air were collected at the onset of each trial. The test chambers were sealed, and the time of closure was recorded. Trial duration (approximately 180 min) ensured sufficient O₂ suppression (0.1%). At the end of each trial, time was recorded and an end air sample was collected using two 140-ml syringes connected to the chamber via a three-way stopcock. O₂ concentration of the sample was then determined using an oxygen analyzer (resolution 1 part per million; FC10A, Sable Systems, Las Vegas, USA). Each air sample was stripped of moisture by first passing through Drierite and then sent at a controlled rate (18 ml.min⁻¹) to the analyzer using an infusion pump (KDS 210, KD Scientific Inc, Holliston, USA). The analyser was calibrated at the infusion pump flow rate prior to each session. Oxygen consumption (± 0.01 ml.hr⁻¹) was calculated as: (baseline oxygen concentration - final oxygen concentration) X volume of the trial chamber / duration of the trial.

Statistical analyses

All statistical comparisons were performed with R software (version 2.12.1, Development Core Team 2010) using linear models (lm models, stats package), linear mixed models (lme models, nlme package), and generalized linear mixed models for binomial distribution (glmer models, lme4 package). For each test, the distribution was checked and variables were transformed when necessary. Significance was determined at alpha = 0.05 for all tests. Experiments were conducted in 2008 and 2010. Treatments were evenly distributed across years. We found no year effect and this parameter was not included in the analyses. Some females (n = 3) appeared twice and their contribution was accounted for in the analyses (random effect on female identity).

We analyzed data of reproduction phenology using a one-factor ANOVA to test for the effect of thermal treatment on gravidity duration and incubation duration. Since siblings are not independent statistical units (Massot *et al.* 1994), in all other statistical tests on offspring traits, we used linear mixed models analyses, with female identity as a random factor.

Although energy allocation into the eggs (i.e., clutch size and clutch mass) occurs during vitellogenesis, parameters such as maternal size and clutch size are known to influence offspring traits (Olsson and Shine, 1997; Bonnet *et al.*, 2001; Andrews, 2004). To control for maternal investment and allocation trade-offs, we included clutch size adjusted for mother snout-vent length (residuals of the regression of clutch size on mother snout-vent length) in the models for snout-vent-length and body mass at birth. Body condition was calculated as residual values from the regression of body mass against snout-vent length. Body proportions (i.e., tail length and jaw length relative to body length) were analyzed using snout-vent length as a covariate. Growth



patterns were analyzed using initial measurement at hatching as a covariate. To test for effects of thermal treatment and other co-factors (described above), we used the model with the smallest Akaike's Index Criterion (AIC). When two models differed by less than 2 AIC, we chose the more parsimonious (Appendix: tables A1, A2 and A3). When the effect of thermal treatment was statistically significant, Tukey *post-hoc* tests were performed to allow for 2x2 comparisons in the selected model (multcomp package). Values are presented as mean $\pm$ SE.

Results

1) Influence of treatment on reproduction phenology

Thermal treatment influenced gravidity duration (one-way ANOVA, $F_{2,27} = 56.431$, $p < 0.001$, Fig. 2a). Gravidity duration was shortest with 24H- T_{set} (22.5 days $\pm$ 1.0), intermediate with 4H- T_{set} (32.7 days $\pm$ 1.1), and longest with NR (38.0 days $\pm$ 1.1; Tukey *post-hoc* tests: 4H- T_{set} vs. 24H- T_{set} , $t = -6.655$, $p < 0.001$, 24H- T_{set} vs. NR, $t = -10.421$, $p < 0.001$, and 4H- T_{set} vs. NR, $t = 3.400$, $p = 0.006$). Incubation duration was also significantly different among groups (one-way ANOVA, $F_{2,26} = 7.197$, $p = 0.003$, Fig. 2b). *Post-hoc* tests revealed no differences in incubation duration between the two constraining thermal treatments (47.8 $\pm$ 0.6 and 47.8 $\pm$ 0.5 days for 4H- T_{set} and NR, respectively; $t = 0.066$, $p = 0.998$). However, incubation was longer with 24H- T_{set} (50.1 days $\pm$ 0.5; Tukey *post-hoc* test, 24H- T_{set} vs. 4H- T_{set} , $t = 3.162$, $p = 0.011$, 24H- T_{set} vs. NR, $t = 3.291$, $p = 0.007$).

2) Influences of treatment on hatchling traits

191 hatchlings were born during this experiment: 62 in the 24H- T_{set} treatment, 61 in the 4H- T_{set} treatment, and 68 in the NR treatment. All values and the results of the Tukey *post-hoc* tests are presented in Tables 1 and 2.

Scale numbers and abnormalities

Thermal treatment influenced ventral scale number of hatchlings ($F_{2,175} = 5.350$, $p = 0.006$). Hatchlings from the NR treatment had significantly more ventral scales than hatchlings from the 4H- T_{set} treatment (Table 1). The difference between offspring ventral scale number and mother



ventral scale number was strongly influenced by thermal treatment ($F_{2,175} = 5.252$, $p = 0.006$). Hatchlings from the NR treatment had, on average, 4.4 supernumerary ventral scales compared to their mother, while hatchlings from the 4H- T_{set} treatment had, on average, 2.7 additional scales. Hatchlings from the 24H- T_{set} treatment (Table 1) had an intermediate value, which was not significantly different from either of the other two thermal treatments. The proportion of individuals exhibiting split ventral scales and the mean number of split ventral scales per individual was not different among treatments (Table 1).



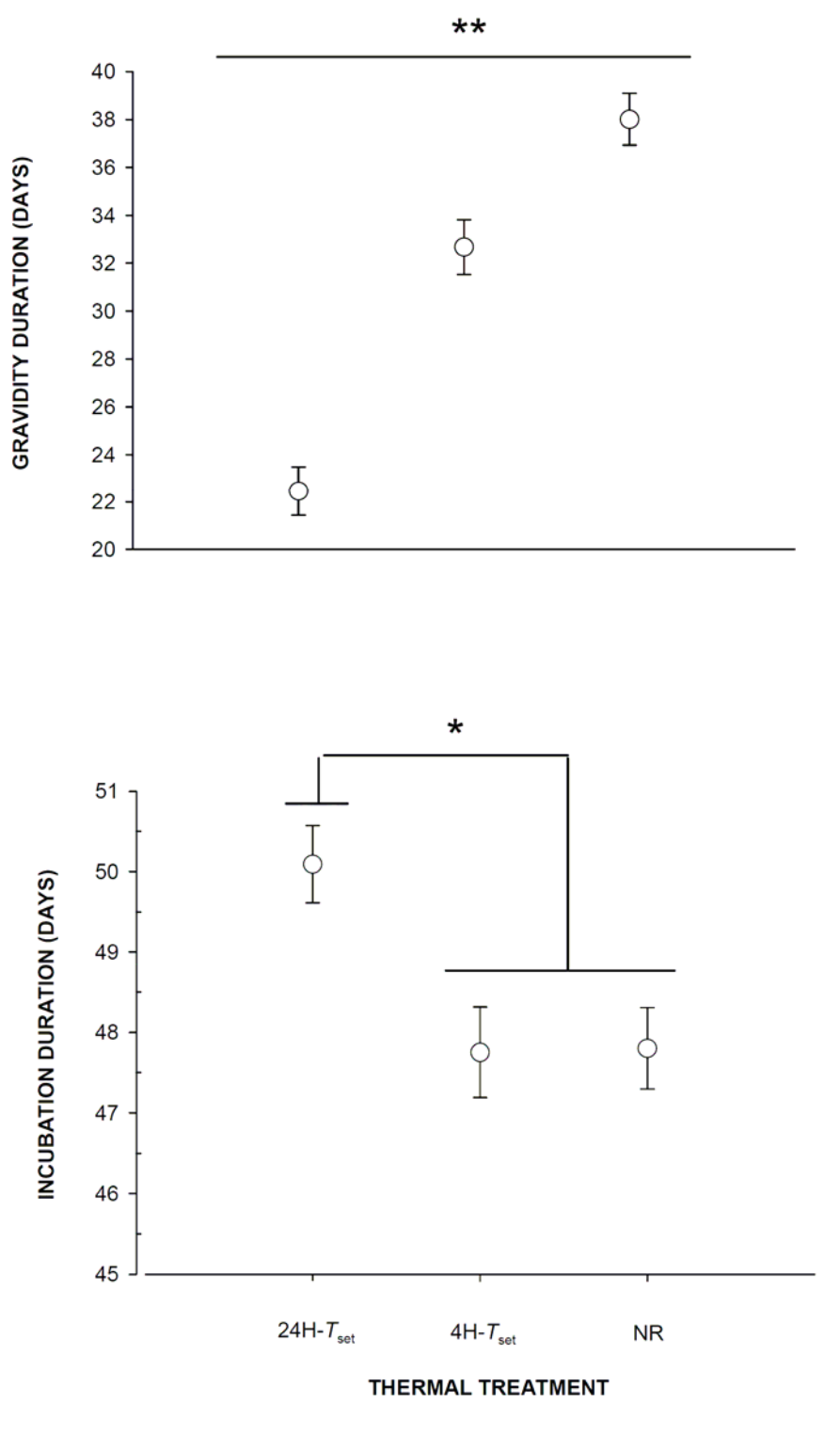


Figure 2. Influence of thermal treatment during gravity on gravity (a) and incubation (b) durations in days. Errors bars represent SE.



Offspring morphology and growth

Thermal treatment did not influence offspring snout-vent length. We found a significant effect of mother snout-vent length adjusted clutch size on hatchlings size ($F_{1,85} = 13.433$, $p < 0.001$). Considering body proportions, jaw length was not influenced by thermal treatment, but was explained by snout-vent length at hatching ($F_{1,186} = 35.840$, $p < 0.001$, see Table 1). Tail length was significantly influenced by thermal treatment ($F_{2,183} = 4.112$, $p = 0.018$) and also by snout-vent length ($F_{1,183} = 50.673$, $p < 0.001$). Hatchlings from the 24H- T_{set} treatment had a longer tail than hatchlings from both of the thermally constrained treatments (Table 1). Body mass was influenced by thermal treatment ($F_{2,183} = 6.651$, $p = 0.002$), adjusted-clutch size ($F_{1,183} = 29.337$, $p < 0.001$), and thermal treatment ($F_{1,184} = 15.769$, $p < 0.001$, Table 1). Hatchlings from the NR regime were heavier and had a higher body condition than hatchlings from the two other treatments (Table 1).

Thermal treatment did not influence growth in body size (Table 1), which, instead, was mainly determined by snout-vent length at hatching ($F_{1,183} = 28.964$, $p < 0.001$) and body condition at hatching ($F_{1,183} = 19.465$, $p < 0.001$). Tail growth was influenced both by thermal treatment ($F_{2,177} = 3.975$, $p = 0.020$, Table 1) and by tail length at hatching ($F_{1,177} = 8.879$, $p = 0.003$). Tail growth was greatest for hatchlings from the 24H- T_{set} treatment. Hatchlings from the 24H- T_{set} treatment had greater jaw growth than hatchlings from the two other treatments ($F_{2,184} = 13.428$, $p < 0.001$, Table 1).

Offspring behavior

Thermal treatment influenced the proportion of individuals eliciting strikes (glmer model for binomial distribution, $p < 0.05$). Since body condition also significantly influenced the proportion of strikers ($z = 3.085$, $p = 0.002$), we corrected for body condition and found that the NR treatment significantly reduced the number of hatchlings that struck (Table 2). Among striking individuals, total strike number (log-transformed data) was not different among treatments, but instead, was mainly explained by body condition ($F_{1,102} = 7.891$, $p = 0.006$).

Table 1. Influences of thermal treatment during gravidity on morphological traits and growth patterns of hatchling pythons (*Antaresia childreni*). Values are presented as least square mean $\pm$ SE. “ns” non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Results of Tukey *post hoc* tests are indicated when the effect of thermal treatment was significant. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) between groups.



Résultats- Chapitre 1 : Sensibilité thermique embryonnaire

MORPHOLOGY (least square mean $\pm$ SE)							
Trait	GRAVIDITY TREATMENT			Treatment	Tukey <i>post hoc</i> test		
	24H- <i>T</i> set	4H- <i>T</i> set	NR		24H- <i>T</i> set	4H- <i>T</i> set	NR
Snout-vent length (mm)	237.3 $\pm$ 1.6	231.7 $\pm$ 1.6	235.6 $\pm$ 1.4	ns			
Body mass (g)	8.16 $\pm$ 0.14	8.14 $\pm$ 0.14	9.19 $\pm$ 0.13	**	A	A	B
Tail length (mm)	28.4 $\pm$ 0.2	27.5 $\pm$ 0.2	27.4 $\pm$ 0.19	*	A	B	B
Jaw length (mm)	13.93 $\pm$ 0.05	13.94 $\pm$ 0.05	13.86 $\pm$ 0.04	ns			
Body condition	-0.004 $\pm$ 0.004	-0.002 $\pm$ 0.004	0.029 $\pm$ 0.006	**	A	B	C
Ventral scale number (VSN)	263.0 $\pm$ 0.5	261.7 $\pm$ 0.7	263.3 $\pm$ 0.6	**	AB	A	B
VSN offspring - VSN mother	3.07 $\pm$ 0.56	2.73 $\pm$ 0.84	4.42 $\pm$ 0.67	**	AB	A	B
% of split ventral scale	0.31 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.06	ns			
Split ventral scale number	0.63 $\pm$ 0.18	1.28 $\pm$ 0.34	1.04 $\pm$ 0.21	ns			
Snout-vent length growth (mm/d)	1.17 $\pm$ 0.07	1.15 $\pm$ 0.07	1.25 $\pm$ 0.07	ns			
Jaw growth (mm/day)	0.032 $\pm$ 0.002	0.020 $\pm$ 0.002	0.017 $\pm$ 0.001	***	A	B	B
Tail growth (mm/day)	0.091 $\pm$ 0.009	0.053 $\pm$ 0.009	0.067 $\pm$ 0.008	*	A	B	AB



Maximal swimming speed recorded was significantly influenced by thermal treatment ($F_{2,184} = 4.020$, $p = 0.020$). Variations between successive trials were minor (CV: 2.01%, 1.48% and 3.47% for 24H- T_{set} , 4H- T_{set} and NR respectively). Hatchlings from the NR treatment were significantly slower than individuals from the 24H- T_{set} treatment, while hatchlings from the 4H- T_{set} treatment were not significantly different from either of the other two groups (Table 2). Average swimming speed was also influenced by thermal treatment ($F_{2,184} = 6.459$, $p = 0.020$). NR treatment hatchlings had a slower mean speed compared to the other two treatments (Table 2).

Thermal conditions during gravidity influenced maximal contraction force ($F_{2,170} = 12.905$, $p < 0.001$). Variation between trials was highest with 24H- T_{set} (CV: 30.0%, 18.9% and 9.1% for 24H- T_{set} , 4H- T_{set} and NR respectively). Still, maximal contraction force was significantly lower in the NR group compared to the other two treatments (Table 2). Average contraction force over the three trials was also different among treatments ($F_{2,170} = 5.234$, $p = 0.006$), suggesting a lower endurance for hatchlings from the NR treatment (Table 2).

Maximum number of contractions, as well as average number of contractions, were also influenced by thermal treatment ($F_{2,170} = 24.009$, $p < 0.001$ and $F_{2,170} = 11.877$, $p < 0.001$, respectively). Both of these values were lower for hatchlings from the NR treatment (Table 2).

Metabolism

Hatchlings standard metabolic rate at 14 days of age was significantly influenced by thermal treatment ($F_{2,203} = 5.944$, $p = 0.003$) and also by body mass ($F_{1,203} = 13.661$, $p < 0.001$). Hatchlings from the NR treatment had a significantly higher standard metabolic rate than hatchlings from either of the other two treatments (Table 2).



Table 2. Influences of thermal treatment during gravity on performance traits and physiology of hatchling pythons (*Antaresia childreani*). Values are presented as mean $\pm$ SE. “ns” non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Results of Tukey *post hoc* tests are indicated when the effect of thermal treatment was significant. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) between groups.

PERFORMANCES AND BEHAVIOUR (mean $\pm$ SE)						
Performance	GRAVITY TREATMENT				Tukey <i>post hoc</i> test	
	24H-T set	4H-T set	NR	Treatment	24H-T set	4H-T set
Proportion of strikers (%)						
corrected for body condition	75.6 $\pm$ 6	49.4 $\pm$ 6.0	40.2 $\pm$ 6.6	*	A	A
Total strike number	20.09 $\pm$ 2.67	17.83 $\pm$ 2.84	14.52 $\pm$ 2.20	ns		
Maximal swimming speed (cm.s ⁻¹)	22.28 $\pm$ 0.73	20.69 $\pm$ 0.51	20.70 $\pm$ 0.56	*	A	AB
Mean swimming speed (cm.s ⁻¹)	17.65 $\pm$ 0.51	17.12 $\pm$ 0.37	16.14 $\pm$ 0.41	**	A	A
Maximal strength force (N)	1.16 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.05	***	A	A
Mean strength force (N)	0.83 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.04	**	A	A
Maximum contractions number	8.09 $\pm$ 0.52	8.26 $\pm$ 0.57	6.44 $\pm$ 0.37	***	A	A
Mean number of contraction	5.78 $\pm$ 0.36	5.81 $\pm$ 0.34	4.77 $\pm$ 0.28	***	A	A
O ₂ consumption (mL.h ⁻¹ .g ⁻¹)	0.11 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.05	**	A	A



Discussion

Mothers can exert profound influences on their developing offspring (Shine, 2004; Mousseau and Fox, 1998). Maternal behavioral and thermoregulatory shifts during embryonic life are widespread in invertebrates (Tallamy and Wood, 1986; Machado and Raimundo, 2001), amphibians (McDiarmid, 1978; Gvoždik, 2005), reptiles (Schwarzkopf and Shine, 1991; Lourdais *et al.* 2008), birds (Bartholomew and Dawson, 1979; Grant, 1982), and mammals (Laburn *et al.*, 2001; Gross, 2005; Solick and Barclay, 2006). In this study, we demonstrated the benefits of maternal thermoregulation at preoviposition developmental stages in the Children's python (*Antaresia childreni*). Thermal treatments were designed to mimic ecologically relevant conditions ranging from a non-constraining thermal environment for gravid females (24H- T_{set} : constant preferred temperature), a thermally constrained environment for gravid females (4H- T_{set} : limited access to preferred temperature), and the typical thermal profile of a non-reproductive female (NR). Overall we demonstrated that i) thermoregulatory changes associated with gravidity strongly influence developmental duration and fitness-relevant offspring traits and ii) access to preferred temperature, even if of suboptimal duration, significantly enhances reproductive success independent of any effects of mean incubation temperature.

Maternal temperature influences gravidity durations and date of hatching

Thermal treatment strongly impacts gravidity duration. As predicted, suboptimal conditions significantly slowed down development. Gravidity was respectively 45.5% and 69.2% longer with the 4H- T_{set} and NR treatments. More importantly, while the two suboptimal treatments were similar in mean temperature, gravidity duration was significantly shorter when females could access their T_{set} . A slight but significant decrease in incubation duration was observed in the two suboptimal regimes. These results could be interpreted as a positive compensatory response of the

embryos. For instance, a recent study demonstrated compensatory cardiac response during embryonic life in turtles with accelerated developmental rate (Du and Shine, 2010). A non-exclusive hypothesis is that there is a prolonged retention of eggs when conditions are suboptimal, enabling more of development to occur within the female (Warner and Andrews, 2003). Additional studies on embryonic stage at oviposition are required to address these hypotheses. Regardless, total developmental time from ecdysis to hatching was much longer in the constrained groups



Résultats- Chapitre 1 : Sensibilité thermique embryonnaire

(72.5 days for 24H- T_{set} , 80.3 days for 4H- T_{set} and 85.8 days for NR). Maternal thermoregulation during gravidity significantly hastens developmental rate, modifying oviposition date and thereby hatching date. Hatching date is a critical parameter that will determine postnatal environment (Olsson and Shine, 1997b; Olsson and Shine, 1998). With seasonally fluctuating climates, date of birth may affect offspring foraging opportunities and thereby survival (Warner and Shine, 2007). Maternal influences appear beneficial by accelerating embryogenesis as observed in an oviparous lizard (Shine, 2006).

Maternal temperature affects offspring quality

Thermal treatment during gravidity affected morphology, performance, and behavioral traits of hatchlings despite incubation of all eggs at the same temperature. Offspring body mass and body proportions were significantly affected by thermal treatments. Neonates from the two suboptimal treatments had impaired jaw growth and significantly shorter tails, the latter reflecting previous results in lizards incubated at cooler temperatures (Elphick and Shine, 1998; Qualls and Andrews, 1999). Our results suggest a deleterious impact of suboptimal conditions on head plasticity. Adaptive plasticity (enhanced head growth) has been previously studied in response to trophic environment (Forsman, 1996; Forsman and Shine, 1997; Aubret *et al.*, 2004). In our study, hatchlings from the NR regime were heavier and had a higher body condition, yet had reduced jaw length. Similar effects were found in lizard species (Shine and Harlow, 1993) and may be interpreted as altered efficiency of yolk conversion to body tissues.

Offspring from the NR treatment had the highest metabolic rates, which may represent a positive compensation to suboptimal temperatures during gravidity. Yet in our context, high standard metabolic rate may also be disadvantageous (high maintenance costs) since this parameter was measured in fasting animals 15 days after hatching. Metabolic response to incubation temperatures have been reported in other species (Deeming and Fergusson, 1991; Birchard and Reiber, 1995; O'Steen and Janzen, 1999). However, metabolic rate may change dramatically after hatching (Schultz *et al.*, 2008). Since only a single measurement was made in our study, it is not possible to conclude if the response is irreversible (developmental acclimation) or developmentally plastic (reversible acclimation; Angilletta, 2009). Still, we detected a difference in standard metabolic rate in hatchlings exposed to standardized incubation conditions (45 days), which thereby reflects long-term influences of the thermal conditions during gravidity.

Most importantly, behavior at hatching was affected by thermal treatment. Snakes are independent at birth and altered defensive behavior may affect survival (Burger, 1998). Hatchlings



from the NR treatment consistently demonstrated reduced anti-predator behavior, having a reduced propensity to strike, reduced swimming speed endurance, and reduced contraction force (both maximal and mean) compared to the 4H- T_{set} and 24H- T_{set} treatments.

Overall, these results highlight a major impact of thermal conditions during early embryonic life on both phenological and offspring traits. Our data consistently identify reduced offspring quality in the suboptimal treatments. While morphology was little affected, major differences were detected in physiology and behavior. Since early development is highly sensitive to temperature, thermoregulatory shifts displayed by gravid females (e.g., the 24H- T_{set} vs. the NR treatments) are likely adaptive. Minor maternal investment provides great benefits by hastening development rate and enhancing offspring quality and current reproductive value, which is further corroborated by strong support for positive selection and heritability of maternal care (Mc Gaugh *et al.*, 2009; Wapstra *et al.*, 2010).

Access to preferred body temperature enhances offspring phenotype

Thermal sensitivity of development has attracted considerable scientific interest. Thermal variance, as well as mean temperature, can modify phenotypic hatchlings traits (Webb *et al.*, 2001; Shine, 2004b; Du and Shine, 2010). Such effects are essential to consider when studying maternal thermoregulation that is likely affected by basking opportunities and diel cycle. We mimicked differing maternal thermoregulation patterns at early developmental stages to address the relevance of thermoregulatory accuracy. We found that while continued access to preferred body temperature was optimal for offspring development, even a short period at preferred temperature was sufficient to significantly shorten gravidity duration and enhance fitness relevant offspring traits, even when the mean developmental temperature was kept constant (i.e., the 4H- T_{set} vs. the NR treatments). For most behavioral traits, offspring from the 4H- T_{set} treatment were not different from 24H- T_{set} , while neonates from the NR treatment displayed lower quality. Our design did not allow us to fully disentangle thermal influences since the three groups also differed in thermal variance. However, the fact that offspring from the 4H- T_{set} treatment were either equivalent or closer to 24H- T_{set} treatment in terms of phenological and offspring traits indicates that access to preferred body temperature may be more relevant than mean temperature and thermal variance during development. Active maternal thermoregulation likely provides a robust means to extend exposure to optimal developmental temperature and thereby enhances offspring quality. These results suggest non-linear thermal benefits on development that need to be addressed more thoroughly.



Evolution of complex prenatal care

Our study focused on gravidity in an oviparous squamate and clearly supports the significance of maternal regulation. According to Farmer (2000), thermal sensitivity at early embryonic stages favored the emergence of prenatal care and offered a key context for further complexification in parental care in vertebrates. Viviparity has emerged over 108 times in squamates (Blackburn 2006), presumably as a means to protect embryos from external conditions (Shine, 1995; Shine,

2000). This reproductive mode may have evolved via extension of pre-existing adaptations in oviparous squamates as suggested by Shine (2006). Our results provide the first experimental support for this “pre-adaptation” hypothesis in snakes. Finally, pythons are unique among squamates in possessing complex maternal care for their eggs (Vinegar, 1970; Harlow and Grigg, 1984; Slip and Shine, 1988; Lourdaïs *et al.*, 2007; Stahlschmidt *et al.*, 2008a, 2008b). Additionally, many python species (possibly all) display specific thermoregulatory behavior (inverted basking) during gravidity. As with the evolution of viviparity, regulation of early developmental conditions may be a general, possibly ancestral trait within pythons, that favored further maternal investment after oviposition (egg brooding).

Acknowledgements

We thank David Pinaud and Michaël Guillon for their statistical help. Julie Volette, Gersende Dangoisse and Hélène Lisse participated in data collection. We thank Christian Thiburce and Xavier Duchemin for snake care. Financial support was provided by the FYSEN Foundation, the Natural Sciences Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the CNRS (DSV and INEE).



Appendix A1. Factors and AIC criteria used in statistical models for offspring morphological traits at hatching. For each offspring trait, we compared the null model to models including biologically relevant factors and thermal treatment. When models differed by less than 2 AIC, we chose the most parsimonious (lower number of parameters).

Offspring Trait	Model	Factors included in the model	AIC	Parameters number
SVL	Null model	Female Identity	1562.71	3
	Model 1	Female identity + mother SVL	1551.68	4
	Model 2	Female identity + Treatment	1559.39	5
	Model 3	Female Identity + Treatment + Mother SVL adjusted clutch size	1552.56	6
Body mass	Null model	Female Identity	548.96	3
	Model 1	Female identity + clutch size	512.44	4
	Model 2	Female identity + Treatment	536.60	5
	Model 3	Female identity + Treatment + clutch size	501.18	6
Tail length	Null model	Female Identity	805.74	3
	Model 1	Female identity + Snout-vent length at birth	763.46	4
	Model 2	Female identity + Treatment	799.33	5
	Model 3	Snout-vent length at birth	759.18	6
Body condition	Null model	Female Identity	-635.69	3
	Model 1	Female identity + Treatment	-667.17	5
Head length	Null model	Female Identity	185.81	3
	Model 1	Female identity + Snout-vent length at birth	154.54	4
	Model 2	Female identity + Treatment	189.31	5
	Model 3	Female identity + Treatment + Snout-vent length at birth	158.53	6
Ventral scale number (VSN)	Null model	Female Identity	1117.35	3
	Model 1	Female identity + Treatment	1111.64	5
Offspring VSN - Female VSN	Null model	Female Identity	1129.72	3
	Model 1	Female identity + Treatment	1123.90	5
Split ventral scale number	Null model	Female Identity	260.86	3
	Model 1	Female identity + Treatment	264.73	5
% split ventral scale number	Null model	Female Identity	268.86	3
	Model 1	Female identity + Treatment	271.70	5



Appendix A2. Factors and AIC criteria used in statistical models for offspring physiology. For each offspring trait, we compared the null model to models including biologically relevant factors and thermal treatment. When parameters differed by less than 2 AIC, we chose the most parsimonious (lower number of parameters).

Offspring Trait	Model	Factors included in the model	AIC	Parameters number
SVL growth	Null model	Female Identity	374.69	3
	Model 1	Female identity + Treatment	372.80	5
	Model 2	Female identity + Snout-vent length at birth	349.43	4
	Model 3	Female identity + Body condition at birth	347.16	4
	Model 4	Female identity + Body condition at birth + treatment	350.89	6
	Model 5	Female identity + Snout-vent length at birth + Treatment	350.91	6
	Model 6	Female identity + Body condition at birth + Snout-vent length at birth	335.32	5
Head growth	Null model	Female Identity	-1059.39	3
	Model 1	Female identity + Treatment	-1076.27	5
	Model 2	Female identity + head length at birth	-1081.49	4
	Model 3	Female identity + Treatment + head length at birth	-1100.20	6
Tail growth	Null model	Female Identity	-478.81	3
	Model 1	female identity + treatment	-478.68	5
	Model 2	Female identity + tail length at birth	-485.25	4
	Model 3	Female identity + Treatment + tail length at birth	-489.81	6
Metabolic rate	Null model	Female Identity	112.65	3
	Model 1	Female identity + Treatment	101.26	5
	Model 2	Female identity + body mass	101.90	4
	Model 3	Female identity + Treatment + body mass at birth	94.08	6



Appendix A3. Factors and AIC criteria used in statistical models for offspring performances. For each offspring trait, we compared the null model to models including biologically relevant factors and thermal treatment. When parameters differed by less than 2 AIC, we chose the most parsimonious (lower number of parameters).

Offspring Trait	Model	Factors included in the model	AIC	Parameters number
Maximal swimming speed	Null model	Female Identity	979.77	3
	Model 1	Female identity + Treatment	977.15	5
	Model 2	Female identity + Snout-vent length at birth	980.08	4
	Model 3	Female identity + Snout-vent length at birth + Treatment	977.70	6
Average swimming speed	Null model	Female Identity	1061.34	3
	Model 1	Female identity + Treatment	1053.24	5
	Model 2	Female identity + Snout-vent length at birth	1062.43	4
	Model 3	Female identity + Snout-vent length at birth + Treatment	1054.65	6
% strikers	Null model	Female Identity	253.62	2
	Model 1	Female identity + Treatment	252.25	4
	Model 2	Female identity + body condition	252.37	3
	Model 3	Female identity + Treatment + body condition	244.26	5
Total strike score	Null model	Female Identity	341.39	3
	Model 1	Female identity + Treatment	342.09	5
	Model 2	Female identity + body condition	335.69	4
	Model 3	Female identity + Treatment + body condition	338.72	6
Maximal traction force	Null model	Female Identity	260.08	3
	Model 1	Female identity + Treatment	249.22	5
	Model 2	Female identity + body mass at birth	262.04	4
	Model 3	Female identity + treatment + body mass at birth	251.07	6
Mean traction force	Null model	Female Identity	165.69	3
	Model 1	Female identity + Treatment	160.22	5
	Model 2	Female identity + body mass at birth	166.78	4
	Model 3	Female identity + treatment + body mass at birth	162.21	6
Max number of contraction	Null model	Female Identity	1038.33	3
	Model 1	Female identity + Treatment	1010.42	5
Mean number of contraction	Null model	Female Identity	885.77	3
	Model 1	Female identity + Treatment	873.04	5



The significance of maternal thermal effects: relevance of stage-dependent embryonic sensitivity

LORIOUX Sophie^{1,4}, VAUGOYEAU Marie¹, DENARDO Dale F.², CLOBERT Jean³ and LOURDAIS Olivier^{1,2}

¹ Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS UPR 1934, 79360 Villiers en Bois, France

² School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

³ Station d'Ecologie Expérimentale du CNRS USR 2936, Moulis, 09200 Saint-Girons, France

⁴ Université de Poitiers, 40 avenue du recteur Pinaud 86022 Poitiers, France

Correspondance:

Sophie Lorient, CEBC-CNRS UPR 1934

79360 Villers en Bois, FRANCE

Phone: +33 (0) 5 49 09 35 52

Fax: + 33 (0) 5 49 09 65 26

E-mail: lorieux@cebc.cnrs.fr

Tables: 3

Figures: 5

For consideration in: The American Naturalist

Summary

Developmental plasticity is a central issue because induced variation can reflect either adaptive responses to environmental factors or developmental constraints. Mothers can influence developmental conditions in many ways, and the prevalence of maternal effects (i.e., transgenerational plasticity) is increasingly recognized. Studies in biomedicine demonstrate that embryonic sensitivity varies dramatically over the course of development; however, this dynamic remains to be considered in an evolutionary and ecological perspective. If developmental sensitivity



is stage-dependent, then the significance of maternal regulation of the developmental environment likely varies over the course of embryonic life.

One well-established maternal effect involves the regulation of the thermal environment for the developing embryos. In viviparous squamates, maternal thermoregulation can provide significant benefits either from shortened development duration or improved offspring phenotype. We experimentally manipulated thermal conditions at different stages of pregnancy in a viviparous snake, the aspic viper (*Vipera aspis*). We imposed ecologically relevant temperature cycles mimicking daily thermal regimes maintained by pregnant and non-pregnant females. Exposure to a cold temperature cycle (non-pregnant) early in embryonic life had a deleterious impact on offspring quality. In turn, later stages (fetal life) were less sensitive, and offspring developed compensatory responses. Developmental rate was slowed by cold temperature independent of the timing of the exposure. Our results provide new insight into the significance of maternal effects in the frame of stage-dependent embryonic thermal sensitivity.

Key-words: maternal effects, viviparity, thermoregulation, embryo, development



INTRODUCTION

Living organisms are especially sensitive to environmental fluctuations during development (O'Loan *et al.* 2007; Sarkar *et al.* 2007; Henry and Ulijaszek 2009; Williams and Casanova 2010; Mihaila *et al.* 2011). Alterations in developmental conditions can translate into detrimental effects with possible long-term and irreversible consequences (Lumma and Clutton-Brock 2002; Lummaa 2003; Gorman and Nager 2004; Meylan and Clobert 2005; Auperin and Geslin 2008; Henry and Ulijaszek 2009; Uller and Olsson 2009). Alternately, adaptive developmental plasticity can occur in response to environmental cues (Meyer and Bull 2002; Bateson *et al.* 2004) that are indicative of the postnatal environment (West-Eberhardt 2003; Monaghan 2008). These contrasted responses may depend on the nature and the intensity of the environmental factors.

Mothers can influence the developmental conditions of their progeny in many ways by serving as an interface with the external environment. For instance, a female can influence its developing progeny via non-genetic mechanisms including hormonal, immune, and nutrient transfers (Müller *et al.* 2007; Tschirren *et al.* 2007; Cumo *et al.* 2009; Gagliano and McCormick 2009; Hasselquist and Nilsson 2009). The evolution of maternal effects has attracted considerable attention over the last decade or so (Mousseau and Fox 1998; Marshall and Uller 2007; Uller 2008). Maternal effects are typically favorable in that they enable a phenotypic match of their offspring to the local environment or buffer offspring from environmental stressors (i.e., transgenerational adaptive plasticity). However, non-adaptive effects have also been reported either through passive influences (i.e., toxin transfer) or a mismatch with the postnatal environment (Lugo *et al.* 2003; Garamszegi *et al.* 2007; Meylan *et al.* 2007, Kohman *et al.* 2008; Uller *et al.* 2009) as proposed in the thrifty phenotype hypothesis (Hales and Barker 2001).

In many vertebrate and invertebrate taxa (Mc Diarmid 1978; Clutton-Brock 1991; Badyaev and Ghalambor 2001; Reynolds *et al.* 2002; Gross 2005) maternal care will buffer developmental sensitivity from environmental conditions. One of the most taxonomically wide-spread maternal influence is on developmental temperature (Bernardo 1996). Embryonic thermal sensitivity is a universal feature among vertebrates (Deeming and Fergusson 1991; Farmer 2000; Gillooly and Dodson 2000; Ojanguren and Braña 2003) and has also been documented in invertebrates (Johnston and Benett 1996; Byrne *et al.* 2009). For instance, embryonic development rate is strongly temperature-sensitive (Gillooly and Dodson, 2000; Gillooly *et al.* 2002). Restricted thermal tolerance is considered a major driving force in evolutionary transitions (Farmer 2000), such as the evolution of viviparity (Tinkle and Gibbons 1979; Shine 1995; Webb *et al.* 2006) and endothermy (Farmer 2000, 2003), through an improved maternal control of developmental conditions.



While maternal influences on development can be substantial, they should be addressed in the frame of embryonic sensitivity, which is dynamic. Embryonic development involves complex integrated steps (Andrews 2004). General organization, including neurulation and organogenesis, occurs in earlier stages whereas somatic growth is more pronounced during mid and late development. Embryonic development is known to be particularly sensitive during early stages (Sulik *et al.* 1981; Birchard and Reiber 1995; Shine and Elphick 2001; Andrews 2004), with perturbations at that time often resulting in developmental disruption or even death (Vercken *et al.* 2006, Braña and Ji 2007, Auperin and Geslin 2008; Barker 2009; Wootton and Jackson 2009).

Squamate reptiles offer an ideal opportunity to examine maternal thermal influences. Since squamates are predominantly lecithotrophic (Stewart and Thompson 2000; Blackburn 2005), maternal effects during pregnancy are mainly associated with thermal influences (Tinkle and Gibbons 1979; Shine and Harlow 1993; Shine 1995; Bernardo 1996). Gravid females typically display intense basking behaviors and shifts in their thermal preferences (Robert *et al.* 2006; Shine 2006; Webb *et al.* 2006, especially during pregnancy (Lecomte *et al.* 1993). Current theories posit that maternal thermoregulation is beneficial by accelerating developmental rate and influencing date of birth (Tinkle and Gibbons 1979; Shine and Bull 1979; Shine 1983b; Lynch 2009). Maternal thermoregulation of the developmental environment can also improve offspring quality by buffering environmental conditions (Shine 1995; Shine 2006). It is noteworthy that influences on developmental rate and offspring quality are compatible from a functional perspective. However, they have traditionally been considered separately (Rodríguez-Díaz *et al.* 2010). Beyond developmental optimization, female thermoregulation could also translate reliable environmental cues and induce adaptive phenotypic responses in their developing offspring (Mousseau and Fox 1998).

Since embryonic tolerance varies over the course of development, the significance of maternal influences are not likely to be constant over time. For instance, accurate maternal thermoregulation should be more critical at early stages to avoid phenotypic alterations. In turn, embryonic responses to maternal temperature are more likely to occur during fetal life for at least two reasons. First, securing major organizational steps is likely a prerequisite to enabling developmental plasticity. Second, maternally derived information at the end of gestation should be more reliable for establishing a phenotypic match with the post natal environment (“Anticipatory maternal effects”: Fox *et al.* 1997; Agrawal *et al.* 1999; Meyer and Bull 2002; Leimar *et al.* 2006; Marshall and Uller 2007). Finally, in addition to its impact on offspring quality, maternal thermal influence on developmental duration should also be dependent on the relative thermal sensitivity of the different developmental stages (Andrews 2004).



In this study we experimentally manipulated the quality of maternal thermoregulation in a viviparous snake, the aspic viper (*Vipera aspis*). Pregnant females select higher and more stable temperatures over the course of gestation when compared to non-reproductive females (Ladyman *et al.* 2003, Lourdais *et al.* 2004b). We imposed deviant conditions on pregnant vipers by temporarily imposing the non-reproductive thermal regime at different periods of embryonic development (first, middle, and last thirds of gestation).

We tested the following set of predictions:

- 1- Offspring phenotype is more sensitive to thermal perturbation early in development, and deviations from maternally selected temperatures at early stages should induce irreversible developmental disruption.
- 2- Developmental rate is more thermally sensitive during early and mid gestation, which are critical steps of somatic growth. Thermal alterations during these stages will slow down developmental rate and delay date of birth.
- 3- Compensatory embryonic responses to maternal temperature are more likely expected during late gestation (fetal life), once major organizational processes are completed.

MATERIAL AND METHODS

Study species

The aspic viper, *Vipera aspis*, is a small, venomous, viviparous snake of the western-Palearctic region. This species is a typical capital breeder in that females accumulate energy over an extended period of time before engaging in reproduction (Bonnet *et al.* 2002; Lourdais *et al.* 2002). Ovulation typically occurs during the first two weeks of June (Saint Girons 1957, Naulleau 1981). During gestation, females undergo considerable behavioral changes. First, they display high thermal preferenda and a substantial increase in basking time when compared to non-reproductive females (Saint Girons 1952; Naulleau 1979; Ladyman *et al.* 2003). Thermoregulatory changes are associated with a decrease in movement and food intake. Ecological and energy costs of reproduction are high in this species with a substantial mortality of reproductive females notably at the northern limit of the distribution (Bonnet *et al.* 1999; Bonnet *et al.* 2002).

Capture and maintenance

Sixty reproductive female aspic vipers were collected in west-central France from neighboring populations (District of Vendée, Loire Atlantique, and Maine et Loire) between May 25 and June 17, 2009. The habitat was mainly remote farmland and vineyards. Reproductive activity was evaluated in the field by manually palpating for ovarian follicles and later confirmed in the lab using ultrasonography (Sonosite MicroMaxx, Inc., Bothell, WA, USA).



In the lab, females were measured ($\pm 0.5\text{cm}$), weighed ($\pm 0.1\text{g}$), individually marked, and then transferred to temperature-controlled climatic chambers (Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany) in one of the five experimental treatments described below. Each female was placed in an opaque plastic box (10.5 x 30 x 16.5 cm) to minimize disturbance. Each box contained a shelter, and water was supplied *ad libitum* in bowls. In nature, females typically do not eat during gestation (Lourdais *et al.* 2002), so captive females were not fed until parturition. Among the 60 females, only 45 females subsequently ovulated. For each ovulated female, litter size was determined using ultrasonography. Females were checked every day to ensure their well-being and to accurately determine the date of birth.

Experimental design

The aim of this study was to address stage-dependent embryonic thermal sensitivity. We divided development into three broad but relevant periods according to available information (Hubert and Dufaure 1968, Andrews 2004; Lourdais *et al.* 2004):

- 1) - First third: “early development”. Major embryonic events occurring including blastulation, gastrulation, neurulation, and somite development.
- 2) - Middle third: “embryonic growth”. Development of the optic vesicles and olfactory bulb, appearance of the jaws, cloacal split, genitalia, and trunk/tail scales; rapid growth of the embryo and development of spiral-coiling.
- 3) - Last third: “late embryonic growth”: fetal life. Further embryonic growth and completion of development, including development of pigmentation and differentiation of head scales.

Daily temperature cycles

Reproduction in this species has been extensively studied (Bonnet *et al.* 1999, 2001; Lourdais *et al.* 2002). Pregnant females display high thermal preference (T_{set} : 33°C), but they are exposed to substantial daily thermal variation with a decrease in body temperature at night. We manipulated thermal conditions during gestation by applying ecologically relevant daily temperature cycles. Two thermal cycles (Fig. 1A) were designed with Simpati software (version 2.06) and applied using climatic chambers (Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany).

- “Reproductive” (R) cycle: the chamber was set to 33°C (pregnant female T_{set}) for 9 hours, then 18°C for 13 hours (mimicking a typical daily thermal profile of a free-ranging reproductive female);
 - “Non-reproductive” (NR or cold cycle): the chamber was set to 27°C for 9 hours, then 18°C for 13 hours (i.e., a typical daily thermal profile of a free-ranging non-reproductive, post-absorptive female).
- Relative humidity was held constant at 85% throughout the experiment.



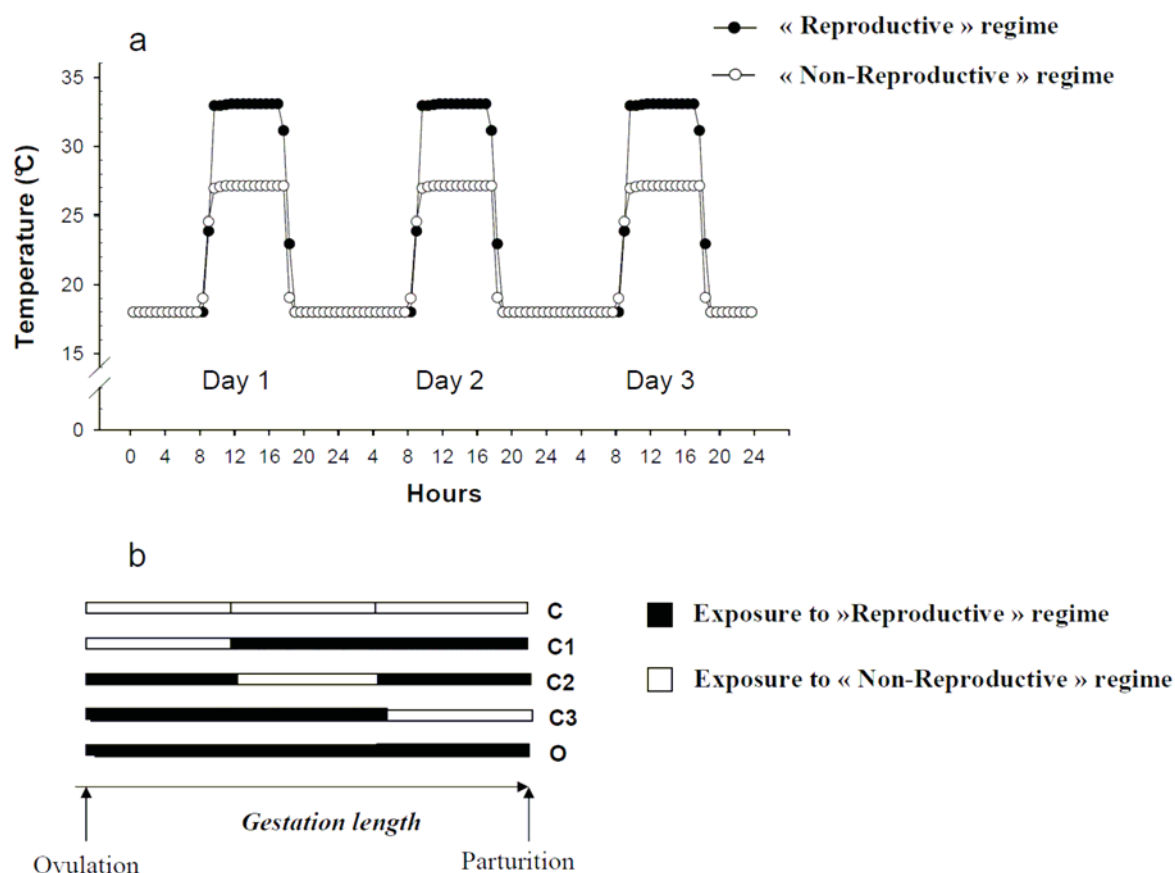


Figure 1. Experimental design used during gestation. Thermal treatments were based on two different daily temperature cycles applied at different times during gestation. (a) In the optimal (“Reproductive”) daily cycle females reached their preferred body temperature ($T_{\text{set}} = 33.0^{\circ}\text{C}$) for 9 hours, while the “Non-reproductive” cycle (open circles) mimicked the thermal regime maintained by non-reproductive females, which have a lower T_{set} (27.0°C). (b) The five thermal treatments varied in relative frequency and timing of the two daily thermal cycles during gestation. White and black bars represent exposure to Non-reproductive and Reproductive daily temperature cycles, respectively.

Thermal treatments

We designed five experimental treatments differing in the timing of thermal perturbations during gestation (Fig. 1B). In the optimal treatment (O), females were exposed to the R daily cycle during the entire gestation period; in the C1, C2, and C3 treatments females were exposed to the NR daily cycle during the first, middle, and last third of gestation, respectively. In the last experimental group, C females were exposed to the NR cycle for the entire gestation period. This treatment represents a negative control where females are unable to access their preferred body temperature throughout



gestation. Females were allocated into each treatment after accounting for snout-vent-length and litter size.

Identification of embryonic stages and female transfer

Since this experiment relies on specific thermal cycles applied at three different periods of development, the identification of embryonic stages was crucial for determining the boundaries of each period. Importantly, in aspic vipers, a pre-ovulation ecdysis occurs and provides a reliable index for the onset of gestation (O.L. pers. obs.). Females were regularly checked using ultrasonography to monitor (Micromaxx, SonoSite, Inc., Bothell, WA, USA) embryonic development. Embryos of each female were measured (longest diagonal measurement from the top of the skull), and we evaluated the remaining vitellus. We used embryonic traits available in developmental tables (Hubert and Dufaure 1968) to estimate embryonic stages. Using these data, we determined the average stage of embryonic development when the C1, C2, and C3 treatments were transferred to the NR temperature cycle (Table 1). Exposure duration to the NR treatment regime lasted 31, 28, and 54 days for the C1, C2, and C3 treatment groups, respectively. While durations were unequal among treatments, our main objective was to target relevant developmental periods. Developmental tables provide detailed embryo descriptions, but no link has been made between embryonic stages, time, and temperature, which strongly influence developmental process. Hence, we did not intend to divide gestation into exactly three equivalent periods. Instead, we focused on the identification of the contrasted steps in embryonic life described above.



Table 1. Characterization of embryonic stages during exposure to “NR” cycle in “C1”, “C2” and “C3” thermal treatments using *Vipera aspis* developmental tables (Hubert and Dufaure, 1968) and estimations from ultrasonography.

Treatment	Developmental stages during cold exposure	Embryo mean size (cm)	Estimated remaining vitellus	Cold exposure (days)
C1	0 to 35-36	0 -1.02	> 60-70%	31
C2	35-36 to 39-40	1.02 to 2.36	60% to 30%	28
C3	39-40 to 43	up to 2.36	< 30%	54

Variables collected

1) Gestation length and litter composition

The influence of treatment on development time is an important component of this work. We considered the day of skin shedding as a proxy of ovulation and the onset of gestation. Gestation length was then calculated for each female (from ovulation to parturition). The components of the litter were characterized (undeveloped ova, dead embryo, fully-developed but stillborn, healthy offspring), counted, and weighed ($\pm 0.1\text{g}$). Offspring were measured ($\pm 0.1\text{cm}$) and sexed. Stillborns were measured, weighed, and sexed when possible. Because we could not distinguish unfertilized ova from ova that had been fertilized but had died early in embryogenesis, these were grouped in the same category (undeveloped ova). Using this method, we gathered data from 37 clutches that composed of a total of 108 healthy offspring, 29 undeveloped ova, 17 dead embryos, and 28 stillborns.

2) Offspring quality

We used an integrative assessment of offspring quality by considering morphology, physiology, and behavior. Shortly after birth, neonates were removed from their mother’s cage and housed individually in small plastic containers (10.5 x 30 x 16.5 cm). A polyvinyl chloride (PVC) shelter was placed in each box, and water was supplied *ad libitum*.

Size and growth: At birth, we collected snout-vent length (SVL), total length, jaw length, and body mass (BM). Body condition was derived from the residuals of BM against SVL. These data were also collected one month after birth to assess growth patterns. During the first month of life, neonates were not fed, and growth solely relied on energy stores at birth. Indeed, snakes hatch with residual yolk and fat stores that are used for early hatching growth and maintenance (Ar *et al.* 2004).



Abnormalities: The ventral surface of each individual was scanned (Canon, CanoScan 8800F) to determine ventral scales number and the prevalence of split ventral scales (a developmental abnormality). Skin patterns are ecologically significant in vipers, since they provide multiple ecological signals (Wüster *et al.* 2004), so we analyzed the total number of abnormalities in the dorsal zigzag and lateral patterns. Abnormalities were defined as irregularities and breaks in the general pattern. Additionally, a synthetic score of pattern irregularity was attributed to each individual from 1 (0 to 2 slight irregularities), 2 (3 to 6 irregularities), to 3 (>6 irregularities).

Defensive behavior: Newborn snakes are particularly vulnerable and anti-predator behaviors are fitness relevant (Burger 1998). We measured defensive responses just after birth. Without prior manipulation, the neonate was manually restrained allowing only the first third of the snake's body to be free. The snake's body was then gently contacted with a predator mimic (a modified plastic bottle with two big eyes drawn on it, Burger 1998). For the duration of the 30-second trial, we moved the predator mimic in front of the neonate using regular movements and exerting regular contact with the snake's body. We categorized behaviors expressed by the individual as "protective" (i.e., tried to hide, tried to escape), "no response" (no obvious behavior expressed) and "defensive response" (i.e., strike behavior). We recorded the time to elicit the first strike, the number of strikes, and the number of tongue flick.

Exploratory behavior: Neonate vipers are autonomous at birth and individual exploratory behavior is particularly relevant as it should be a good indicator of the individual's ability to find suitable microhabitats in a new environment. Only a few studies are available on exploratory behavior at birth in snakes (Burghardt 1977; Holtzman *et al.* 1999; Almlil and Burghardt 2006), and we developed a standard method to assess neonate behavior. This parameter is a key factor for neonates, especially for natal dispersal. The experimental design consisted of a square PVC arena (70 x 70 cm). The arena was divided into four compartments partially separated with 40 cm high removable partitions. Two opposite compartments were fitted with a supplemental light and heat source (60 Watt bulb) 10 cm above the enclosure floor. The two other compartments had no supplemental light bulb. Two shelters were placed in each compartment. The light sources created a thermal gradient in the system (ranging from $37.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ under the heat source to $21.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ in the middle of the arena). During trials, room temperature was $18.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$. Prior to beginning a trial, the snake was acclimated in the middle of the arena under an opaque cover for 5 minutes. At the onset of the trial, the cover was removed and snake behavior was video recorded for 15 minutes (Sony, HDR XR100). Exploratory behavior was assessed within 2 days of birth. We assessed time spent before initial movement, then total time spent in "active exploration" (movement or positioned erect on the wall),



“passive exploration” (motionless but tongue flicking and/or head moving), “passive” (motionless without tongue flicking or head moving), “thermoregulation” (motionless under the heat source), and “hidden” (under a shelter). We also documented the number of visited compartments, compartment type (with or without light) visited, and the number of visited shelters. Tongue flicks were also counted. Between trials, the system was entirely cleaned with 70% alcohol to remove residual odors.

Traction strength: Traction force was measured at one month of age in standard conditions (25°C, corresponding to the mean temperature of captivity conditions). Three consecutive 30 seconds trials were conducted. We used a force transducer (UFI, Morro Bay, California) to assess offspring traction force (for methodology, see Stahlschmidt and DeNardo 2009). Traction force was recorded every 0.1 second. Between each trial the snake was released for 10 seconds, and then stretched again. For each trial, we collected maximum force, average force, total effort (i.e., sum of all recorded values), and number of contractions.

Standard metabolic rate: We used closed system respirometry in a temperature-controlled environmental chamber (LMS LDT, Sevenoaks, Kent, United Kingdom; stability $\pm 1^\circ\text{C}$) to measure standard metabolic rate (SMR) of neonates one month after birth. Trials were conducted at 25°C between 6 p.m. and 8 a.m. in opaque test chambers (internal volume 2 l). The methodology is described in details in Lelièvre *et al.* 2010. Each individual was placed into the test chamber 2h prior to testing. Trial duration (840 min) ensured sufficient O₂ suppression (>0.1%).

3) Long-term effects

Winter survival: In the aspic viper, neonates often start hibernation without any food intake. We mimicked this situation by wintering individuals after the completion of all tests at one month of age. Snakes were cooled to $8.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (relative humidity 88.5%) in climatic chambers (Vötsch Industrietechnik VP 600, Balingen Germany) for 3 month, and we assessed the influence of treatment on survival.

First prey acceptance: After overwintering, snakes were housed singly at 25°C. One month after the end of the wintering period (i.e., at 5 months of age), snakes were offered their first prey, a fresh-killed neonate mouse (mean mass = 1.6 ± 0.2 g, ~30% of the snake body mass). The prey was offered in the evening and consumption was assessed the following morning.

Statistical analyses



All statistical comparisons were performed with R software (version 2.12.1, Development Core Team 2010) using linear models (lm models, stats package), mixed models (lme models, nlme package), and generalized linear mixed models for binomial distribution (glmer models, lme4 package). Significance was determined at $\alpha < 0.05$ for all tests. We analyzed the effect of thermal treatment on gestation length using a one-factor analysis of variance (ANOVA) with log-transformed data (to assess normality assumption). Due to a very low survival rate in C neonates ($n = 2$), all following analyses were conducted excluding the C treatment. Since siblings are not independent statistical units (Massot *et al.* 2004), we used linear mixed models analyses, with mother identity as a random factor, in all other statistical tests. Body condition was calculated using residual values from the regression of body mass on snout-vent length. glmer models were used for the analyses of binary variables (propensity to strike during anti-predator behavior tests and feeding success). In considering exploratory behavior, the proportion of time spent in each behavior category was analyzed using linear mixed models after a logit transformation of the data (Warton and Hui 2011). Pairwise comparisons were realized using Tukey *post hoc* tests (package multcomp).

RESULTS

1) Gestation duration and litter composition

Thermal treatment significantly influenced gestation duration ($F_{4,32} = 22.174$, $p < 0.001$; Fig. 2). Gestation was shortest in the O treatment (82.2 ± 1.1 days, Tukey *post hoc* test, O vs. all, $p < 0.01$) and longest for the C treatment (123.0 ± 2.8 days, Tukey *post hoc* test, C vs. all, $p < 0.01$). The partially constrained groups were in intermediate position with no statistical difference among them: C1 (94.8 ± 2.8 days), C2 (96.8 ± 2.4 days), and C3 treatments (98.4 ± 2.9 days), (Tukey *post hoc* tests, $p > 0.05$). We obtained the same results considering absolute date of birth ($F_{4,32} = 13.019$, $p < 0.001$; Tukey *post hoc* test: O vs. all: $p < 0.01$; C vs. all: $p < 0.01$; all other pairwise comparisons: $p > 0.05$). Mean Julian date of birth was 271 (September 28), 269 (September 26), 273 (September 30), and 254 (September 11) for C1, C2, C3, and O neonates, respectively.

Proportion of living offspring in a litter was different among thermal treatments (glmer, $p < 0.05$). It was lowest for females from the C treatment ($12.5 \% \pm 8.5$; Tukey *post hoc* test, C vs. all, $p < 0.05$), but there was no differences among the C1 ($75.0 \% \pm 7.8$), C2 ($61.1 \% \pm 8.2$), C3 ($78.1 \% \pm 7.4$), and O ($94.6 \% \pm 3.8$) treatments.

Number of alive neonates were 36 (O), 25 (C3), 27 (C2) and 24 (C1).



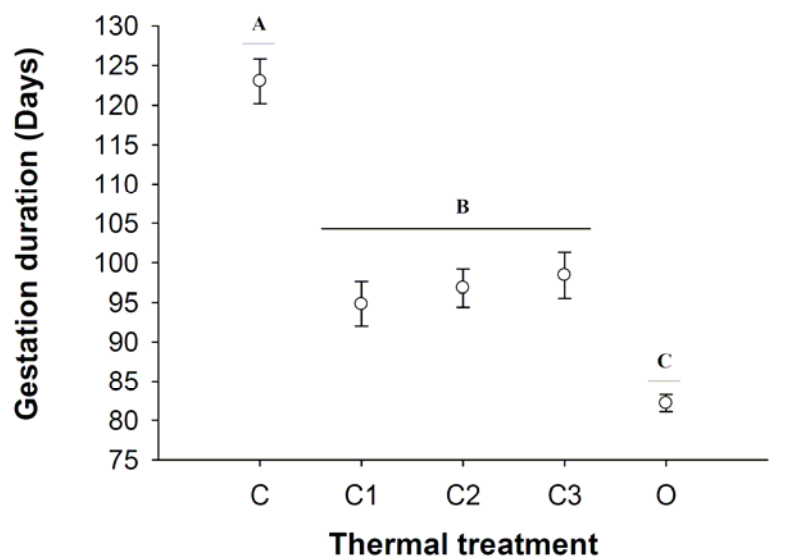


Figure 2. Impact of thermal treatment on gestation length in *Vipera aspis*. Errors bar represent SE. Levels non-connected by the same letter are significantly different.

2) Offspring quality

Morphology and growth

SVL at birth was profoundly influenced by thermal treatment ($F_{3,28} = 3.510$, $p = 0.028$, Fig. 3), with neonates from the C1 treatment being significantly smaller than the other neonates (Tukey *post hoc* tests: O vs. C1, $z = 3.229$, $p = 0.007$; all other pairwise comparisons: $p > 0.05$). Body mass at birth and body condition did not differ among treatments (Table 2). Relative jaw length was affected by thermal treatment ($F_{3,28} = 4.230$, $p = 0.014$; Fig. 3). Neonates from the C1 treatment had a shorter jaw length compared to neonates from the C3 and O treatments (Tukey *post hoc* tests: O vs. C1, $z = 3.095$, $p = 0.011$; C3 vs. C1, $z = 3.051$, $p = 0.012$; all other pairwise comparisons: $p > 0.05$).

Growth during the initial month of life was influenced by body condition at birth ($F_{1,70} = 8.152$, $p = 0.006$) and was faster for neonates in the O treatment and slower for C1 neonates (Table 2). Loss in body mass during the first month of life did not differ among treatments (Table 2).



Table 2. Effects of the timing of thermal perturbations during gestation on morphological traits at birth, growth patterns, and metabolic rate of offspring in the viviparous snake *Vipera aspis*. Table shows mean values $\pm$ SE.

Trait	GESTATION TREATMENT				Effects of thermal treatment during gravidity	Statistical Test:			Tukey post hoc test
	C1	C2	C3	O		C1	C2	C3	
BM (g)	4.88 $\pm$ 0.30	4.88 $\pm$ 0.30	5.34 $\pm$ 0.19	5.28 $\pm$ 0.13	n.s.				
BC	0.026 $\pm$ 0.023	-0.013 $\pm$ 0.015	0.029 $\pm$ 0.010	-0.027 $\pm$ 0.009	n.s.				
VSN	145.8 $\pm$ 1.3	147.4 $\pm$ 0.7	145.5 $\pm$ 0.8	147.4 $\pm$ 0.8	n.s.				
SVS number	23.9 $\pm$ 8.2	26.0 $\pm$ 8.2	7.3 $\pm$ 4.3	2.9 $\pm$ 1.4	n.s.				
Number of dorsal pattern abnormalities	6.8 $\pm$ 0.5	5.0 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.4	$F_{3,24} = 7.531, p = 0.001$	A	AB	B	B
Dorsal pattern score	2.9 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2	$F_{3,24} = 4.816, p = 0.009$	A	AB	B	B
SVL growth (mm)	0.70 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.08	1.14 $\pm$ 0.11	1.16 $\pm$ 0.06	$F_{3,25} = 2.810, p = 0.060$	A	AB	AB	B
BM loss (g)	-0.63 $\pm$ 0.10	-0.49 $\pm$ 0.04	-0.51 $\pm$ 0.05	-0.40 $\pm$ 0.03	n.s.				
adjusted jaw growth (mm)	0.40 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.05	$F_{3,25} = 4.191, p = 0.016$	AB	AB	B	A
O ₂ consumption (ml.h ⁻¹)	0.51 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.02	$F_{3,24} = 2.846, p = 0.05$	AB	AB	B	A



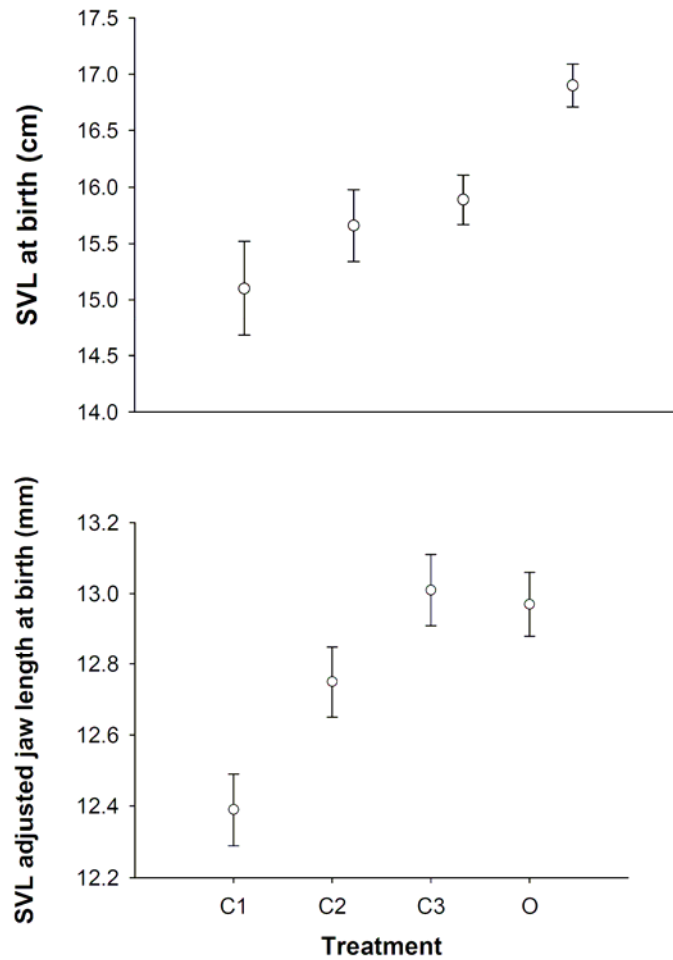


Figure 3. Impact of thermal treatment on SVL and SVL adjusted jaw length at birth in neonate *Vipera aspis*. Errors bar represent SE.

Jaw length growth was significantly influenced by thermal treatment, but also by initial jaw length ($F_{1,72} = 14.878$, $p < 0.001$) and body condition at birth ($F_{1,72} = 10.061$, $p = 0.002$). Neonates from the O treatment had greater jaw growth compared to C3 treatment neonates (Table 2).

Developmental abnormalities

We found a significant effect of thermal treatment on the proportion of neonates exhibiting split ventral scales ($p < 0.05$; Fig. 4): split ventral scales were present in nearly all neonates from the C1 and C2 treatments, whereas hatchlings from the O treatment had the fewest proportion of split ventral scales (Tukey *post hoc* tests: O vs. C1, $z = -2.885$, $p = 0.019$; O vs. C2, $z = -3.324$, $p = 0.006$; all other pairwise comparisons: $p > 0.05$). No differences were found among groups in ventral scale number (Table 2).



Dorsal and lateral patterns were also affected by thermal treatment (Table 2; Fig. 4). The number of pattern abnormalities was higher in neonates from the C1 treatment and lower for neonates from the C3 and O treatments. We obtained the equivalent results when considering pattern score (Table 2).

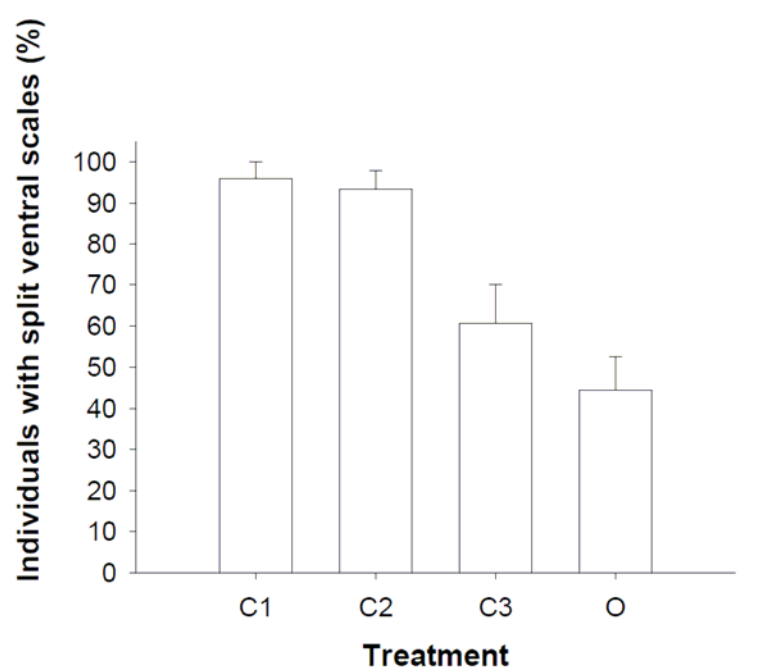


Figure 4. Impact of thermal treatment on proportion of individuals exhibiting split ventral scale abnormalities. Errors bar represent SE.

Behavior

Anti-predator behavior at birth was modified by thermal treatment. Neonates differed in total strike number and time before eliciting the first strike (Table 3): neonates from the C2 and O treatments were more prone to strike than neonates from the C1 treatment. Moreover, neonates from the C1 treatment were slower to elicit the first strike than were neonates from the other treatments (Table 3).

Exploratory behavior at birth was profoundly influenced by thermal treatment ($F_{3,25} = 3.051$, $p = 0.047$; Fig. 5). The proportion of time spent in active exploration was less for neonates in the C1 treatment, and greater for C3 neonates (Tukey *post hoc* tests: C3 vs. C1: $z = 3.024$, $p = 0.013$; all other pairwise comparisons: $p > 0.05$). Additionally, neonates from the C1 treatment spent more time motionless than neonates from the other treatments ($F_{3,26} = 5.003$, $p = 0.007$; Tukey *post hoc* test: C1 vs. all: $p < 0.05$; Fig. 5). Tongue flick number was highest for neonates from the C2 and O treatments



($F_{3,25} = 3.220$, $p = 0.0398$; Fig. 5) and lowest for C1 neonates, which had a tongue flick number approximately 50% of that for the C2 neonates (Tukey *post hoc* tests: O vs. C1, $z = 2.739$, $p = 0.032$; C2 vs. C1, $z = 2.639$, $p = 0.042$; all other pairwise comparisons: $p > 0.05$). Neonates from the O and C3 treatments visited more shelters than neonates from the C1 treatment ($F_{3,25} = 3.608$, $p = 0.027$; Tukey *post hoc* tests: O vs. C1: $z = 2.945$, $p = 0.017$; C3 vs. C1, $z = 2.575$, $p = 0.049$; all other pairwise comparisons, $p > 0.05$; Fig.5).

Physiology and performance

Oxygen consumption was influenced by thermal treatment (Table 2), but also body mass ($F_{1,65} = 6.180$, $p = 0.016$). Standard metabolic rate of neonates from the C3 treatment was the highest whereas O neonates had the lowest metabolic rate (Table 2).

Maximal traction force was highest for C3 neonates and lowest for O and C1 neonates (Table 3). We also found an effect of body mass ($F_{1,71} = 91.071$, $p < 0.001$) on maximal traction force. For all treatments, maximal traction force decreased over trials ($F_{1,201} = 9.008$, $p = 0.003$). Total effort was different among thermal treatments (Table 3): neonates from the C3 thermal treatment deployed a greater total force compared to the C1 and O neonates (Table 3). Total force was also dependent on body mass ($F_{1,71} = 53.398$, $p < 0.001$) and decreased over trials ($F_{1,201} = 41.156$, $p < 0.001$). Total contraction number was not influenced by thermal treatment, but by body mass ($F_{1,71} = 9.059$, $p = 0.004$), and it decreased over trials ($F_{1,201} = 84.404$, $p < 0.001$).



Table 3. Effects of the timing of thermal perturbations during gestation on behavioral traits at birth in the viviparous snake *Vipera aspis*. Table shows mean values $\pm$ SE.

	GESTATION TREATMENT				Statistical Test:
	C1	C2	C3	O	
Number of strikers	0.54 $\pm$ 0.10	0.73 $\pm$ 0.10	0.80 $\pm$ 0.08	0.94 $\pm$ 0.04	n.s
Strike number	2.9 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.9	5.4 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.7	F _{3,24} =3.754, p=0.024
Time before first strike	12.65 $\pm$ 2.4	4.13 $\pm$ 0.64	7.07 $\pm$ 1.62	6.20 $\pm$ 0.97	F _{3,24} =4.958, p=0.008
Latent active response	0.46 $\pm$ 0.10	0.32 $\pm$ 0.10	0.32 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.08	n.s
Time to first flick number	9.9 $\pm$ 1.5	9.0 $\pm$ 1.0	11.5 $\pm$ 0.8	12.1 $\pm$ 0.9	n.s
Time to first movement	117.5 $\pm$ 55.9	36.7 $\pm$ 22.6	11.8 $\pm$ 2.5	11.3 $\pm$ 2.5	n.s.
Time scanning	21.4 $\pm$ 4.1	16.6 $\pm$ 4.1	7.9 $\pm$ 1.3	18.6 $\pm$ 2.2	n.s.
Time under shelter	17.3 $\pm$ 4.9	22.2 $\pm$ 6.0	20.3 $\pm$ 3.3	20.2 $\pm$ 3.8	n.s.
Number of visited shelters	0.9 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.3	F _{3,25} = 3.075, p = 0.045
Reaction force (g)	65.8 $\pm$ 5.8	82.0 $\pm$ 5.8	91.9 $\pm$ 5.5	70.7 $\pm$ 2.9	F _{3,25} = 3.835, p = 0.022
Reaction force (g)	5557.1 $\pm$ 617.4	7448.9 $\pm$ 695.4	8836 $\pm$ 644.5	6039.0 $\pm$ 361.0	F _{3,25} = 3.819, p = 0.022
Reaction number	11.3 $\pm$ 0.6	14.7 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 0.3	n.s



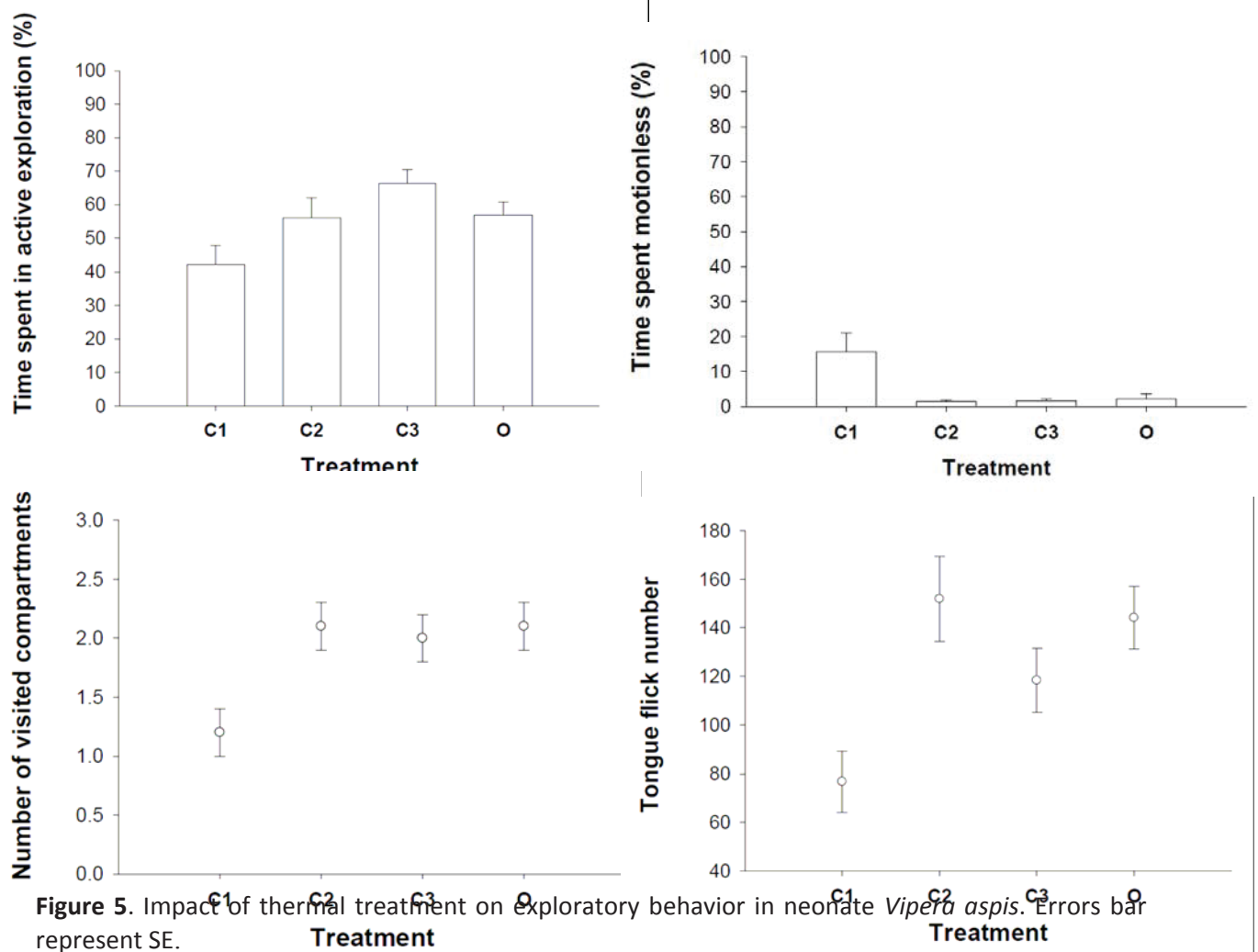


Figure 5. Impact of thermal treatment on exploratory behavior in neonate *Vipera aspis*. Errors bar represent SE.

3) Long term impact

Overwintering survival



Thermal treatment significantly influenced winter survival rate. Survival was lowest for C1 neonates (60.9%) with no difference among the remaining treatments (100% for the C2 and O treatments, 96.0% for the C3 treatment).

Prey consumption

Consumption of the first prey item offered differed significantly among groups (glmer, $p < 0.05$). Only 13.3% of the C1 juveniles accepted their first meal, while 69.4% of O juveniles ate. Food intake was intermediate in the C2 (54.5 %) and C3 (50.0%) juveniles: Tukey post hoc tests: O vs. C1, $z = 3.157$, $p = 0.008$, all other comparisons, $p > 0.05$.

DISCUSSION

Temperature can profoundly affect prenatal trajectories and offspring phenotype in ectotherms. Embryonic life is a multistep process (Andrews 2004; Henry and Ulijaszek 2009), and response to a given perturbation may vary dramatically over the course of development. To date, this dynamic nature remains under-considered while it appears critical to fully understand the nature of developmental plasticity (i.e., constrained or adaptive response) and the functional significance of maternal thermal effects. We addressed these questions using an experimental approach in a viviparous ectotherm. Our work underlines the stage dependence of embryonic thermal sensitivity and gives new insight on maternal regulation. We discuss our results in detail below.

Maternal control of developmental duration

Permanent access to maternal thermal preference (optimal treatment) resulted in short gestation duration and early date of birth. In turn, a permanent thermal restriction (group C) resulted in a dramatic increase in gestation duration (55%). The duration impact was more moderate in the three other suboptimal treatments (18% increase on average). Contrary to our predictions and previous findings (Andrews 2004; Lourdais *et al.* 2004b), gestation duration increase was not influenced by the timing of exposure. Our results indicate that date of birth was 2 weeks delayed when developmental conditions were suboptimal during one third of gestation independent of the timing of the suboptimal thermal exposure, with birth occurring late in September. When conditions were suboptimal for the entire period, birth was delayed to mid-October. Date of birth is a critical life history parameter, notably in constraining temperate climates (Olsson and Shine 1998; Shine and Elphick 2001; Lourdais *et al.* 2004) when it can occur close to the wintering period (Altwegg *et al.*



2005). Recent work reports a positive relation between early date of birth and both post-natal survival (Olsson and Shine 1998; Warner and Shine 2007) and future reproductive output in adult life (Uller and Olsson 2010). Maternal regulation significantly enhances developmental rate as proposed in the “cold climate hypothesis” (Tinkle and Gibbons 1979; Shine 1983b). Such a maternal effect is likely adaptive in that it optimizes the post-natal activity period. Importantly, recent evidence of cardiac compensation has been found in developing ectotherms, indicating a dynamic embryonic response to adverse developmental conditions (Stahlschmidt and DeNardo 2009; Du *et al.* 2010). Such compensation may well have occurred here and requires further investigations.

Maternal influences on offspring phenotype

Thermal influences on offspring quality were extremely dependent on the timing of exposure. Offspring exposed to the cold temperature cycle in early or mid development exhibit pronounced phenotypic alterations. The high prevalence (>90%) of split ventral scales in these two groups advocates for disrupted embryogenesis. Such abnormalities are often associated with fitness disadvantages (Forsman *et al.* 1994; Shine *et al.* 2005; Löwenborg *et al.* 2010). Similarly, the dorsal zigzag pattern is a complex visual signal that may carry up to three functions including aposematism, camouflage, and predator evasion in viperids (Wüster *et al.* 2004). Disruption in the dorsal pattern underlines developmental perturbation induced by suboptimal temperature and is likely ecologically significant. For example, disruption of back patterns in the common lizard (*Lacerta vivipara*) due to change in temperature during development was associated with a change in reproductive strategies (Lepetz *et al.* 2009).

Deviation from maternal thermal preference in the first third of gestation also modified neonate morphology and body proportions. C1 offspring were smaller and had smaller relative jaw length compared to hatchlings from the optimal treatment. Size at birth influence major traits in reptiles like growth and survival rate (Sinervo *et al.* 1992; Brown and Shine 2004), and thus is under strong natural selection (Sorci and Clobert 1999; Uller and Olsson 2010), but change in size at birth can also be adaptive (Lorenzon *et al.* 2001). In addition, in gape-limited predators such as snakes, jaw size constrains swallowing capacity and prey size range. Variations in head size influence individual performance and fitness (Forsman and Lindell 1993). Timing of thermal perturbations also influenced physiology and performance in neonates at one month of age. Postnatal growth was lowest in early impacted neonates, while highest values were recorded in the optimal group.

We also found a negative behavioral impact of suboptimal conditions early in pregnancy. First, C1 neonates exhibited altered anti-predator behavior when compared to the other groups. Second, C1 offspring displayed reduced exploratory skills, suggesting altered dispersal and cognitive



capacities, and natal dispersal may have a critical influence on individual fitness (Warner and Shine 2008; Clobert *et al.* 2009). Finally, prey consumption tested five month after birth was extremely low in the C1 group, and consumption of a first meal is crucial in small ectotherms (Le Galliard *et al.* 2005; Mugabo *et al.* 2010). Overall, these results clearly support the concept of high thermal sensitivity at early developmental stages, since a moderate deviation from maternal thermal preference translated into a substantial set of morphological, physiological, and behavioral alterations.

Conversely, no such alterations were detected when treatment occurred during fetal life (C3). In turn, we even detected evidences for compensatory responses to maternal temperature. For instance, highest SMR values were reported in this group while it was lowest within the optimal group. Metabolic rate was recorded over one month after birth, and these differences were not the result of short-term reversible embryonic acclimation (Du and Shine 2010). Similarly, neonates impacted late in development were more vigorous and had higher stamina. These effects may constitute compensatory responses to future adverse environmental conditions as have been found in other reptiles (O'Steen and Janzen 1999; Angilletta 2009, de Fraipont *et al.* 2000) and mammals (Canals *et al.* 2009). Indeed, low maternal temperature reveals thermoregulatory constraints associated with poor weather conditions. Such environmental constraints delay date of birth (Lourdais *et al.* 2004b, and above results) and will likely expose neonates to a thermally constraining environment (i.e., cold temperature associated with fall season). Our results may suggest a dynamic response to maternal influences that indicate unfavorable post-natal thermal conditions.

Finally, intermediate stages of embryonic development (C2) appear sensitive to deviations from optimal temperatures notably in terms of general organization (morphological features). However, we did not observe significant physiological or behavioral alterations. Surprisingly, C2 neonates appear similar to O neonates when considering some specific traits (tongue flick number in a new environment and strike number). These developmental stages might represent a transition in embryonic sensitivity combining significant developmental constraints and ability to integrate maternal cues and produce compensatory responses.

Functional significance of maternal thermal effects

Maternal effects on offspring have been reported in a diversity of taxa (Crespi and Denver 2005; Meylan and Clobert 2005; Müller *et al.* 2007; Gagliano and McCormick 2009). Here we demonstrated that maternal thermal effects influence offspring phenotype and development time in a complex manner. The optimal treatment with consistent daily access to T_{set} significantly enhanced offspring quality and date of birth. Applying a perturbation at early stages led to multiple detrimental effects and profoundly altered phenotype, suggesting an impact on coordinated expression of



developmental genes and major embryonic processes (Richardson *et al.* 1998). In turn, exposure to NR treatment during the last third of gestation had no deleterious influence on neonates that appeared better adapted to constraining (cold) conditions. Our results suggest that fetal life could be a critical time window for the integration of environmental cues and developing phenotypic expression (West-Eberhardt 2003; Piersma and Van Gils 2011). The “cold” signal transferred by the mother in late development may have shaped fetal physiology, allowing the individual to be more efficient in an expected cooler environment. Such stage-dependent variation in embryonic response may be critical to address the adaptive nature of maternal “effects” (Mousseau *et al.* 2009) and tease apart the need for active maternal regulation (to guarantee coordinated development) and the possibility of inducing dynamic developmental responses to environmental cues.

Ecological relevance

Time-dependent embryonic sensitivity is also ecologically relevant to better understand the demographic impact of environmental variations (Gaillard *et al.* 1997; Lindström 1999; Reid *et al.* 2003; Descamps *et al.* 2008; LeGalliard *et al.* 2010). The maternal ability to buffer the impact of environmental conditions may be limited, especially under colder climates. For instance, several correlative studies report significant cohort effects in relation with weather fluctuations (Lourdais *et al.* 2004b; Le Galliard *et al.* 2010) and variations in offspring phenotype or date of birth (Olsson and Shine 1997b). Thus, the timing of constraining weather may have contrasted impacts on phenotypic variation and may be a relevant facet in the understanding of environmentally induced cohort variations.

Evolutionary relevance

Narrow embryonic thermal tolerance may partially be a secondary derived trait in viviparous systems, since maternal regulation provides more reliable access to optimal temperature (Robert *et al.* 2006; Shine 2006; Webb *et al.* 2006). Still, high sensitivity at early stages is likely a pre-existing developmental constraint that favored the evolution of egg retention (Qualls and Andrews 1999; Shine 2004; Braña and Ji 2007) and modified maternal thermoregulation as observed in many oviparous species. Evolutionary transition to viviparity in squamates has attracted considerable interest (Shine 1983b, 1995; Blackburn 2006) and possibly involved the extension of pre-existing behaviors as outlined in the “pre-adaptation” hypothesis (Shine 2006). Our results point out the critical importance of regulating early but also intermediate developmental stages to avoid phenotypic alteration. Our study demonstrates that maternal thermoregulation combines



independent but complementary benefits by *i*) decreasing development time (continuous effect) and *ii*) avoiding developmental disruption (stage-dependent effect). Maternal thermoregulatory constraints may also transfer relevant information to the fetus and favor a better phenotypic match to the post-natal environment (stage-dependent effect). Thereby, we provide an original contribution in understanding the transition to viviparity that likely involved multiple selective forces optimizing maternal influences in the frame of complex, stage-dependent embryonic sensitivity.

Acknowledgments

We thank Michaël Guillon and Patrice Quistinic who helped in snake capture. M. Guillon also helped in the design of the behavioral arena. We also thank many students who helped with animal maintenance. Financial support was provided by the Agence Nationale de la Recherche (ECTOCLIM project) and the FYSEN Foundation.





CHAPITRE 2 :

Régulation maternelle du développement



Résumé du chapitre 2

Dans le cadre de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la régulation thermique maternelle et au comportement de thermorégulation. Nous nous sommes donc concentrés sur *V. aspis* (Article 3) espèce pour laquelle nous disposons de données écologiques très détaillées. Ces aspects ont en partie été étudiés en chez *A. childreni* (gravidité et incubation). La prédation est une pression écologique très forte qui influence les stratégies d'exposition et l'activité notamment chez les squamates. Suite à une attaque l'utilisation d'un refuge est un moyen efficace pour se soustraire aux prédateurs mais peut entraîner des coûts physiologiques avec notamment un abaissement de la température corporelle.

Chez les squamates la prise en charge maternelle des embryons est généralement associée à une augmentation des activités de thermorégulation et à un changement des préférences thermiques (chapitre 1). La gestation peut augmenter les risques de prédation avec une exposition renforcée et des contraintes locomotrices dues à la charge physique. Dans ce contexte, il est important de comparer les stratégies comportementales des femelles selon leur état reproducteur (gestantes ou non) afin d'examiner dans quelle mesure l'état de gestation modifie les tactiques d'exposition. Par ailleurs, considérant l'évolution des contraintes de la gestation, on peut faire l'hypothèse d'un ajustement comportemental maternel au cours de la gestation, lié d'une part aux besoins thermiques embryonnaires moindres en fin de gestation et d'autre part, la progression des contraintes au cours du temps.

Pour cela, nous avons réalisé un ensemble de suivis comportementaux à différents stades de la gestation (début, milieu et fin). Une quatrième session a été réalisée pour les femelles reproductrices après la mise-bas. La distinction des grandes périodes du développement a été rendue possible grâce au suivi échographique des femelles reproductrices. L'étude a été menée sur 11 femelles reproductrices et 19 femelles non-reproductrices. Les femelles étaient équipées d'enregistreurs de température miniaturisés (1 point de température toutes les 2 minutes). Ceci nous a permis de reconstruire les profils précis de thermorégulation en situation de « confort » (thermorégulation libre et sans dérangement). Nous avons ensuite mesuré le comportement d'utilisation de refuge suite à une simulation d'attaque dans des enclos standardisés (cage de 1m de long, équipée d'une lampe fournissant un point chaud, et d'un abri situé à l'opposé, dans la partie la plus fraîche). L'ensemble de la session était filmé afin de quantifier ultérieurement les comportements exprimés par les femelles. Nous avons relevé les comportements exprimés par les



individus suite aux attaques (séjour dans le refuge, observation, sortie) et évalué les coûts thermiques de l'utilisation du refuge.

Les résultats obtenus ont tout d'abord démontré que les femelles reproductrices n'ajustaient pas leur comportement au cours de la gestation : elles maintiennent des préférences thermiques préférées plus élevées (33.45°C) que celles des femelles non-reproductrices (30.62°C), et bien moins variables, tout au long de la gestation. Par ailleurs, la préférence thermique et la qualité de la thermorégulation maternelle ne dépendent pas du nombre de jeunes vivants.

En situation de risque de prédation, les femelles reproductrices passent la majorité de leur temps en thermorégulation alors que les femelles non-reproductrices privilégient l'évitement des risques. Suite à une attaque, les femelles reproductrices sortent plus rapidement du refuge et passent moins de temps en observation avant de prendre la décision de sortie. Ces comportements ne sont pas dépendant du stade de gestation ou de la taille de la portée. Par contraire, les femelles non-reproductrices, séjournent 4 fois plus de temps dans leur refuge après une attaque, et ajustent leur comportement selon la répétition des attaques. Ce contraste semble étroitement lié aux coûts thermiques associés à l'utilisation de refuge. Les femelles reproductrices tolèrent un abaissement de température plus faible avant de reprendre les activités de thermorégulation.

Le fait que les femelles n'ajustent pas leur comportement au cours de la gestation selon la fécondité peut sembler contre intuitif. Concernant la fécondité, ce résultat souligne le caractère spécifique des soins prénataux et du caractère non-dépréciable de la régulation thermique. En effet, la température optimale dépend de la sensibilité spécifique du développement embryonnaire mais n'est pas affectée par la fécondité (les embryons partagent les mêmes besoins élevés). La femelle doit donc investir de la même manière dans la thermorégulation quelque soit le nombre de jeunes. L'absence d'ajustement selon le stade de gestation laisse présumer d'autres bénéfices d'une thermorégulation renforcée. Ainsi, la femelle pourrait tirer profit d'une mise-bas précoce pour reprendre ses activités et s'affranchir « aux plus vite » des contraintes énergétiques et écologiques de la gestation. Enfin, des stratégies compensatoires basées sur la sélection de l'habitat peuvent exister. En effet, les femelles gestantes sur le terrain sont relativement cryptiques et choisissent des micro-habitats spécifiques permettant à la fois la thermorégulation et une fuite rapide (bordure de zones de végétations denses).



Running head: pregnancy, thermoregulation and escape tactics in snakes

Dedicated mothers: pregnant vipers invest in non-depreciable and stage-independent care to their embryos

LORIOUX Sophie ^{1,3}, LISSE Hélène ¹ and LOURDAIS Olivier ^{1,2}

¹ Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS UPR 1934, 79360 Villiers en Bois, France

² School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

³ Université de Poitiers, 40 Avenue du recteur Pineau 85022 Poitiers, France

Correspondance:

Sophie Lorigoux, CEBC-CNRS UPR 1934

79360 Villers en Bois, FRANCE

Phone: +33 (0) 5 49 09 35 52

Fax: + 33 (0) 5 49 09 65 26

E-mail: lorioux@cebc.cnrs.fr

Tables: 2

Figures: 5

For consideration in: Functional Ecology



Abstract

Escape tactics attracted considerable interest in ectotherms and optimal refuge use should balance the benefits derived from predator avoidance with physiological/opportunity costs of sheltering. In viviparous squamates, pregnancy imposes major thermoregulatory shift and should influence refuge use. Because embryos are thermally sensitive, pregnant females should minimise thermal costs and refuge use in response to a predator attack. However, embryonic sensitivity and maternal constraints vary dramatically during pregnancy and these changes should modulate the costs-benefits balance of refuge use. Females should thermoregulate more at early stages (i.e. particularly sensitive) while increased predator avoidance are expected at late pregnancy stages due to increased physical burdening and locomotor impairment. In addition, the fecundity dependence of maternal behaviour deserves specific interest to address possible adjustments to current reproductive effort.

We experimentally studied thermoregulation in pregnant and non-reproductive aspik vipers, *Vipera aspis*, at different stages of gestation (first, mid and last third) in two sets of conditions. We determined preferred body temperatures in a cost free environment to test for stage and fecundity dependence of maternal thermal preference. Then, we examined behavioural responses to repeated predatory attacks. Pregnant female were extremely accurate thermoregulators when compared to non reproductive and preferred body temperature was not dependent of litter size or gestation stage. After simulated attacks, pregnant females always minimised refuge use and thermal deviation from their preference. In turn, non reproductive females avoided exposure and modulated their response to risk level. Contrary to our prediction, pregnant females did not adjust their behaviour over the course of gestation suggesting that stage independent benefits may be derived from accentuated maternal thermoregulation and exposure.

Keywords: Refuge use, predation, pregnancy, non-depreciable care, thermoregulation, development.



Introduction

Predation is a major selective and ecological pressure that influences exposure strategies, activity budget and behavior. Escape tactics and refuge use have attracted considerable interest notably in an optimality context (Ydenberg and Dill 1986). Behavioral decisions under the risks of predation respond to conflicting demands (time and energy) and should balance the fitness costs and benefits of predator avoidance (Sih 1980, Lima and Dill 1990; Cooper and Fredericks 2007; Cooper 2009a). These behavioural decisions will depend on external environmental cues, the assessment of predation risk (Bouskila and Blumstein 1992; Sih 1997; Amo *et al.* 2004a; Amo *et al.* 2004b; Martin and López 2005) but also physiological requirements. Although predation risk can be reduced by selecting refuges that offer effective protection (Bauwens *et al.* 1999; Cooper *et al.* 1999; Goldsborough *et al.*, 2004; Cooper and Wilson, 2008). Some life-history stages and some physiological and behavioral processes require the decision to come out of a refuge. Thus in ectotherms, this decision and emergence time from refuges is predicted to result from external factors such as external temperatures (Cooper 2009b), food availability (Martín *et al.* 2003) and individual physiological factors (e.g. body temperature, body mass loss, Martín *et al.* 2003; Amo *et al.* 2003; Martín and López 1999).

Temperature is a major environmental parameter for ectotherms since it influences directly body temperature and thereby major physiological processes and fitness related performance such as sprint speed (Huey and Kingsolver 1989; Angilletta 2009). Behavioral thermoregulation constitutes a robust mean to maintain body temperature in an optimal range (Huey and Slatkin 1976). Meanwhile, thermoregulation usually increases exposure to predators and predation risks (Pianka and Pianka 1970; Hertz *et al.* 1982; Schwarzkopf and Shine 1992; Webb and Whiting 2005). Hence optimal thermoregulation strategies should minimise ecological risks and maximise physiological benefits (Huey and Slatkin 1976). Usually, terrestrial squamate reptiles escape from predators by fleeing into the nearest refuge and optimal use of shelters implies maximizing predator avoidance while minimizing thermal costs (Cooper 1998; Martin and López 1999; Downes 2001). Indeed, under temperate climates, since ambient temperature is generally limiting, natural shelters are usually too cool and thus provide lower thermal conditions than the optimal temperature for performance (Martin, 2001). Therefore refuge use is often associated with thermal costs since it will induce a time dependent decrease in body temperature. In that context, emergence behavior should balance a decrease of predation risk over time against the opportunity costs for other activities and thermal costs (Martín 2001; Amo *et al.* 2007).

While the determinant of escape tactics and refuge use in ectotherms attracted considerable interest, only few studies addressed the effect of reproductive status and pregnancy on these variables (Bauwens and Thoen 1981; Downes and Bauwens 2002; Amo *et al.* 2007; Robert and



Thompson 2007). Since squamates are predominantly lecithotrophic (Stewart and Thompson 2000; Blackburn 2005), pregnancy is mainly associated with thermal influences (Tinkle and Gibbons 1979; Shine and Harlow 1993; Shine 1995; Bernardo 1996). Especially, viviparous gravid females typically display intense basking behaviors and shift in their thermal preferences (Robert *et al.* 2006; Shine 2006; Webb *et al.* 2006), usually selecting higher temperatures. Modified maternal thermoregulation is predicted to be beneficial either by accelerating developmental rate (Tinkle and Gibbons 1977; Shine and Bull 1979; Shine 1983b) and improving offspring phenotype (Shine 1995; Shine 2004; Shine 2006b). We expect that thermal costs of refuge use should be more important when females are gravid due to embryos thermal needs. Meanwhile pregnancy is associated to significant physical mass burdening (Shine 1980; Seigel *et al.* 1987; Brown and Shine 2004), leading to locomotor impairment (Lima and Dill 1990; Le Galliard *et al.* 2003). Thus, accentuated thermoregulatory needs (increased exposure), combined with locomotor impairment are likely to increase predation risk. Hence gravid females will have to trade thermoregulation benefits with predation risks and adjustments are expected to occur.

One major aspect in addressing reproductive status is to consider the dynamic nature of pregnancy and associated embryonic and maternal constraints. For instance, embryonic development is a multiphase process that involves complex integrated steps (Andrews 2004). Early embryonic stages (general organization, including neurulation and organogenesis) are particularly susceptible to environmental perturbation due to strong developmental constraints (Andrews 2004). In an experimental study on the aspic viper (Lorion *et al.* submitted) we demonstrated that cold maternal body temperature in the first third of gestation stages led to multiple detrimental effects and profoundly altered offspring phenotype. In turn the same treatment applied in the last third had only limited effect on offspring phenotypic quality. Therefore, we predict that the trade-off between refuge use and thermoregulatory needs should vary according to the gestation stages. Specifically, females should especially favor thermoregulation and minimize refuge use during early (i.e. thermally sensitive) stages relatively to latter stages.

Meanwhile pregnant females face high energetic costs during gestation due to modified basking activity and increase metabolic demand (Schultz *et al.* 2008). Energetic requirements impose significant protein mobilization over the course of gestation that significantly alters musculature and performance (Lourdais *et al.* 2004a; Lorion, unpublished data). Also physical burdening will increase with time due to embryonic water uptake that occurs at late stages (Dauphin-Villemant and Xavier 1986; Lorion, unpublished data). Thereby, performance alteration is likely to increase over time (Le Galliard *et al.* 2003). Thus we expect females to adjust their thermoregulatory behavior and escape tactics and increase predator avoidance at late pregnancy stages that are also less thermally



sensitive. Stage dependent embryonic and maternal constraints are likely to influence the cost-benefit balance between risk avoidance and exposure.

In viviparous squamates, litter size can vary considerably within a given species (Seigel and Ford 1987; Bonnet *et al.* 2001; Lourdais *et al.* 2002). Thus we may wonder to what extent female will adjust their thermoregulation and escape tactics during pregnancy and according to their fecundity. Recent studies offer conflicting results suggesting either an influence of fecundity (Bleu *et al.* 2011) or not (Ladyman *et al.* 2003). However thermoregulation data were either punctual or derived from the field and detailed study in standard condition are thus required to address the impact of fecundity.

In this study, we assessed thermoregulation and response to simulated predatory attacks in pregnant and non-pregnant aspic viper (*Vipera aspis*) at different stages of gestation (first, mid and last third). We predicted that:

- i) Gravid females should thermoregulate more accurately than non reproductive and preferred body temperature (T_{set}) should be independent of the number of developing embryos.
- ii) Due to embryonic requirements, gravid females should spend more time in thermoregulation than non-reproductive females and emerge sooner from the refuge after a simulated attack to minimize thermal costs.
- iii) Gravid females should adjust their investment in thermoregulation over pregnancy. We expected higher behavioral investment at early (i.e. thermally sensitive) stages. In turn, lower thermoregulatory investment and increase in predator avoidance are expected at later stages

Material and Methods

Study species and breeding

Study species

We used a long-term captive colony of aspic viper (*Vipera aspis*). The aspic viper is a small venomous snake inhabiting the western-Palearctic region. In this species, females are typical capital breeder and accumulate energy over extended period before engaging into reproduction (Bonnet *et al.* 2002; Lourdais *et al.* 2002b). This reproductive strategy leads to a frequency of reproduction every 2 to 3 years. During gestation, females experience high energetic constraints (Ladyman *et al.* 2003, Bonnet *et al.* 1999; Bonnet *et al.* 2002), while being anorexic (Lourdais *et al.* 2002a), inducing significant emaciation after parturition. Gravidity is associated with a shift in thermal preferenda with an increase in basking activities (Saint Girons 1952; Naulleau 1979; Ladyman *et al.* 2003). Thermoregulatory changes are also associated with a decrease in movement and food intake.



Breeding protocol

After a 2 month wintering period at 8°C, 30 males and 30 females were transferred in experimental cages (100cm x 30cm x 35cm). The front side was made in glass allow observations of the snakes (see below). A 75 W light bulb was placed on one side of the cage (10 cm high), creating a thermal gradient (18-41°C) in the cage. This light source allowed snakes to bask for 6 hrs per day, between 10 a.m. and 4 p.m. Room temperature was held constant at 18 °C. On the opposite side (coldest zone), an opaque PVC shelter (half cylinder, diameter = 15 cm, length =37 cm) was provided with two circular opening (diameter) facing the light source, and allow snakes to hide, and was used as nocturnal refuge (Lorioux, Pers.Obs.).

Two males and 2 females were housed in each experimental cage. Each day, one male was transferred and one new male was introduced to the 2 females to allow courtship and mating. This protocol was applied during 4 weeks.

At the end of the breeding period, 13 females engaged into reproduction ("R" females) and 19 were not reproductive ("NR" females). Ovulation was determined by ultrasonography (Micromaxx, SonoSite, Inc., Bothell, WA, USA). Vipers are low energy specialist and low frequent feeders. Long term fasting is ecologically relevant notably during pregnancy. To avoid confounding effects of nutritional balance, all females were unfed until the completion of the experiment.

Pregnancy monitoring

Behavioural trials were repeated over 3 successive sessions corresponding to first, second and last third of pregnancy. These periods are relevant since they match with important step in embryonic life including organisation, growth and foetal life (detailed methodology in Lorioux *et al.* submitted). Embryonic development was monitored by regular ultrasonography of females *Vipera aspis*. Embryonic stage was estimated considering the amount of residual yolk and developmental tables (Hubert and Dufaure 1968). An additional session was realized two weeks after parturition in reproductive females.

Body temperature

Thermoregulation profiles were recorded using iButton data logger (DS1922L, iButton thermochron, Dallas Semiconductor, Dallas, USA). The day before each experimental session, females were previously anesthetized (isoflurane) and fitted with miniaturized iButtons, by manual ingestion. Each data logger was programmed (One Wire Viewer software) to record one temperature data every 2 minutes, for 6 days. All data loggers were previously calibrated in climatic chambers (Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany). Moreover, temperature inside climatic chambers was also checked using a mercury thermometer (Fisher Scientific, Illkirsch, France). We used 4 calibration



temperatures (15, 20, 25 and 33°C), corresponding to average temperatures range selected by females. We thus obtained a calibration equation specific for each iButton. Each iButton was assigned a specific number that allows us to correct temperature data when they were got back. Data loggers were retrieved by manual regurgitation (60 %) or were spontaneously regurgitated (40 %) after on average 15 days.

EXPERIMENTAL DESIGN

For each session, experiments were conducted over 6 consecutive days. On the first two days we assessed response to simulated attacks. During the last 4 days, females were left undisturbed in a cost-free environment to assess thermal requirements.

i) Response to simulated predator attack

Repeated predatory attacks are known to modify subsequent behavioral decisions (Martín and López 2001) and we performed two consecutive predator attacks during each trial. Before the experiment, females were cooled one hour at 16°C in a climatic chamber (LMS LDT, Sevenoaks, Kent, United Kingdom; stability $\pm 1^\circ\text{C}$) to control for initial body temperature. Light source was switch on 1 hour before experiments start to ensure that temperature in the basking section reached its maximum (42°C). Females were then introduced into the experimental cages. The video recording started and the experimenter left the room. Then, 90 minutes later, the operator simulated the first attack using 60 cm long pliers (endobabcock) touching the back of the snake and forcing a retreat in the refuge. A second simulated attack was realized 60 minutes later using the same procedure. The trial was stopped 60 minutes later. All trials were recorded with a HD camcorder (Sony, HDR XR100). Between trials, cages and shelters were cleaned with 70% alcohol to remove residual odors.

In order to account for potential variation, two trials were performed for each individual on 2 consecutive days (one in the morning and one in the afternoon) and values were then averaged. This procedure was repeated for the three sessions (early, mid and last third of pregnancy). For each trial, we measured a set of parameter described below.

- General behaviour:

For each individual, we assessed the proportion of time spent in exploration, thermoregulation and under the shelter. We also considered the proportion of individuals already hidden at the time of the simulated attacks

- Response to a simulated attack:

We measured head emergence time (time between entering the refuge and head emergence),



scanning time (time between head emergence and emergence of the mid-body) and time for full emergence (time between entering the refuge and emergence of the whole body). Finally, we derived the proportion of animals staying in the refuge after an attack (no emergence).

- Thermal costs of refuge use:

We assessed thermal costs of refuge use by calculation of the difference between body temperature at the time of the attack and minimal value subsequently recorded under the refuge.

ii) *Thermoregulation in a cost-free environment*

Snakes were maintained in similar experimental cages (100cm x 30cm x 35cm) but the front side of the cage was covered to avoid any visual disturbance. Additional shelters (tiles) were provided to facilitate movement between the main shelter and the thermoregulation area. Snake were maintained undisturbed for 4 consecutive days and water was provided *ad libitum*. Light source provided 6hrs of basking opportunities between 10 a.m. and 4 p.m. Room temperature was held constant at 18°C.

We compared T_b profiles of the reproductive females with non-reproductive females housed under the same conditions over the 4 consecutive days in a cost-free environment. We calculated the mean daily T_b during the basking period (between 10 a.m. and 4 p.m) for each individual. We also considered two derived variables to assess within female and among female variation in T_b . First, we determined the extent of within-female daily T_b variation by examining T_b standard deviation calculated for each day and each female. Second, to measure the influence of reproductive status on inter-female variation in T_b , we calculated the absolute deviation between the individual mean daily T_b and the grand mean of daily T_b of the group of females sharing the same reproductive status.

We used the bounds of the central 50% of selected T_b for each individual when temperature under the heat source was not limiting as our measure of T_{set} (Christian and Weavers 1996; Hertz *et al.* 1993). We used body temperature between 12 a.m. and 4 p.m.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R software (version 2.12.1., Development Core Team 2010). Since the same individuals were tested for each session we used linear models for longitudinal data (lme models, nlme package), with reproductive status and session (effect of time) as co-factors. Attack repetition was also included in the models for analyses of emergence behavior, to account for the effects of repeated predatory attacks. Proportion data were previously logit-transformed (Warton and Hui 2011), and this transformation ensured normality assumptions. Due to the non-normality of the residuals, time for head emergence, scanning and full emergence were log-transformed. However this transformation did not satisfied normality assumption, so we realized a



boxcox transformation of the data for linear models. Optimal λ was assessed using boxcox procedure (package MASS). Data were then transformed using the bcPower procedure (package car), and analyzed using linear models for longitudinal data. Proportion of females already under cover (at the time of each simulated attack) was analyzed using χ^2 tests. Tukey *post hoc* tests were realized for all pairwise comparisons. Significance was determined at $\alpha < 0.05$ for all tests. Values are presented as mean $\pm$ se.

Results

1) Thermoregulation in a cost-free environment

Mean T_b during the basking period was influenced by reproductive status, day, session and an interaction between the three factors (Table 1; Fig.1). Mean T_b was higher in pregnant females ($T_b = 33.46 \pm 0.71^\circ\text{C}$) compared to non-reproductive ones ($T_b = 30.63 \pm 4.22^\circ\text{C}$).

Considering only reproductive females, thermoregulation was strongly modified after parturition. Preferred mean temperature measured in post reproductive females were much lower ($T_b = 27.33 \pm 6.19^\circ\text{C}$; session effect: $F_{2,360} = 2273.140$, $p < 0.001$; Fig.1) than during pregnancy.

Table 1. Effects of reproductive status and time on body temperature (T_b) variation, in *Vipera aspis*. d.f.: Degrees of freedom; SS: Sum of squares.



Traits	Factors	d.f	S.S	F-ratio	P-value
Mean daily Tb (°C)	Reproductive Status (A)	1	28	32.852	< 0.001
	Day (B)	2	336	6.562	< 0.001
	Session (C)	2	336	148.068	< 0.001
	A*B	3	336	1.763	0.151
	A*C	2	336	55.577	< 0.001
	B*C	6	336	69.812	< 0.001
	A*B*C	6	336	12.834	< 0.001
Standard deviation (°C)	Reproductive Status (A)	1	28	50.987	< 0.001
	Day (B)	3	336	1.380	0.249
	Session (C)	2	336	0.489	0.614
	A*B	2	336	0.583	0.627
	A*C	2	336	0.231	0.794
	B*C	6	336	0.552	0.768
	A*B*C	6	336	0.273	0.949



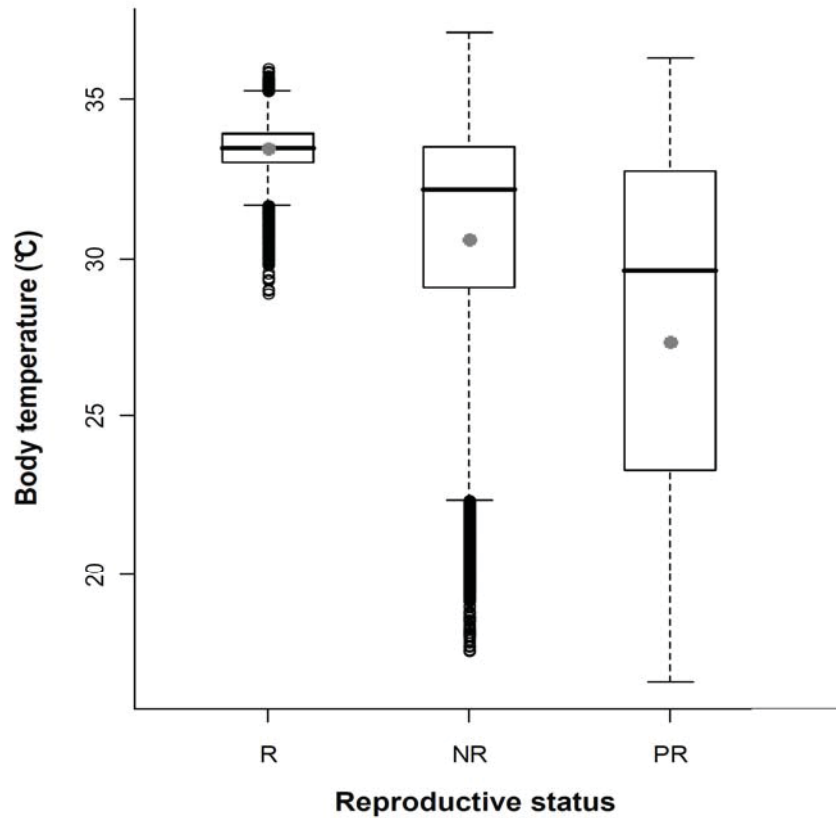


Figure 1: Effects of reproductive status on mean body temperature selected during basking opportunities (12hrs-16hrs). “R,” “NR” and “PR” represent respectively reproductive, non-reproductive and post-reproductive females. The median is represented by the middle horizontal line in the box-plot and the mean by the grey circle. Interval between 25 and 75% quartiles is represented by boxes and range by whiskers. Open circles are outliers.

T_b standard deviation was influenced by reproductive status (Table 1; Fig.2). Pregnant females showed less daily T_b variation than did non-reproductive females (mean values 0.50 ± 0.17 vs. 1.70 ± 1.24 °C, $F_{1,28} = 46.989$, $p < 0.001$) and post-reproductive females (session effect, $F_{1,130} = 58.067$, $p < 0.001$; Fig.2).



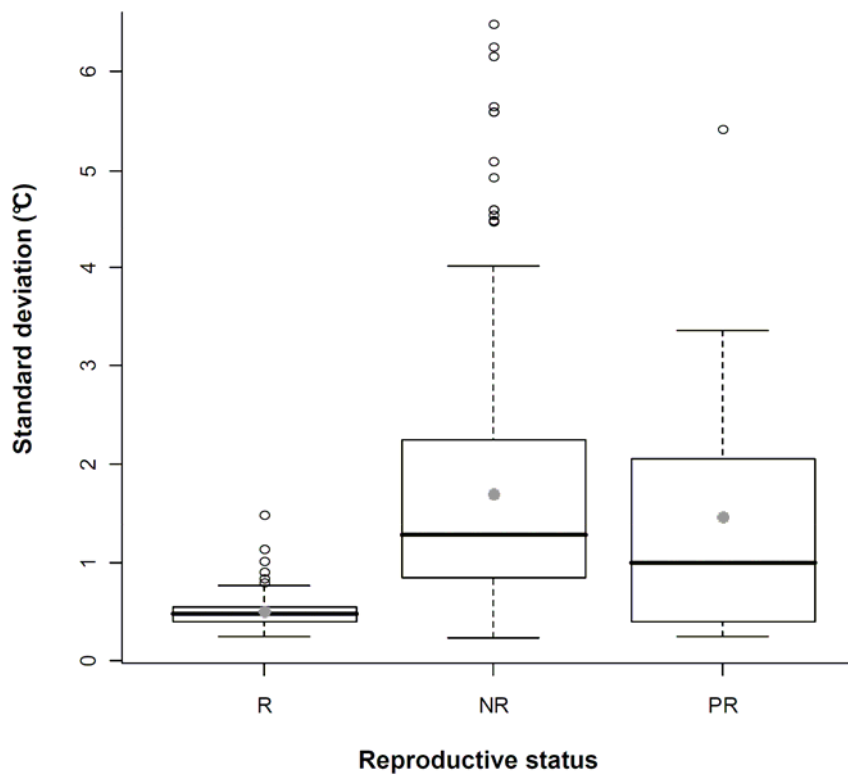


Figure 2. The precision with which individual females maintain body temperature as represented by the mean daily T_b standard deviation (°C) of gravid (“R”), non-reproductive (“NR”) and post-reproductive (“PR”) females *Vipera aspis*. The median is represented by the middle horizontal line in the box-plot. Interval between 25 and 75% quartiles is represented by boxes and range by whiskers. Open circles are outliers.

Similar results were found when considering T_{set} for reproductive females [33.03-33.92] and non reproductive females [28.58-33.46]. Selected body temperatures were significantly different among sessions in non pregnant females (Tukey *post hoc* tests, $p < 0.001$ for all comparisons) but not in pregnant ones ($p > 0.05$ for all comparisons). Importantly preferred body temperature in pregnant females was not related to fit litter size ($r^2 = 0.042$, $p = 0.375$; Fig. 3)



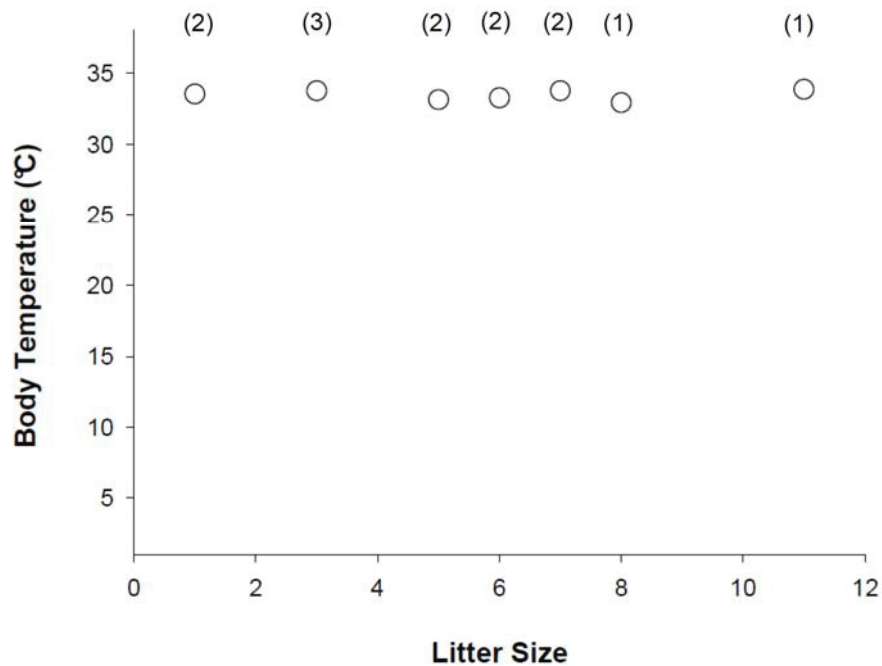


Figure 3: Plot of the effect of litter size on mean selected body temperature in pregnant females *Vipera aspis*. Data of each session were pooled. In our experiment, females litter size ranges from 1 to 11 developing offspring. Numbers in brackets indicates the number of females considered for each litter size.

2) Behavior under the risk of predation

Activity budget was dependent of reproductive status (Table 2). Time in exploration was higher in non pregnant females. It was also influenced by session (Table 2; Tukey *post hoc* test, S1 vs. S3, $p < 0.05$) with a significant decreased over time (Fig.4). Pregnant females spent a higher time proportion in thermoregulation compared to non-reproductive females (Table 2; Fig.4). Time spent in thermoregulation increased over successive session for non-reproductive females (Tukey *post hoc* test, S1 vs. S3, $p = 0.014$; S2 vs. S3, $p = 0.009$) but was not time dependant for pregnant females (all pairwise comparisons, $p > 0.05$). Time spent hidden was different between statuses (Table 2). Non-reproductive females spent more time hidden than did pregnant females (40% vs 10%, Fig.4). No significant time effect was detectable (Table 2). Activity budget was not related to total litter size or fit litter size either considering time in thermoregulation ($r^2 = 0.237$; $p = 0.393$), in exploration ($r^2 = -0.34$; $p = 0.120$) or hidden ($r^2 = -0.051$; $p = 0.953$).



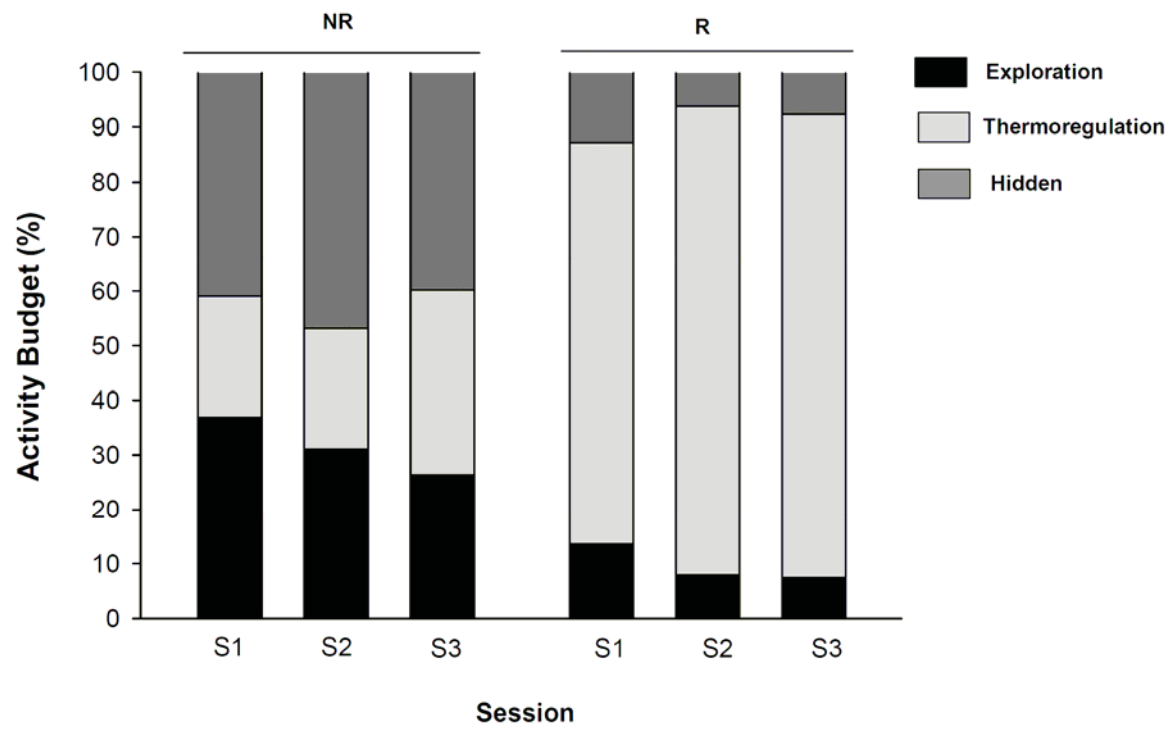


Figure 4: Effect of reproductive status and time on activity budget in *Vipera aspis*.



Table 2. Effects of reproductive status, time, and attack repetition, on activity budget and emergence behavior after a simulated attack in *Vipera aspis*. d.f.: Degrees of freedom; SS: Sum of squares.

Behaviour	Factors	d.f.	SS	F-ratio	P-value
Time in exploration (%)	Reproductive status (A)	1	30	14.362	< 0.001
	Session (B)	2	344	11.959	< 0.001
	A*B	2	344	0.881	0.416
Time hidden (%)	Reproductive status (A)	1	30	35.938	< 0.001
	Session (B)	2	344	1.357	0.259
	A*B	2	344	2.968	0.053
Time in thermoregulation (%)	Reproductive status (A)	1	28	86.672	< 0.001
	Session (B)	2	322	4.953	0.002
	A*B	2	322	3.359	0.036
Time before head emergence (min)	Reproductive status (A)	1	29	18.156	<0.001
	Session (B)	2	248	2.047	0.134
	Attack (C)	1	248	1.258	0.258
	A*B	2	248	4.281	0.015
	A*C	1	248	1.767	0.185
	B*C	2	248	0.496	0.609
	A*B*C	2	248	0.031	0.969
Scanning time (min)	Reproductive status (A)	1	29	47.051	< 0.001
	Session (B)	2	243	0.348	0.707
	Attack (C)	1	243	2.87	0.092
	A*B	2	243	7.318	0.7651
	A*C	1	243	2.87	0.0073
	B*C	2	243	1.8	0.167
	A*B*C	2	243	0.017	0.983
Time before full emergence (min)	Reproductive status (A)	1	29	47.8	< 0.001
	Session (B)	2	242	0.327	0.721
	Attack (C)	1	242	3.797	0.052
	A*B	2	242	1.189	0.306
	A*C	1	242	2.567	0.11
	B*C	2	242	1.486	0.228
	A*B*C	2	242	0.147	0.864



3) Response to simulated predatory attacks

In accordance with previous results on activity budget, the proportion of females under refuge at the time of the attack was always higher in non pregnant female and so for each session (session1: 7.7% vs. 26.3%, $\chi^2 = 9.301$, $p < 0.002$; session 2: 7.7% vs. 42.1%, $\chi^2 = 25.262$, $p < 0.001$; session 3: 0 vs. 21.1%, $\chi^2 = 13.867$, $p < 0.002$). When a female was already under cover, she was not included in the subsequent analyses.

After simulated attack, pregnant females systematically emerged from the refuge, while some non-reproductive females remained under cover. This proportion varied between session (Session 1: 16.4%, $\chi^2 = 8.431$, $p = 0.004$); session 2: 6.8%, $\chi^2 = 3.366$, $p = 0.067$, and session 3: 8.3%, $\chi^2 = 5.778$, $p = 0.017$).

Time before head emergence was influenced by reproductive status (Table 2; Fig.5). Head emergence time was 285 % lower for pregnant females than for non-reproductive females. We also found an interaction between session and reproductive status with a significant increase over time in non-reproductive females (Tukey *post hoc* tests: S2 vs. S3, $p = 0.039$), but any effect of attack repetition (Table 2).

Scanning time was influenced by reproductive status (Table 2; Fig.5). We found an effect of the interaction between attack repetition and reproductive status on scanning time (Table 2; Fig.5). Scanning time was longer after the second attack for non-reproductive females (Tukey *post-hoc* test, $p = 0.033$). No differences were detected for pregnant females (Tukey *post-hoc* test, $p = 0.815$).

Full emergence time was much shorter in pregnant females (5.7 ± 0.9 min) compared to non-reproductive females (22.4 ± 3.5 minutes; Table 2) and was not variable across sessions (Table 1). Emergence behavior was not influenced by litter size either considering head emergence ($p = 0.971$), scanning time ($p = 0.97$) and time before full emergence respectively ($r^2 = -0.008$ and; $r^2 = -0.026$ and $p = 0.813$; $r^2 = 0.007$ and $p = 0.899$).



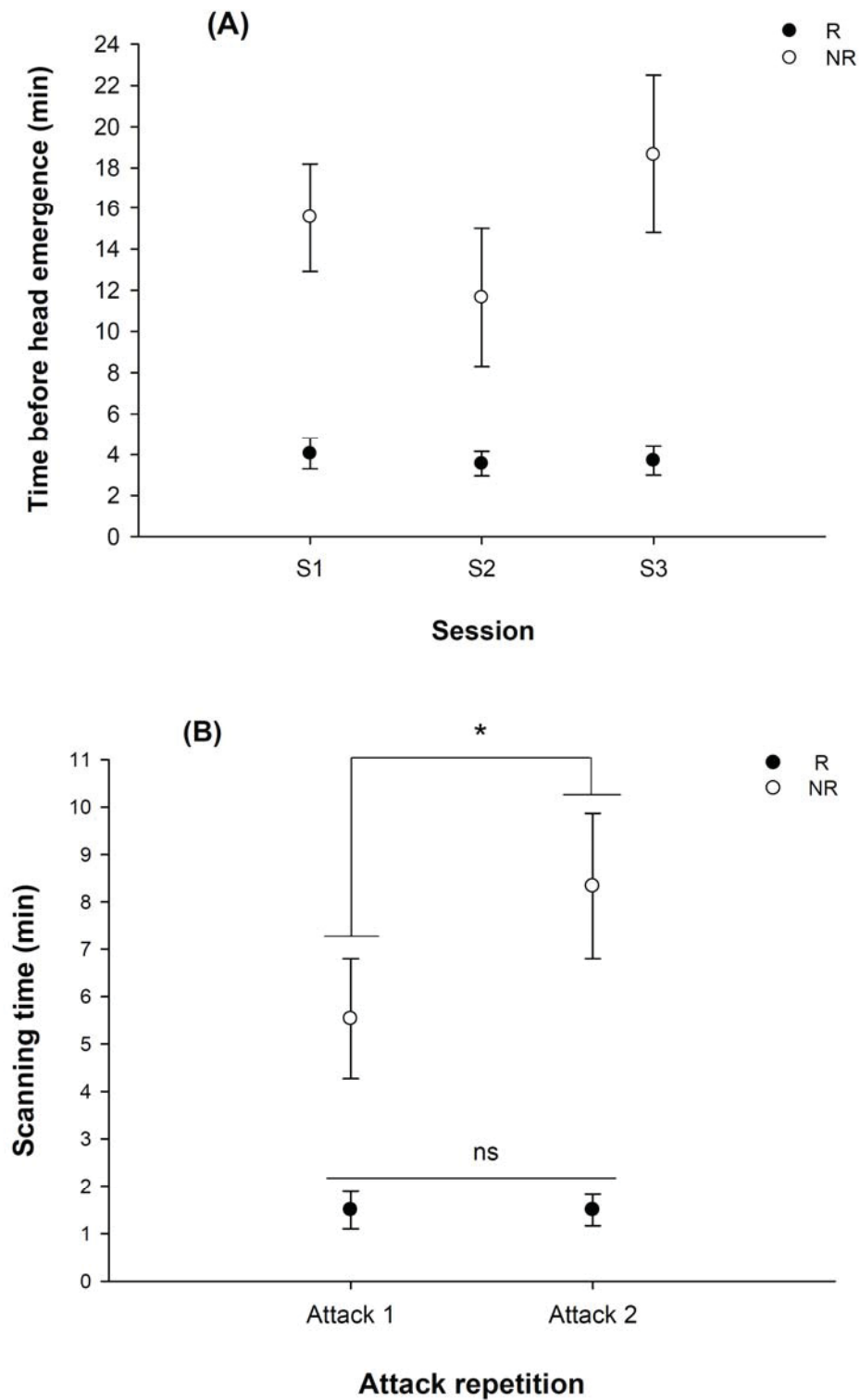


Figure 5. Effect of reproductive status, attack repetition and time on emergence behavior in *Vipera aspis*. (a): Time for head emergence and (b): Scanning time. Pregnant females are represented with black bars and non reproductive females with grey bars. Error bars represent SE.

Refuge use induced significant thermal costs with thermal changes were mainly related to time spent under refuge ($F_{1,176} = 299.863$, $p < 0.001$), and initial body temperature ($F_{1,176} = 69.418$, $p <$



0.001). We found a significant effect of reproductive status ($F_{1,29} = 20.568$, $p < 0.001$), session ($F_{2,215} = 6.245$, $p = 0.002$) and the interaction term ($F_{2,215} = 3.180$, $p = 0.044$) on thermal costs (Fig.6). Despite lower temperature (33.22°C vs. 29.68°C for pregnant and non-pregnant females respectively, $F_{1,27} = 42.576$, $p < 0.001$) at the time of the attack, non pregnant females experienced higher thermal costs ($2.83 \pm 1.96^{\circ}\text{C}$) than pregnant females ($1.34 \pm 0.93^{\circ}\text{C}$). Thermal costs were more variable for non pregnant females ($p < 0.001$) with an increase in last session. In turn, no differences among sessions were found in pregnant females ($p > 0.05$).

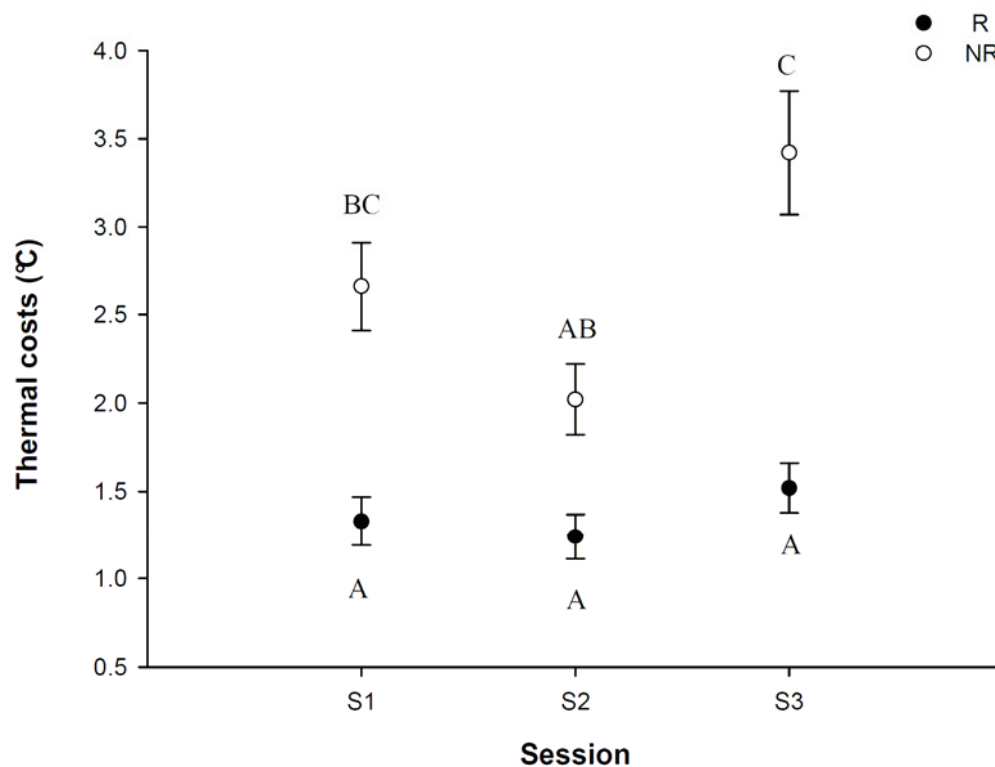


Figure 5: Effects of reproductive status and time on thermal costs (decrease in body temperature associated with refuge use). Black circles represent pregnant females (R), and white circles non reproductive females. Error bars represent SE. Levels connected with the same letter are not significantly different.



Discussion

In this study, we provided a thorough assessment of maternal behaviour and escape tactic in a viviparous snake. Exposure strategies are predicted to trade benefits of activity (foraging, thermoregulation) with costs of exposure (predation). Pregnant females were extremely accurate thermoregulators and thermal preference was not related to the number of developing embryos. Non reproductive female adjusted their response to predation risk and over time. In turn, pregnant females adopted an exposed strategy and decreased thermal costs of refuge use independently of pregnancy stage. Therefore, our results suggest that substantial, benefits derived from accentuated thermoregulation may bypass potential costs of exposure.

Thermoregulatory behavior

While the species has been extensively studied (Saint Girons 1952; Naulleau 1979; Ladyman *et al.* 2003) no data are available on T_{set} in a cost-free thermal gradient. We revealed that pregnant females are extremely precise thermoregulators. They selected high body temperature with a narrow T_{set} range (33.03-33.92°C). Within-female daily temperature variations were much smaller indicating stable thermal profiles. Inter-female variations underlined the fact that female converge to similar thermal preference to select similar temperature. The narrow range of T_{set} reported here lies within highest level of thermal accuracy in squamates (Angilletta 2009). Thermoregulatory shift has been reported in a number of species either toward higher (Gregory *et al.* 1999; Brown and Weatherhead 2000; Lourdais *et al.* 2008) or lower (Braña 1993; Andrews *et al.* 1997; Ji *et al.* 2007) temperatures. However, the components of thermal accuracy (daily T_b variation, between female differences) have seldom been addressed. Beside shift in thermal preference, enhanced thermoregulatory accuracy is possibly a crucial determinant of developmental and reproductive success.

Importantly maternal thermal preferences were not linked to reproductive effort despite significant litter size variation (1 to 11). A major dichotomy exists between depreciable (food provisioning for instance) and non depreciable form (defence against predators, thermal or hydric care) of parental care. Embryonic thermal sensitivity is highly specific and differs from the typical asymmetric performance curve described in ectotherms (Angilletta 2009). Narrow embryonic tolerance may be a major factor influencing the benefit of maternal thermal accuracy. By using behavioural means pregnant females increase embryonic access to presumably optimal temperatures and this resource will be non depreciable by nature (all embryo benefit from thermal shift). Maternal thermoregulation was not dependent of pregnancy stages suggesting that thermal requirement do not vary over the course of development. Previous studies have addressed the



fecundity dependence of maternal thermoregulation either using field (Ladyman *et al.* 2003) or laboratory data (Bleu *et al.* 2011), and offering somehow contrary results. However, both studies were using punctual temperature samplings that are known to be problematic (Taylor *et al.* 2004) especially with small sample sizes. A study in *Zootoca vivipara* reported a thermal shift over time with lower temperature shortly before parturition (Le Galliard *et al.* 2003a). In this case, temperature samplings were based on hourly cloacal probing possibly inducing significant stress. Further studies are now required in other species to address fecundity and stage dependence of maternal thermal preference using cost free thermal gradient and non-constraining logging techniques.

Behaviour under the risk of predation

We found a major impact of reproductive status on activity budget and response to a predator attack. In accordance with field observations, pregnant females dedicated their time to basking (Saint Girons 1952; Naulleau 1979; Ladyman *et al.* 2003) and thereby increased their exposure. In turn, non-reproductive females spent most of their time hidden (42%) as underlined by the number of female already under cover at the time of a simulated attack (29.6% in average). After a simulated attack, emergence time from a refuge after a threat was considerably shorter in pregnant females. The reason of the decrease combined i) shorter time for head emergence and ii) reduced scanning before behaviour decision. Scanning behaviour has been described in a number of lizards species (Avery *et al.* 1993; Stapley and Keogh 2004) and are probably crucial component of risk assessment. To our knowledge this parameter has not been studied in snakes. Non reproductive adopted a contrasted tactic toward risk avoidance. First, emergence time was 4 times longer in this group. Second and perhaps more interestingly, scanning time was adjusted to risk level: after the second attack, they spent more time in scanning behavior before deciding to emerge. These results indicate a behavioural adjustment subsequent to the evaluation of risk level, as previously demonstrated in lizards (Amo *et al.* 2004a). Finally, time spent under refuge increase over time notably in the last session. Our results underline that pregnancy modifies behavioural decision and the integration of environmental cues.

Heat for safety? Pregnant female minimize thermal costs

Decision making depends on cost/benefit balance and this trade off appears strongly modified by pregnancy. Assessment of thermal costs of refuge brought significant insight on the determinant of decision making. Pregnant females tolerated only a 1.4°C decrease in body temperature before eliciting emergence with no variation over gestation. In turn, thermal changes experienced by non-



pregnant females were much higher (2 to 3.4 °C), more variable among females and across sessions. Hence, it appears that response to simulated attack is closely linked to modified thermoregulation including thermal preference (see above) and tolerance to deviation.

Behavioural shift reported here may appear costly since it increases exposure to potential predators. Field data indicate that pregnant female strongly modify their habit during gestation with smaller home range, reduced food intake (Lourdais *et al.* 2002a). Beside, field observation suggest that females carefully select favourable microhabitat for thermoregulation but that favour swift retreat to a nearby refuge (<1m) in case of an attack. Hence, careful habitat selection may efficiently respond to the conflicting needs of exposure and predator evasion. Also, vipers are venomous snakes that are potentially dangerous to predators. Dorsal zigzag dorsal pattern is a complex visual signal that can combine aposematic and cryptic antipredatory function (Wüster *et al.* 2004; Valkonen *et al.* 2011). Hence, despite conspicuous exposure, females may rely on camouflage to limit predator's detection, as already suggested by other studies (Bauwens and Thoen 1981; Brodie 1989; Schwarzkopf and Shine 1992; Le Galliard *et al.* 2003a). Hence, exposure related risks may be largely balanced by specific behavioural strategies and appropriate habitat use.

Why don't female adjust their effort with gestation constraints?

Contrary to our initial prediction pregnant females did not adjust their behavior over the course of gestation. This result first seems counterintuitive when considering the dynamic nature of maternal constraints. For instance water uptake occurs at late stage of development (Dauphin-Villemant and Xavier 1986) and significantly increase physical burden (Le Galliard *et al.* 2003a). Meanwhile significant protein mobilization occurs during gestation inducing structural and performance costs (Lourdais *et al.* 2004a). Hence, we expected that female would adopt less risky tactics at late pregnancy stages and increase refuge use. In turn, pregnant females maintained their thermoregulation effort to maximise time at T_{set} and minimize deviation from selected temperature.

The trade off between exposure and refuge use needs to be addressed in a relevant mechanistic and ecological context. Decision making depend of cost benefit balance and a key question to address is the significance of maternal thermoregulation. The aspic viper is a medio-European species that typically face fluctuating weather conditions that constraint reproduction (Lourdais *et al.* 2004b) and affect date of birth (Lourdais *et al.* 2002b, 2004b) with cold temperatures delaying parturition. Date of birth is a critical life history parameter, notably in constraining temperate climates (Olsson and Shine 1998; Shine and Elphick 2001; Lourdais *et al.* 2004b, Altwegg *et al.* 2005). Early date of birth positively influence offspring survival (Olsson and Shine 1998; Warner and Shine 2007) and subsequent reproductive opportunity (Uller and Olsson 2010). Meanwhile, early



parturition are likely beneficial to the mother by shortening the duration of physical impairment (Shine and Olsson 2003).

In an experimental study (Lorion *et al.*, in revision), we showed that accessing T_{set} at early stage (first and second third of gestation) was essential for offspring quality. However, deviation from T_{set} significantly increased gestation length and delayed parturition date whatever the period considered. Thermoregulation is constrained by weather condition (Lourdais *et al.* 2004b) and pregnant females may value any opportunity to reach their thermal preference and speed up developmental rate. The significance of maternal thermal accuracy on reproductive phenology has been experimentally demonstrated in another species (Lorion *et al.*, in revision).

Finally, viperid snakes are typical low energy specialists that display specific ecological attributes including low frequency of reproduction and infrequent food intake. For, instance, gestation can be carried successfully without energetic intake in natural condition as well as in experimental situation (Lourdais *et al.* 2002a, this study). Female *Vipera aspis*, reproduce every 2 to 3 years when they have accumulated sufficient energy stores up to a body condition threshold (Naulleau and Bonnet 1996; Bonnet *et al.* 2002; Lourdais *et al.* 2002b). Reproductive opportunities are constrained by storage dynamic and high post-reproductive costs (Lourdais *et al.* 2002b, Bonnet *et al.* 2001). In this context, females are likely to benefit from earlier parturition date that will increase activity period before wintering and favour energetic recovery from reproduction. Hence, substantial fitness benefits derived from accurate thermoregulation combined with compensatory tactics discussed above (habitat selection) may well counterbalance potential costs of exposure.

Acknowledgments

We thank Christian Thiburge that helped for experimental cages building. Marie Vaugoyeau helped in data collection and snakes care. Nathalie Lachize contributed to video analyses. We also thank Frédéric Angelier that provided helpful comments on the manuscript. Financial support was provided by the FYSEN foundation and Agence Nationale de la Recherche.





CHAPITRE 3 :

Les coûts de la régulation du développement



Résumé du chapitre 3

Dans le cadre du troisième chapitre, nous nous sommes intéressés aux contraintes de la reproduction chez les squamates, et notamment pendant l'expression des soins prénataux. La reproduction est associée à des modifications écologiques et physiologiques profondes chez les femelles. L'investissement énergétique dans la formation des œufs est généralement très élevé notamment chez les espèces qui se reproduisent par accumulation d'énergie (« capital breeding »). En effet, celles-ci doivent accumuler des réserves sur de longues périodes de temps et ce, suffisamment pour franchir un seuil d'engagement dans la reproduction. Les boas, pythons et vipères sont des formes spécialisées vers ces systèmes de capitalisation avec une faible fréquence d'événements reproducteurs. La reproduction combine une phase d'allocation des réserves (formation de vitellus pour les follicules en croissance) prolongée ensuite par la prise en charge des embryons soit à travers la gestation ou les soins aux œufs (i.e. « activité accessoires » identifiée par Bull et Shine 1979). Les soins prénataux vont venir ajouter une demande physiologique à la femelle.

Si la gestion des réserves lipidiques a attiré une attention considérable la mobilisation protéique est également importante à considérer dans la mesure où il n'existe pas de forme de « stockage », et que les protéines sont importantes pour l'allocation directe et soutenir le jeûne. La dynamique des contraintes de la reproduction est donc particulièrement importante à adresser afin de mettre en relation les coûts et bénéfices de la mobilisation maternelle. Nous avons donc quantifié les contraintes associées à la reproduction chez ces deux espèces aux modes de reproduction contrastés, et leur évolution au long de la prise en charge maternelle. Nous avons considéré une diversité de paramètres structuraux (musculature), physiologiques (hormones, réponse au stress et stress oxydatif) et locomoteurs (mesure de force). La perte musculaire a été évaluée en mesurant la largeur des muscles épaxiaux chez le python de Children. Chez la vipère aspic, ces muscles étant peu détectables, nous avons utilisé une mesure alternative au niveau de la base de la queue, zone qui présente un amaigrissement visible chez les femelles gestantes et post-reproductrices. Les performances locomotrices sont importantes pour évaluer la capacité à capturer des proies ou à fuir face à un prédateur, et donc pertinentes en terme de fitness.

Nos résultats indiquent des coûts potentiels majeurs associés à la reproduction dès la phase de vitellogénèse. Chez *A. childreni*, la formation dans les œufs représente un investissement important pour les femelles avec une altération de la composition musculaire, associée à une diminution des performances chez les femelles reproductrices, en comparaison aux femelles non-reproductrices. Les pertes musculaires sont ensuite amplifiées par la phase d'incubation où la femelle effectue une régulation des échanges hydriques des œufs qui impose un jeûne prolongé.



Enfin, la force de traction est liée à la condition musculaire et fortement affectée chez les femelles après la ponte, et encore plus après l'incubation. Concernant les soubassements hormonaux, on observe des taux basaux plus élevés de corticostérone juste après la ponte avec ensuite une réduction progressive. En parallèle, l'étude du stress oxydatif apporte des informations complémentaires avec une évolution progressive au cours du temps, ce qui soutient l'aspect cumulatif des contraintes de la reproduction.

Chez la vipère aspic, des pertes musculaires marquées sont observées chez les femelles reproductrices pendant la gestation. Des pertes équivalentes sont cependant observées chez les non-reproductrices mais avec un décalage de musculature (les femelles gestantes ayant une musculature plus basse). Le suivi des modifications physiologiques a mis en évidence une évolution progressive des taux basaux de corticostérone au cours de la gestation alors que les valeurs restent stables chez les femelles non-reproductrices. Un patron similaire est observé pour la réponse au stress. Ce phénomène pourrait être impliqué dans les processus de mobilisation énergétique nécessaire à la conduite de la gestation à son terme. Cependant, la corticostérone pourrait aussi être impliquée dans d'autres processus comme l'osmorégulation et l'allocation de l'eau dans les œufs.



Running head: protein catabolism in snakes

Structural and performance costs of reproduction in a pure capital breeder, the Children's python, *Antaresia childreni*

Olivier Lourdais^{1,2}, Sophie Lorioux¹, Dale F. DeNardo²

¹ Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS, 79360, Villiers en Bois, France

² School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

Correspondance:

Olivier Lourdais, CEBC-CNRS UPR 1934

79 360 Villiers en Bois, FRANCE

Phone: + 33 (0) 5 49 09 96 16

Fax: + 33 (0) 5 49 09 65 26

E-mail: Lourdais@cebc.cnrs.fr

For consideration in: *Physiological and Biochemical Zoology*

Table: 2

Figures: 4



Abstract.

Females often manage the high energy demands associated with reproduction by accumulating and storing energy prior to initiating the reproductive effort. However, fat stores cannot satisfy all reproductive resource demands that include considerable investment of amino acids (e.g., for the production of yolk proteins or gluconeogenesis). Since extreme capital breeders are generally aphagic during reproduction, these amino acids must come from internal resources, typically muscle proteins. While the energetic costs of reproduction have been fairly well studied, there is limited data on structural and performance costs associated with muscle degradation required to meet amino acid demands. Thus, we examined structural changes (epaxial muscle width) and locomotor performance costs (constriction and strength) over the course of reproduction in an extreme capital breeder, the Children's python (*Antaresia childreni*).

We found that both egg production (i.e., direct resource allocation) and maternal care (egg brooding) induce muscle catabolism and affect performance of the female. While epaxial muscle loss was minimal in non-reproductive females, it reached up to 22% (post-oviposition) and 34% (post-brooding females) of initial muscle width. Interestingly, we found that individuals with higher initial muscular condition allocated more of their muscle into reproduction. The amount of muscle loss was significantly linked to clutch mass underlying the role of structural protein for egg production. Egg brooding significantly increased proteolysis and epaxial loss, despite no direct allocation to the offspring. Muscle loss was linked to significant reduction in performance in post-reproductive females. Overall, these results demonstrate that capital breeding females experience dramatic reproductive costs that consume structural resources and jeopardize performance.

Key words: *capital breeding, muscle, protein, trade off, brooding*



Introduction

Reproduction is one of the most highly demanding activities. This is particularly true for females that expend massive amount of energy into offspring production (direct allocation) as well as invest time and additional energy into behavioral modifications associated with care of the progeny (Bull and Shine 1979; Clutton-Brock 1991). Food availability can be highly heterogeneous in space and time, so food availability during the time of reproductive investment is often insufficient to cover the elevated energy requirements. Additionally, temporal and spatial demands associated with foraging and digestion may be incompatible with reproductive activities (Drent & Daan 1980; Jönsson 1997). Therefore, it can be advantageous to accumulate energy stores in advance of reproduction (i.e., capital breeding), since doing so, allows reproductive investment independent of immediate resource availability and avoids physiological conflicts between the reproductive and digestive systems (Jönsson 1997; Bonnet *et al.* 1998; Varpe *et al.* 2009). Lipids constitute the most energetically dense nutrient and can be stored in specific tissues (e.g., fat bodies). Many vertebrates accumulate large amounts of fat prior to reproduction, and these stores can later be mobilized to support specific needs (e.g., incubation, lactation, gestation) (Ofstedal 1993; Crocker *et al.* 1998; Senechal *et al.* 2011) or cover the entire energy requirements of reproduction (Bonnet *et al.* 2002; Crossin *et al.* 2009). Patterns of energy acquisition and allocation have attracted considerable scientific interest and stimulated discussion on the origin of energy used (capital *versus* income) (Jönsson 1997; Bonnet *et al.* 1998). Recent work suggests that, among vertebrates, there is a continuum rather than a dichotomy between capital and income strategies and many species can combine the two (Meijer & Drent 1999; Wheatley *et al.* 2008; Warner *et al.* 2008; Telemeco and Baird 2011).

Importantly, reproduction requires an investment by the female of a myriad of components in addition to lipids including proteins and essential mineral elements (White 1991). Proteins are a critical resource in several respects. First, amino acids provide raw materials necessary for subsequent protein synthesis associated with somatic growth and development of the offspring. Considerable amounts of proteins are allocated to the developing embryos via egg yolk (White 1991; Senechal *et al.* 2011) or through post-natal provisioning (lactation). Also, during prolonged fasting (Lowell *et al.* 1982, 1986; Cherel *et al.* 1992), the conversion of amino acids to glucose via gluconeogenesis is critical. Contrary to lipids that can be stored in specific cells (such as adipocytes), no equivalent storage tissues exist for proteins. Instead, proteins are principally located in muscle tissue and are tightly linked to muscle fiber function. Thus, in the absence of dietary protein intake, substantial protein mobilization will eventually induce muscle atrophy and subsequently decrease functional performance (Schwilch *et al.* 2002). This allocation trade-off is likely amplified in those



species that undergo prolonged fasting during reproductive activity, most notably extended attendance of the eggs or neonates (Bull & Shine 1979). Hence, reproduction likely imposes contrasted constraints on female protein balance in relation to (i) reproductive investment (direct allocation) and (ii) an activity shift that is associated with parental care and may induce a reduction or complete cessation of food intake.

Protein mobilization has been widely studied from a physiological perspective (Cherel *et al.* 1988, 1992; Challet *et al.* 1995; Bordel and Hase 2000). Even when extensive lipid stores are available, a prolonged fast may have dramatic consequences on critical protein-rich tissues (e.g., muscle), and various protein-sparing strategies have emerged (Cherel *et al.* 1988). Because it compromises short-term survival through reduced performance, protein depletion can drive behavioral choices such as withdrawing from reproductive activities (Robin *et al.* 2001). To date, the impact of reproductive demands (resulting from direct allocation and parental care) on protein mobilization and notably the associated functional costs have not been explored in depth. Nevertheless, this facet of reproductive costs is particularly relevant in term of life history strategies. Because it affects functional performances and thus individual phenotypic quality, protein depletion may mediate substantial costs of reproduction. Protein depletion is likely to be most relevant in natural systems characterized by low rates of nutrient acquisition combined with prolonged fasting episodes.

Energy requirements for maintenance are very high for endotherms and typically require regular food intake. Capital breeding is likely to be constraining for endotherms and reliance upon storage by endotherms tends to be restricted to limited periods of reproduction such as incubation or gestation. While several mammals and birds are defined as “capital breeders”, (Meijer and Drent 1999; Crocker *et al.* 2001) the use of stored capital is typically subsidized by some food intake (i.e., partial capital-breeding). This is true even in extreme examples such as the emperor penguins (*Aptenodytes forsteri*) or common eiders (*Somateria mollissima*) that can sustain prolonged periods incubating their eggs without feeding (Cherel *et al.* 1988; Senechal *et al.* 2011). In turn, capital breeding is a particularly widespread strategy in ectotherms, which have low metabolic requirements for maintenance and many species have low feeding frequency (Bonnet *et al.* 1998). Most ectotherms are lecithotrophic and thus yolk lipoprotein synthesis and deposition into the developing follicles requires considerable investment by the female (Sheridan 1994). After ovulation, some species provide non-depreciable care (Somma 2003) to the developing embryos (guarding, brooding) that will extend the duration of fasting and thus require further investment of body lipids and proteins. Since proteins are paramount to reproduction and proteins cannot be readily stored in the body, protein depletion is likely a significant reproductive constraint in ectotherms, but this aspect has attracted only limited interest (Santos *et al.* 2007).



Boas and pythons are renowned among squamates for their low metabolic requirements (Bedford 1998; Zaidan 2003), very large lipid storage, and extreme fasting abilities. Reproduction can be sustained without any food intake (Rivas 1999) thereby resulting in extreme capital-breeding systems. Maternal activities shift after ovulation with attendance of the developing embryos (either through gestation or egg brooding) for prolonged periods (several months). Thus, these snakes are valuable models for addressing the impact of reproductive constraints on protein use considering the relevance of direct allocation and activity shifts induced by prenatal care behaviors. We used the Children's python (*Antaresia childreni*, Gray, 1842), a small python species that broods its eggs, to test the following predictions:

- (1) Vitellogenesis and associated follicular growth should induce significant mobilization of structural proteins
- (2) Maternal care of the eggs should extend the protein depletion induced by vitellogenesis and significantly amplify muscle alteration
- (3) Significant protein depletion and resultant muscle atrophy induced by reproductive constraints (allocation and pre-natal care) alters physical performances after reproduction.

Materials and methods

Study species and maintenance

Antaresia childreni is a medium-sized (to 1200 mm snout-vent length, 600g body mass), non-venomous, constricting snake that inhabits rocky areas in northern Australia from Kimberley, Western Australia, to the eastern Gulf of Carpentaria, Queensland (Wilson & Swan, 2003). Oviposition occurs towards the end of the dry season (July-August, Austral winter) when ambient temperatures are relatively cool and dry. Clutch size is 3-12 with a mean of 6.5 ($n = 4$, Shine & Slip, 1990). After oviposition, females brood their eggs, but are not facultatively endothermic (Stahlschmidt and DeNardo, 2009).

The snakes in our study (49 females, plus 11 males used for breeding) were part of a long-term captive snake colony. Snakes were housed individually in 91 x 71 x 46 cm cages. The room was maintained at 25 °C with a 12:12 light : dark cycle. Permanent access to supplemental heat was provided using a sub-surface heating element (Flexwatt, Flexwatt Corp., West Wareham, MA) below one end of each cage. The resulting thermal gradient was 26 - 42 °C. Water was available *ad libitum* in bowls, and snakes were fed mice (mean mass = 20 g) once every 2 to 4 weeks.

Reproduction

The adult snakes were cooled for two months (December-January) in a temperature-controlled room applying a 6:18 hr daily temperature cycle of 25:15 °C. During this period, room light and



supplemental heat were only provided during the 6 hrs when room temperature was 25 °C. Mating occurred from mid-February to mid-March and ultrasonography (Concept MCV, Dynamic Imaging, Livingston, Scotland) was used periodically to assess reproductive status.

Reproductive females typically refuse to feed after the cooling period. Thus, for consistency, we did not provide food to any of the snakes during the period between wintering and oviposition. Twenty-one of 49 females initiated a reproductive cycle. The presence of both reproductive and non-reproductive females was favourable to assess the impact of reproduction on protein use. Individual cages were inspected daily for oviposition. Laying occurred between early April and mid-June. In each case females rapidly adopted a typical coiled position around their eggs. After oviposition, the female and her eggs were carefully removed from the cage, the clutch was weighed (± 0.1 g) and the eggs counted, and then the female and clutch were placed together in individual polypropylene boxes housed in a thermally controlled room (constant temperature = 30-31 °C, the preferred incubation temperature for Children's pythons). Water was provided *ad libitum* in two water bowls at one side of the box. As in other pythons, the eggs of Children's pythons mostly stick together and generally form a compact conglomerate shortly after oviposition (Ross and Marzec, 1990).

Experimental design

The primary goal of the study was to determine the impact of egg production and egg brooding on protein balance in the female. Since repeated disturbances after oviposition can result in clutch desertion, it was not possible to sequentially study vitellogenesis and brooding for each individual. Thus, we examined structural and functional impacts of reproduction using three groups:

- Group 1: 15 females ("post-oviposition") were removed from the clutch shortly after oviposition to examine the impact of egg production. The period of fasting for these females depended on oviposition date and was on average 85.4 ± 6.0 days.
- Group 2: 6 females ("post-brooding") were left undisturbed to brood their eggs until hatching to measure the combined impact of egg production and brooding. The period of fasting for these females was on average 130.6 ± 12.0 days.
- Group 3: 14 non-reproductive females similar in size, initial mass, and body condition were used as a control group. They were maintained in conditions similar to those described for the reproductive females, and they were measured at the end of oviposition for the two other groups (fasting time 95.5 ± 0.4 days).



Variables collected

Body size and body mass

We measured (± 0.5 cm) maternal total body length (BL), snout vent length (SVL) and body mass (BM) at the end of the wintering period. At that time, ultrasonography indicated that no follicular growth had occurred. Body condition (BC, the residual of the linear regression of BM against SVL) was calculated just after the wintering period (initial BC) and also at the end of the experiment (final BC).

Musculature

In snakes, epaxial muscles lying beside the vertebral column are of primary importance for locomotion (Cundall 1987) and constriction (Moon 2000). Magnetic resonance imaging (MRI) of epaxial musculature has verified that external measurements of muscle width with callipers provide accurate estimates of actual muscle size (Lourdais *et al.* 2005). We measured the width of the epaxial muscles at four-equally spaced points between the head and the vent. For each location, the mean value was derived from four consecutive measures. Measurements were made shortly after wintering for all individuals, after oviposition (group 1), after egg incubation (group 2), and after the imposed fasting (group 3). Muscular condition (MC) was calculated from the linear regression of the average muscle width against SVL. MC was calculated for each individual just after winter (initial MC) and after fasting (final MC).

Performance measures

Pythons rely upon muscular contractions to generate the force needed to subdue and kill prey by constriction, as well as to escape from predators (Cundall 1987). We measured muscle strength of post-partum snakes (non-pregnant females were tested at the same time) in two different contexts designed to mimic the following biologically important situations. The validity of those estimators is described in a related paper (Lourdais *et al.* 2005).

(1) Escape from a predator: these snakes react to handling, especially attempts to stretch out their bodies, by vigorous and extended body contraction. We quantified the strength of these contractions using a dynamometer connected to the snake's tail (Pesola, Baar, Switzerland). Snakes were stretched and then stimulated to provoke body contractions. A drag pointer on the dynamometer recorded the maximum tension over a five-minutes period of repeated stretching and contraction.



(2) Prey handling: we measured the intensity of muscular contraction during prey constriction using a compressible lure (10 cm long X 2 cm diameter water-filled rubber balloon surrounded by mouse-scented cloth, Lourdais *et al.* 2005). The lure was connected to an open water column via a rigid plastic tube (5 mm in diameter). When presented with the lure, snakes readily bit and coiled around the lure, which was then wiggled for 10 seconds to simulate normal prey reaction. Displacements of the water column were video recorded so that maximal displacement could be subsequently measured (cm).

Statistics

All statistics were performed with Statistica 6.0. Initial BC and MC were compared between groups using a simple ANOVA procedure. Changes in musculature condition associated with fasting were examined in a repeated measures ANOVA using MC (initial and final) as a dependent repeated variable, SVL as a covariate, and treatment group as a factor. We examined absolute epaxial muscle loss after averaging values collected from the four body location. We used a simple ANOVA procedure considering muscle loss as the dependent variable, treatment group as factor, SVL, initial MC or BC as linear covariates. Finally, changes in musculature across body locations were examined in a mixed model procedure using muscle change as a dependent variable, body location and treatment group as factors, and individual identity as a random factor. Determinants of initial traction strength were examined in a multiple regression combining initial BC, initial MC and SVL. Changes in force were then examined with a repeated measures ANOVA procedure using initial and final traction forces as repeated dependent variables, treatment group as a factor, and SVL and initial MC as linear covariates. Finally differences in constriction forces were analyzed using an ANOVA procedure. Tukey *post hoc* tests were conducted for 2X2 comparisons. Unless otherwise stated, values are reported as means $\pm$ standard deviation.

Results

1) Changes in epaxial musculature

No differences in initial muscular condition (MC) or initial body condition (BC) were found between the three experimental groups (ANOVA, $F(2, 32) = 1.93$, $p = 0.20$ for MC and ANOVA, $F(2, 32) = 0.05$ for BCI). Initial MC was significantly correlated with BCI ($F(1, 33) = 33.93$, $p = 0.008$), but variance explained was low ($r^2 = 0.20$).

Fasting was associated with loss in muscular condition (repeated measure ANOVA, specific time effect, $F(1, 32) = 312.59$, $p < 0.001$). The groups differed in MC reduction (interaction between time and groups, $F(2, 32) = 61.84$, $p < 0.001$; Figure 1) resulting in contrasted muscular condition



after fasting ($F(2, 32) = 66.82, p < 0.001$). Post-brooding females had lower final MC when compared to post-laying females, themselves having lower values than non-reproductive ones (Fig. 1, Tukey *post hoc* test, all p values < 0.001). MC and BC were more closely related at the end of the experiment ($r^2 = 0.41, F(2, 32) = 10.97, p < 0.0001$).

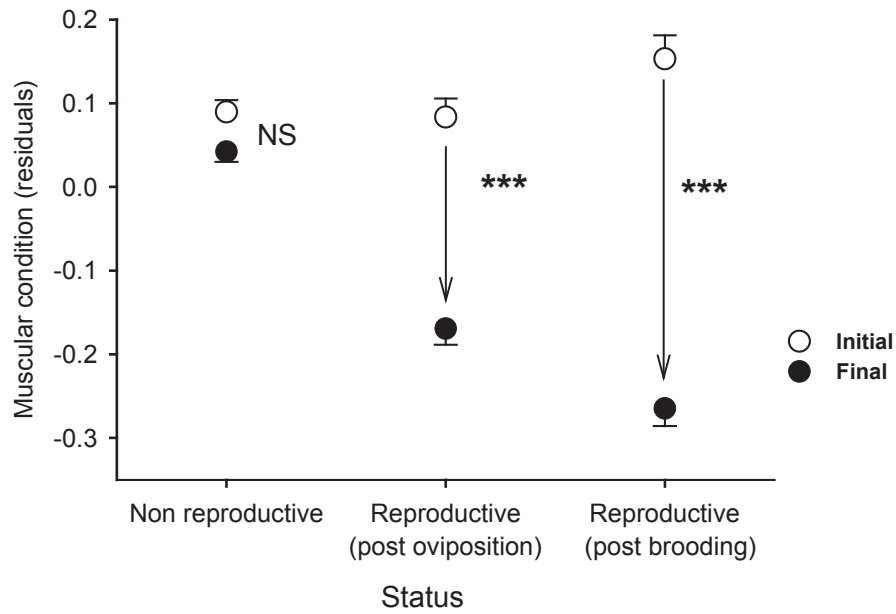


Figure 1. Initial and final muscular conditions (MC) measured in non-reproductive and reproductive females Children's python (*Antaresia childreni*). Reproductive females were measured after oviposition or egg brooding. ("NS" non-significant, *** $p < 0.001$). Error bars represent standard error.



We found a strong influence of treatment on absolute muscle loss ($F(2, 32) = 50.05$, $p < 0.001$). Absolute epaxial muscle loss was on average 5.99 ± 0.97 mm (34%), 3.75 ± 1.4 mm (22%) and 0.77 ± 0.70 mm (4%) respectively for post-brooding, post-oviposition, and control females (*post hoc* test, all p values < 0.001). Musculature changes were best explained when combining in the model the influences of SVL and initial MC (Table 1). While SVL negatively influenced absolute muscle loss ($B\hat{e}tas = -0.13 \pm 0.36$), initial MC condition had a positive influence ($B\hat{e}tas = 0.34 \pm 0.37$). Hence, muscle loss was more pronounced in individuals with higher initial MC. When restricting the analysis to post-oviposition females, we found that muscle loss was closely related to size adjusted clutch mass ($r^2 = 0.36$, $F(1, 15) = 6.85$, $p = 0.02$). The contrast between non-reproductive and post-reproductive females was maintained when controlling for fasting time and considering daily muscle loss (ANOVA, $F(2, 30) = 28.22$, $p = 0.001$). However, post-brooding and post-ovipositing females did not diverge in their daily rate of muscle loss (0.046 ± 0.010 vs. 0.048 ± 0.018 mm/day, *post hoc* tests p value = 0.86).

Table 1. Influences of snout vent length (SVL), initial musculature condition (Initial MC) and reproductive status on epaxial muscle loss in female Children's pythons. The best model was obtained by including all three independent variables. See text for statistics.

$r = 0.94$; $r^2 = 0.89$; $n = 35$; $F(4,30) = 64.18$; $p < 0.0001$

Source	DF	SS	F Ratio	P value
SVL	1	2.58	4.61	0.04
Initial MCI	1	17.67	31.63	< 0.0001
STATUS	2	96.59	86.44	< 0.0001



Muscle loss was not homogenous along the body (GLM treating individual identity as a random factor, specific location effect, $F(3, 96) = 4.45$, $p = 0.005$) with significant variation among groups (interaction term between groups and location, $F(6, 96) = 7.05$, $p < 0.001$). While muscle loss was minimal in non-reproductive females, it was mainly concentrated in the cranial locations (1 & 2). In turn, muscle loss was higher and homogeneous in post-laying females. Finally, within post-brooding females, muscle loss was more pronounced in the caudal locations (Fig. 2).

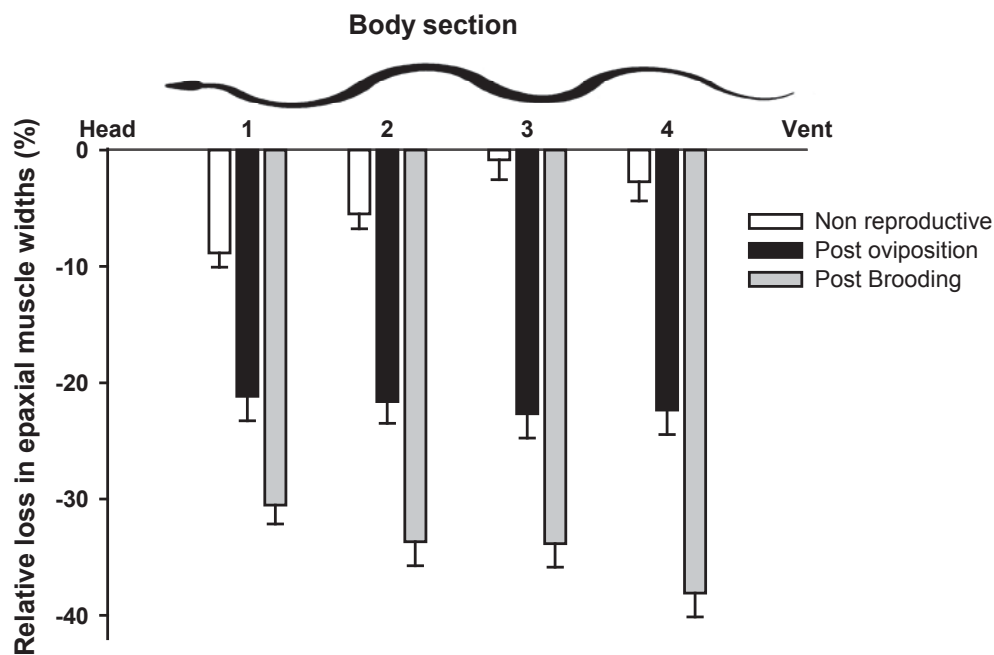


Figure 2. Relative changes in epaxial muscle width (%) at four locations along the body in non-reproductive females, reproductive females after oviposition, and reproductive females after brooding. Error bars represent standard error. See text for detailed statistics.

2) Functional impact of reproduction

The three groups did not differ in their initial traction force (ANOVA, $F(2, 32) = 0.33$, $p = 0.71$). Traction force was best explained combining the positive influences of body size and muscular condition in a multiple regression ($r^2 = 0.41$, $F(2, 32) = 10.97$, $P < 0.0001$, Table 2) while the influence of body condition was not significant ($r^2 = 0.04$, $F(1, 31) = 1.33$, $P < 0.25$). A significant decrease was observed over the fasting period (ANOVA, specific time effect, $F(1, 32) = 135.26$, $p < 0.001$), and the three groups significantly differed in the magnitude of strength reduction (interaction between time and group, ANOVA, $F(2, 32) = 17.71$, $p = 0.002$; Fig.3). Traction force loss was on average -0.67 ± 8.15 ,



-1.82 ± 6.10 and -2.97 ± 8.77 kg respectively for post-brooding, post-laying and non-reproductive females ($F(2, 32) = 19.81$, $p = 0.001$, Tukey *post hoc* test, all p values < 0.001). Traction force change was proximately linked to mean epaxial muscle loss ($r^2 = 0.57$, $F(1, 33) = 42.10$, $P < 0.0001$).

Constriction performances were examined after the fasting period restricting the analysis to non-reproductive and post-laying females. Post-laying females showed significantly lower maximal constriction values: 3.75±1.72 vs. 5.23±1.05 cm, $F(1, 20) = 5.63$, $p = 0.027$). No differences in constriction duration were detected $F(1, 20) = 0.65$, $p = 0.42$) between the two groups.

Table 2. Influences of snout vent length (SVL), body condition (BCI), and musculature condition (MC) on initial traction strength of Children's pythons. MC accounted for most of the variance observed in strength. See text for statistics.

$r = 0.63$; $r^2 = 0.40$; $n = 35$; $F(2,32) = 1131.95$; $p < 0.0001$

Variable	DF	SS	F Ratio	P value
BCI	1	15.10	0.28	0.60
SVL	1	523.21	9.72	0.001
Initial MCI	1	747.25	16.92	< 0.0001



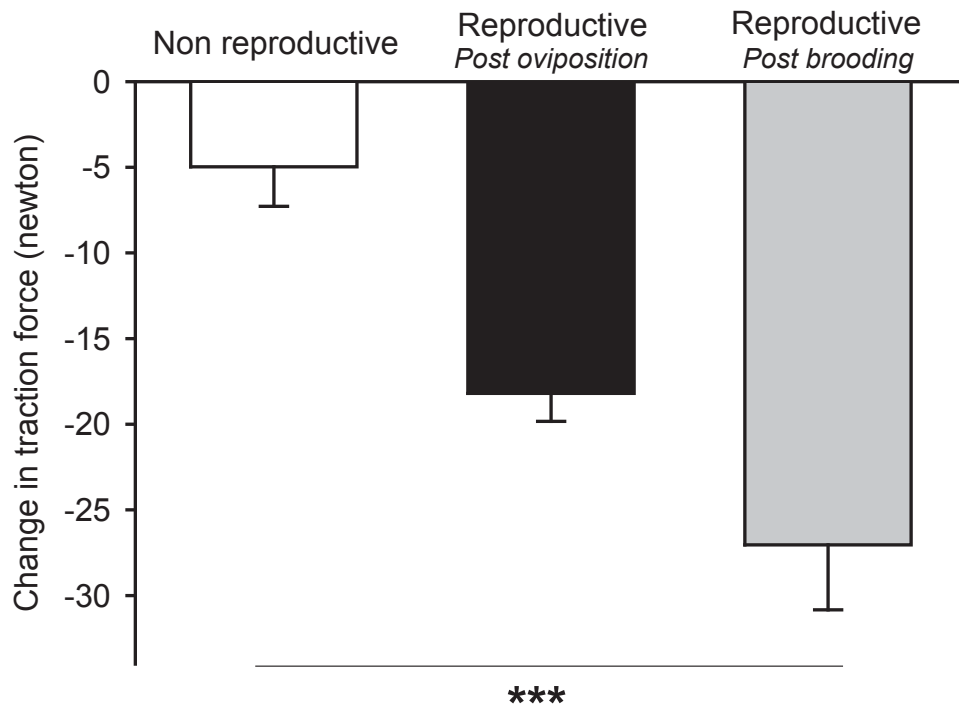


Figure 3. Change in force (Newtons) measured in non-reproductive and reproductive (post-oviposition or post-brooding) female Children's python. Error bars represent standard error. Tukey *post hoc* tests were conducted for 2X2 comparisons (***) $p < 0.001$.

Discussion

Capital breeding provides significant benefits notably when energy requirements are high, resources are scarce, or foraging time is limited during the reproductive season (Jönsson 1997; Bonnet *et al.* 1998; Varpe *et al.* 2009). Nevertheless, current theories predict that reliance on energy storage can be costly either because of i) locomotor impairment (due to storage) or ii) structural and performance costs induced by acute resource mobilization (Senechal *et al.* 2011). To date, structural costs of capital breeding remain largely understudied. Such costs are expected in extreme capital breeders (i.e., species that can successfully reproduce without food intake). Here we provide original evidences that both egg production (i.e., direct allocation) and maternal care (egg brooding) induce muscle catabolism and decrease performance in such a species, the Children's python.

We report a major impact of reproduction in inducing up to a 34% loss in epaxial muscle with when compared to non-reproductive females. This majority of this (64%) occurred during the vitellogenic period, which constitutes the major time of resource allocation in lecithotrophic species. During this period, the reproductive female undergoes major physiological changes and mobilizes body stores to support the synthesis of vitellogenin and yolk deposition into the growing follicles



(Speake *et al.* 2003. Protein break-down is required to provide essential amino acids required for protein synthesis in the liver (Santos *et al.* 2007). Additionally, vitellogenesis and gravidity impose a significant thermoregulatory shift and a metabolic increase (Lourdais *et al.* 2007). Thereby, proteolysis is required to support elevated maintenance costs notably through gluconeogenesis. While our study does not allow us to separate direct allocation from maintenance requirements, the relationship between muscle loss and adjusted clutch mass underlines structural protein mobilization for follicular growth as the primary utilizer of maternal proteins (Santos *et al.* 2007). Interestingly, we found that individuals with higher initial MC allocated proportionally more of their epaxial muscles into reproduction. Such correlation suggests that body muscles, while having specific contractile function, could represent a form of protein “capital” that could be mobilized and allocated for reproduction (quite similarly to fat stores).

All python species show maternal care to their eggs in the form of egg brooding (Somma 2003). While some medium to large species are capable of facultative endothermy through shivering thermogenesis (Hutchinson 1966; Slip & Shine 1988), small species such as the one we studied do not produce significant metabolic heat during brooding. Still, we found that muscle loss during brooding comprised 36% of total muscle loss, and maternal body condition was significantly lower after egg attendance compared to post-laying. Thereby, maintenance requirements while egg brooding further increased proteolysis and epaxial loss. We found that muscle atrophy was not homogenous along the body notably when considering post-brooding females. We detected a progressive increase in epaxial loss from the cranial to the caudal locations. Similar results have been found in another constricting species, the rainbow boa (*Epicrates cenchria maurus*) (Lourdais *et al.* 2004). In turn, muscle loss was homogenous in post-oviposition females suggesting that selective muscle mobilization may be specific to egg brooding and prolonged fasting.

Our performance results clearly underline the impact of structural alteration. Importantly, traction force and epaxial muscle reductions were closely correlated underlying the quality of our estimators. Traction force was reduced in post-reproductive females when compared to non-reproductive ones. Loss in traction force was 50% higher in post-brooding than in post-laying females. Similarly, constriction performance was also affected by reproduction. Maximal constriction strength was lower in post-reproductive females revealing that protein mobilization compromised constriction and thus foraging capabilities. Selective muscle mobilization observed in post-brooding females could be considered adaptive since anterior muscles are presumably critical for defence and prey constriction (Moon 2000).

Our results demonstrate the structural and performance costs induced by reproduction in an extreme capital breeder. The effects we report are likely ecologically relevant and consistent with results obtained in other pythons in the field (Shine 1999a; Beata *et al.* 2011). Ectotherms are unique



for their reduced energy requirements, and pythons can be considered low energy specialists that can endure extended period of fasting. Theoretical models predict that capital breeding can be costly because of significant locomotor impairments induced by storage. Such costs are likely minimal or absent in slow moving and rather elusive predators such as pythons that don't rely on speed to subdue their prey or evade predators. Still, reproduction implies a massive energy allocation toward egg production and care to the developing embryos (egg brooding). Costs of reproduction are high and reproductive frequency is low, since energy stores must be replenished up to a threshold level to reengage reproduction (Madsen & Shine 1999b). Low frequency of reproduction is a particular life history trait that has attracted considerable interest and is usually observed in species showing "accessory" activities associated with reproduction (breeding migrations, egg brooding or live bearing, see Bull & Shine 1979). Our data may provide proximal mechanisms to understand the delayed costs of reproduction. Indeed, protein alteration induced by reproduction likely alters performance in post-reproductive females and induces long-term energy and ecological costs (Bonnet *et al.* 2001). For instance, altered performance will possibly reduce foraging efficiency and thereby the ability to replenish body reserves or generate survival costs by altering the ability to escape from predators.

We provide clear evidence that brooding compromises epaxial muscles and critical performances even in a species that does not allocate energy to heat production. However, it has been shown that non-thermogenic egg brooding can provide alternate thermal benefits (e.g., from altering insulation of the clutch, Stahlschmidt and DeNardo, 2009), as well as hydric benefits (Lourdais *et al.*, 2007; Stahlschmidt *et al.* 2008). Our results are likely applicable to pythons in general, but with some expected variation. Notably, costs of brooding are expected to be higher in species capable of shivering thermogenesis that specifically involves muscle contraction and induces a dramatic metabolic rate increase (Hutchinson *et al.* 1966). Structural and performance costs of brooding may explain maternal behavioral strategies reported in other species. For instance, in the water python, females that select high quality nest oftentimes desert their clutch during the brooding period (Madsen & Shine 1999b). These females are particularly emaciated and their body condition likely reflects altered musculature. Desertion behavior could be related to critical levels of protein mobilization (phase III) associated with fasting similar to egg abandonment in birds (Robin *et al.* 2001; Spee *et al.* 2010).

Our study gives an original insight and points out the high demand on proteins for reproduction. In capital breeders, fat mobilization supports lipid and energy demands of reproduction and do not impact female function (in fact, reduced fat oftentimes increases performance). Similar results were found in a viviparous boid (Lourdais *et al.* 2004), during pregnancy (i.e. another form of



maternal care). Muscles appears to be a critical resource tissue that differs from adipocytes in that muscle cells have a specific contractile function that is compromised to support reproduction.

Acknowledgements

We thank Jean Pierre Vacher for helpful comments on the manuscript. Financial support was provided by Arizona State University and the CNRS. OL was supported by a MayTag post-doctoral Fellowship. Benjamin Reiser helped during snake measurements.



Modifications structurales et physiologiques associées à la gestation chez un
reproducteur sur capital : la vipère aspic (*Vipera aspis*)

Sophie LORIOUX^{1,2}, Dale DENARDO³, Olivier CHASTEL¹ et Olivier LOURDAIS^{1,3}.

¹ Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS UPR 1934, 79360 Villiers en Bois, France

² Université de Poitiers, 40 Avenue du recteur Pineau 85022 Poitiers, France

³ School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

Correspondance :

Sophie Lorigoux, CEBC-CNRS UPR 1934

79360 Villers en Bois, FRANCE

Phone: +33 (0) 5 49 09 35 52

Fax: + 33 (0) 5 49 09 65 26

E-mail: lorioux@cebc.cnrs.fr

Tables: 1

Figures: 6

For consideration in:

INTRODUCTION

Chez les vertébrés vivipares, la gestation représente une période extrêmement coûteuse en énergie pour les femelles (Clutton-Brock 1991; Schultz *et al.* 2008) car le développement des embryons nécessite généralement des apports constants en oxygène, en nutriments et en eau. La demande énergétique élevée associée à la reproduction induit souvent une balance énergétique négative pour



les femelles, qui vont mobiliser de leurs propres tissus afin de terminer la reproduction (Oftedal 1993 ; Crocker *et al.* 1998 ; Schwilch *et al.* 2002). Ces contraintes sont notamment pertinentes dans le cas d'espèces vivipares dont l'engagement dans la reproduction se fait après accumulation de réserves énergétiques (« capital breeder » ; e.g. Jönsson 1997 ; Bonnet *et al.* 1998 ; Bonnet *et al.* 1999 ; Bonnet *et al.* 2001a ; Lourdais *et al.* 2002a). Les reptiles Squamates sont majoritairement lécithotrophes et l'investissement initial en énergie se fait via le dépôt de réserves vitellines dans les œufs (Speake and Thompson 2000 ; Stewart and Thompson 2000). La gestation ne constitue donc pas une phase d'allocation de l'énergie dans les œufs mais une étape majeure de régulation des conditions de développement.

La gestation engendre des modifications physiologiques et comportementales extrêmement importantes chez les squamates vivipares. On observe des modifications comportementales, avec un déplacement des préférences thermiques chez de nombreuses espèces (Gregory *et al.* 1999 ; Brown and Weatherhead 2000 ; Lourdais *et al.* 2008) et une nette augmentation des activités de thermorégulation (Shine 2006 ; Le Galliard *et al.* 2003a). L'accroissement des activités de thermorégulation contribue à augmenter le métabolisme (Angilletta and Sears 2000 ; Ladyman *et al.* 2003), notamment chez les espèces qui sélectionnent des températures plus élevées (serpents). En outre, la gestation est souvent associée à une réduction, voire une absence de la prise alimentaire, conduisant les femelles à mener l'intégralité de la gestation à partir de leurs réserves corporelles (Shine 1980 ; Ross and Marzec 1990 ; Lourdais *et al.* 2002a). Une balance énergétique négative génère un catabolisme et peut induire des modifications structurales importantes (Lourdais *et al.* 2004a), ainsi qu'une altération des performances après la reproduction. Il convient de souligner que la gestation s'opère après la phase de mobilisation des réserves pour la vitellogénèse. La gestation vient donc rajouter des contraintes énergétiques à des individus déjà fortement mobilisés en terme physiologique.

D'un point de vue écologique, l'exposition accrue associée à la gestation est susceptible d'augmenter les risques de prédation, couplée à charge physique des embryons qui altère les capacités locomotrices des femelles (Bauwens and Thoen 1980 ; Shine 1980 ; Lima and Dill 1989 ; Brown and Shine 2004 ; Le Galliard *et al.* 2003a ; Shine 2003). Pourtant, la thermorégulation est une étape essentielle pour optimiser la qualité du développement et donc le succès reproducteur. Dans ce contexte, les mécanismes allostasiques (réponse au stress) semblent primordiaux dans l'ajustement des compromis et le maintien d'un comportement maternel (thermorégulation) face aux risques de prédation. Ainsi, la corticostérone agit dans les processus de régulation parentale en intervenant comme médiateur de la réponse au stress : face à un événement ou un état stressant, une réponse au stress atténuée permettrait de maintenir un effort parental important (Ricklefs and Wikelski 2002 ; Wingfield and Sapolsky 2003 ; Lendvai *et al.* 2006). La plupart des reptiles répondent



à des éléments stressant en augmentant leurs niveaux de corticostérone plasmatique (Guillette *et al.* 1995 ; Tyrell and Cree 1998). Cependant, de fortes variations dans la modulation adrénocorticale semblent exister (Moore and Jessop 2003).

Outre la régulation des conditions thermiques, la femelle doit également assurer l'approvisionnement en eau des embryons qui peut être très important (jusqu'à 200% du volume). La prise en eau des embryons s'effectue notamment durant la fin de la gestation (Dauphin-Villemant and Xavier 1986 ; Mathies and Andrews 1996), témoignant de besoins hydriques importants durant cette phase. En parallèle, la thermorégulation accrue devrait aussi être à l'origine d'une augmentation conséquente des pertes hydriques. Cependant, très peu d'études se sont penchées sur l'influence de la gestation sur la balance hydrique des femelles. L'étude des osmolites plasmatiques peut fournir un bon indice de déshydratation des femelles au cours de la gestation. L'osmolalité plasmatique est proportionnelle au nombre total d'ions et de particules non dissociés présents dans le sang. En cas de déshydratation, l'osmolalité augmente. La régulation de l'osmolalité est un paramètre important de la physiologie (Bradshaw 1997; Davis and DeNardo 2007) et implique des mécanismes endocrines avec notamment l'action de l'ADH (hormone anti-diurétique) ou encore la corticostérone. Le stress physiologique induit par la déshydratation peut avoir des conséquences profondes sur les individus (Bradshaw 1986). Ainsi, on peut prédire un impact marqué en période de reproduction (gestation) où les besoins hydriques sont accentués. Pourtant ces aspects demeurent encore sous étudiés.

Une approche intégrée semble donc essentielle pour considérer ces différents aspects en combinant des suivis morphométriques et hormonaux afin de mieux comprendre les différentes contraintes et le «stress» maternel (énergétiques, hydriques et écologiques). Cependant, peu d'études ont évalué la dynamique des modifications liées à la reproduction au cours de la gestation chez ces organismes (Olsson *et al.* 2001 ; Le Galliard *et al.* 2003a). En outre, si les soubassements hormonaux associés à la gestation ont été largement étudiés, des suivis longitudinaux sur des mêmes individus ont rarement été menés. Il s'agit pourtant d'un point essentiel pour une mesure fine des facteurs de «stress». Les mécanismes hormonaux apparaissent importants car ils peuvent permettre de comprendre la façon dont les organismes répondent aux variations de l'environnement (Wingfield *et al.* 1998 ; Chastel *et al.* 1995 ; Landys *et al.* 2006). Notamment, la corticostérone a une action pléiotrope, puisqu'elle est à la fois impliquée dans les processus énergétiques exprimant la quantité d'énergie disponible vs. la demande énergétique (Cherel *et al.* 1988 ; Lormée *et al.* 2003 ; Chastel *et al.* 2005), mais également dans le maintien de l'expression des soins parentaux, et la régulation osmotique (Bentley 2002; Bradshaw 1997; Dauphin-Villemant et Xavier 1986). En parallèle, chez les espèces vivipares, la gestation semble également liée à des modifications des taux de progestérone



chez les femelles (Naulleau and Fleury 1990 ; Bonnet *et al.* 2001b ; Holmes and Cree 2006). Dans ce contexte, le but de cette étude est :

- i) Evaluer l'évolution des modifications structurales (masse, musculature) chez les femelles reproductrices, et leurs conséquences sur les performances.
- ii) En parallèle, nous nous sommes intéressés à l'évolution des modifications hormonales tout au long de la gestation, en mesurant les taux de corticostérone (taux basaux et les taux exprimés après un stress standardisé) et de progestérone plasmatiques chez des femelles reproductrices et non-reproductrices.
- iii) Evaluer dans quelle mesure la gestation génère des contraintes hydriques maternelles du fait d'un conflit potentiel entre la thermorégulation et l'approvisionnement en eau des embryons.

MATERIEL ET METHODES

Espèce

La vipère aspic, *Vipera aspis* est un serpent venimeux de petite taille (environ 55 cm), à répartition médio-européenne. Chez cette espèce, les femelles sont typiquement des reproductrices sur capital et accumulent des ressources sur de longues périodes avant de s'engager dans la reproduction (Naulleau and Bonnet 1996 ; Jönsson 1997 ; Bonnet *et al.* 1998 ; Lourdaïs *et al.* 2002b). Cette stratégie de reproduction génère une faible fréquence des épisodes reproducteurs. Durant la gestation, les femelles ont des coûts énergétiques importants (Bonnet *et al.* 1999; Bonnet *et al.* 2002) et sont extrêmement émaciées après la mise-bas. La gestation est associée à un changement dans les préférences thermiques avec une augmentation des activités de thermorégulation (Saint Girons 1952; Naulleau 1979; Ladyman *et al.* 2003). Ces changements sont également associés à une diminution des déplacements et de la prise alimentaire (Naulleau *et al.* 1996 ; Lourdaïs *et al.* 2002a).

Reproduction

Nous avons utilisé une colonie captive de *V. aspis*. Après un hivernage artificiel de deux mois à 8°C, réalisé dans des enceintes climatiques (Vötsch Industrietechnik, Balingen, Allemagne), 30 mâles et 30 femelles ont été transférés dans des cages expérimentales. Ces cages (1m x 0.75m x 0.40m) sont constituées en contre-plaqué marine et une façade en verre. Un grand abri (demi-cylindre en PVC, percé de deux trous) est disposé du côté non-chauffé. Une ampoule de 75W située sur la paroi opposée, à 10cm de hauteur, permet de créer un gradient thermique (18-42°C) à l'intérieur de chaque dispositif expérimental. La température de la pièce était maintenue à 18°C. Deux ramequins étaient régulièrement approvisionnés en eau. Les accouplements ont été provoqués en plaçant deux



mâles avec deux femelles dans chaque cage. Les femelles ne changeaient pas de cage mais chaque jour, les mâles étaient déplacés dans une nouvelle cage, la moitié des mâles étant transférée selon le sens croissant des numéros de cage et l'autre moitié selon le sens décroissant des numéros de cages, ceci pour éviter les mêmes associations de mâles. Après 4 semaines d'accouplements, les mâles ont été retirés du système. Onze femelles se sont engagées en vitellogénèse sur les 19. L'engagement dans la reproduction a été détecté par palpation manuelle des follicules et confirmé par échographie (Sonosite MicroMaxx, Inc., Bothell, WA, USA).

Suivi du développement embryonnaire

Afin de distinguer les stades majeurs du développement embryonnaire, un suivi échographique régulier a été réalisé sur les femelles reproductrices. à l'aide des tables de développement de *V. aspis* (Hubert and Dufaure 1968) et en estimant la taille des embryons, leur forme générale, et la quantité de vitellus résiduel. Nous avons ainsi divisé la reproduction en 4 «étapes» durant lesquelles les mesures décrites ci-dessous ont été réalisées. Une cinquième session de mesure a été réalisée en post mise bas pour les femelles reproductrices, dans le cas des mesures physiologiques.

Variables considérées:

i) Modifications structurales et performances

Une mesure initiale de la longueur museau-cloaque (SVL) ainsi qu'une mesure de la masse corporelle ont été réalisées en sortie d'hivernage. Ceci nous a permis de calculer la condition corporelle initiale des femelles (résidus de la régression du logarithme de la masse corporelle sur le logarithme de la taille corporelle), avant l'engagement dans la reproduction. L'ensemble des femelles a ensuite été pesé au cours de la gestation, durant les 4 périodes décrites précédemment.

Les muscles épaxiaux (Lourdais *et al.* 2005) constituent un moyen simple d'estimation de la condition musculaire mais sont difficilement détectables en région dorsale sur cette espèce. Nous avons choisi d'utiliser comme estimateur musculaire, la mesure de l'épaisseur de queue. En effet un amaigrissement de cette zone est particulièrement visible, notamment chez les femelles post-reproductrices (S.L, O.L., Observations personnelles). Afin de s'assurer que la mesure a toujours été réalisée au même endroit, un marquage au cautère (Vervust and Van Damme 2009) sous forme de tatouage a été effectué sur chaque femelle avec un repère fixe. La largeur de cette section a été mesurée avec un spessimètre (comparateur d'épaisseur Absolute Digimatic Mitutoyo, Japon). Trois mesures consécutives ont été effectuées afin d'obtenir une évaluation moyenne.



Les performances ont été évaluées en mesurant la capacité à échapper aux prédateurs. Pour cela, nous avons mesuré la force de traction des femelles au cours de la gestation, à l'aide d'un dynamomètre (Force Gauge 200N, Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). Les femelles étaient placées en enceintes climatiques (LMS LDT, Sevenoaks, Kent, United Kingdom; stability $\pm 1^{\circ}\text{C}$) 1 heure à 25°C afin de standardiser les températures corporelles. Les animaux étaient placés dans un tube en PVC transparent (quart antérieur du corps). Cette section était maintenue fermement par l'un des opérateurs. La base du cloaque était ensuite reliée à l'appareil de mesure. Avant le début de chaque série de mesures, le corps de l'animal était tendu, la queue maintenue et le dynamomètre remis à zéro. Dès le début de l'essai, la queue de l'animal était alors relâchée, et l'animal stimulé par des palpations légères sur le dos. Chaque essai durait 30 secondes, et était répété trois fois de suite. Entre chaque essai, l'animal était détendu pendant 10 secondes. Lors des analyses, nous avons considéré la valeur maximale obtenue pour l'ensemble des trois essais, ainsi que la valeur moyenne.

ii) Modifications physiologiques pendant la gestation

Prises de sang et protocole de réponse au stress

Notre objectif était notamment de mesurer les taux de base et après un stress. Nous avons mis en place un protocole spécifique. L'individu est rapidement sorti de la cage expérimentale à l'aide d'une pince. Dès la capture, le chronomètre est démarré afin de s'assurer que la première prise de sang soit effectuée dans les 3 minutes, et reflète bien le taux de corticostérone basal (Romero and Reed 2005). Une mesure de température corporelle est également effectuée à l'aide d'un thermomètre infrarouge. Le premier quart du corps de l'animal est ensuite bloqué dans un tube transparent, et l'animal placé sur le dos et le corps tendu. La prise de sang est alors réalisée en intra-cardiaque à l'aide d'une seringue de faible diamètre (microlance 3G). La dose de sang prélevé varie de 200 à $250\mu\text{L}$ de sang, en fonction de la condition de l'animal. Une fois la prise de sang effectuée, le chronomètre est stoppé et le temps de prise de sang consigné.

Afin de générer une situation de stress, l'animal a ensuite été placé pendant une heure dans une boîte transparente à 25°C dans une enceinte climatique (Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany). Au bout d'une heure, l'individu est récupéré et une deuxième prise de sang est effectuée selon le protocole précédent. La quantité de sang prélevée est légèrement inférieure ($150\mu\text{L}$). L'animal est ensuite replacé dans sa cage.

Les échantillons récoltés sont ensuite centrifugés à 3000 tours/min pendant 5 minutes. Enfin, le plasma a été séparé du culot, placé dans un eppendorf, et mis au congélateur à -28°C .



Dosage de la corticostérone

Les dosages de corticostérone ont été réalisés par la technique du dosage radioimmunologique (RIA) au Centre d'Etudes Biologiques de Chizé. La corticostérone plasmatique totale a été mesurée dans des échantillons de 50µL, après une extraction dans l'éther par RIA, en utilisant un anti-sérum du commerce, obtenu sur des lapins, contre le sérum de corticostérone 3-(Ocarboxy-methyl) oxime de bovin conjugué à de l'albumine (Biogenesis, UK). Les duplicats d'échantillons (100µL) des extraits ont été mis à incuber toute la nuit à 4°C avec 8000 CPM (coups par minute) de H3-corticostérone (Amersham Pharmacia Biotech, France). Les fractions liées et libres de la corticostérone ont été séparées en ajoutant du charbon dextran. Après centrifugation, la fraction liée a été comptée dans un compteur à liquide scintillant.

Dosage de la progestérone

Les dosages ont été réalisés au centre d'Etudes Biologiques de Chizé. Les stéroïdes ont été extraits en ajoutant 3ml de diéthyl-éther à 50 µL de plasma, et mélangés par un passage au vortex. La phase de diéther a été décantée et vidée après congélation instantanée du tube dans un bain d'alcool à -40°C. La partie restante a ensuite été évaporée. L'efficacité d'extraction été obtenue en ajoutant 1000 CPM (coups par minute) de ³H-progestérone dans les échantillons. Les récupérations étaient supérieures à 90%. L'extrait sec a été re-dissous dans 300µL de tampon phosphate et incubé pendant la nuit à 4°C avec 7000 CPM de ³H-progestérone (Perkin Elmer, US) et de l'antisérum polyclonal de lapin contre la progestérone-11-HS-BSA (Paris, France). Les fractions liées et libres ont été séparées en ajoutant du charbon dextran. Après centrifugation, l'activité des fractions liées a été comptée avec un compteur à liquide scintillant Tri-carb 1600TR (Packard). Les réactions croisées avec les antisérums de progestérone étaient les suivantes : deoxycorticostérone (3%), 6β-hydroprogestérone (1.8%), 5α-dihydroprogestérone (1.6%), 20α-dihydroprogestérone (0.5%), corticostérone (0.3%), pregnanédione (0.2%), Δ5-pregnenolone (0.07%), testostérone (0.03%), 17α-hydroprogestérone (0.02%), estradiol (< 0.02%), cortisol (< 0.01%), aldostérone (< 0.01%). La plus basse concentration détectable était de 0.46 ng/mL.

iii) Dosage des osmolites plasmatiques

Les mesures ont été réalisées en triplicats de 10µl à l'Arizona State University. Les données sont en cours d'acquisition.

Analyses statistiques



Les analyses ont été conduites avec le logiciel R (version 2.12.1 Development Core Team 2010). Nous avons utilisé des ANOVAs à mesures répétées, afin de prendre en compte l'évolution des paramètres mesurés sur les mêmes animaux. Pour cela, l'identité de la femelle a été traitée en facteur aléatoire, et les effets statut reproducteur et session en facteurs fixes (modèles lme, package nlme). Les données des taux d'hormones (corticotérostérone), ont été transformées en log, afin de répondre aux conditions de normalité. Les comparaisons 2 à 2 ont été réalisées en utilisant des tests *post hoc* de Tukey (package multcomp). Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne $\pm$ erreur standard. La significativité des tests a été déterminée à un seuil $\alpha = 0.05$.

RESULTATS

I) Impacts structuraux de la gestation et performances

Evolution de la masse corporelle

L'évolution de la masse corporelle n'est pas influencée par le statut reproducteur mais par la session et l'interaction des deux termes (Table 1 ; Fig.1). La masse corporelle est stable au cours du temps chez les femelles reproductrices (test *post hoc* de Tukey, $P > 0.05$ pour toutes les comparaisons 2 à 2), alors que les femelles non reproductrices ont perdu en moyenne 25.8 grammes, durant l'expérience, mais sans différences significatives entre les sessions (test *post hoc* de Tukey, $P > 0.05$ pour toutes les comparaisons 2 à 2).

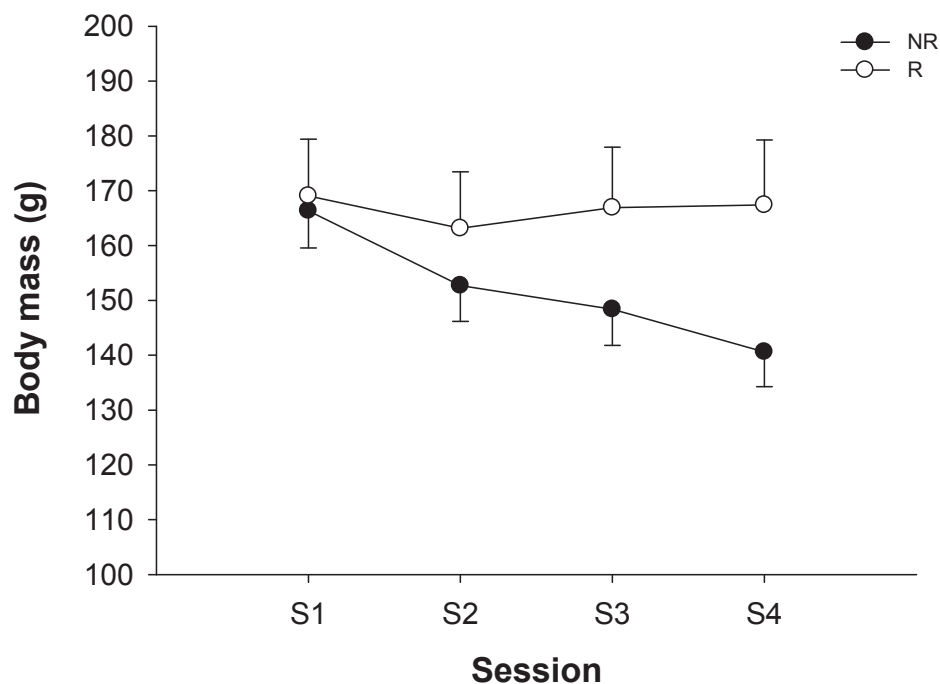


Figure 1. Evolution de la masse corporelle en fonction du statut reproducteur et de la session. Les femelles reproductrices sont représentées par des cercles blancs, et les femelles non-reproductrices par des cercles noirs. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards.



Table 1. Termes des modèles utilisés pour évaluer les coûts de la reproduction chez *V. aspis*. d.l.: Degrés de liberté; SS: Somme des carrés.

Traits	Factors	dl	SS	F-ratio	P-value
BODY MASS (g)	Reproductive status (A)	1	35	0.888	0.352
	Session (B)	3	105	57.115	< 0.001
	A*B	3	105	11.500	< 0.001
MAXIMAL TRACTION (kg)	Reproductive status (A)	1	34	96.674	< 0.001
	Session (B)	3	89	3.481	0.019
	Body mass (C)	1	89	7.979	0.006
	A*B	3	89	5.671	0.001
	A*C	1	89	4.065	0.047
	B*C	3	89	1.494	0.222
	A*B*C	3	89	0.106	0.956
MEAN TRACTION (kg)	Reproductive status (A)	1	34	69.565	< 0.001
	Session (B)	3	89	2.218	0.092
	Body mass (C)	1	89	8.049	0.006
	A*B	3	89	4.817	0.004
	A*C	1	89	4.340	0.040
	B*C	3	89	0.433	0.730
	A*B*C	3	89	0.798	0.499
TAIL WIDTH (mm)	Reproductive status (A)	1	33	15.7	< 0.001
	Session (B)	3	96	106.849	< 0.001
	Initial body condition (C)	1	33	13.567	< 0.001
	A*B	3	102	3.063	0.035
	B*C	1	33	0.329	0.778
	A*B*C	3	96	0.695	0.557

Evolution de la perte musculaire

L'épaisseur de queue est influencée par le statut reproducteur, la session et l'interaction des deux termes (Table 1 ; Fig.2). Chez les femelles reproductrices, l'épaisseur de queue n'est pas influencée par la taille de portée ($r^2 = -0.26$, $P = 0.212$). En considérant la perte d'épaisseur de queue relative (i.e. la différence entre la mesure initiale et les mesures réalisées en sessions 2, 3 et 4, nous n'observons pas d'effet significatif du statut reproducteur ($F_{1,29} = 0.680$, $P = 0.416$), mais un effet de la session ($F_{2,54} = 63.807$, $P < 0.001$), de la mesure initiale ($F_{1,29} = 9.843$, $P = 0.004$), et un effet de l'interaction du statut et de la session ($F_{2,54} = 4.866$, $P = 0.011$).



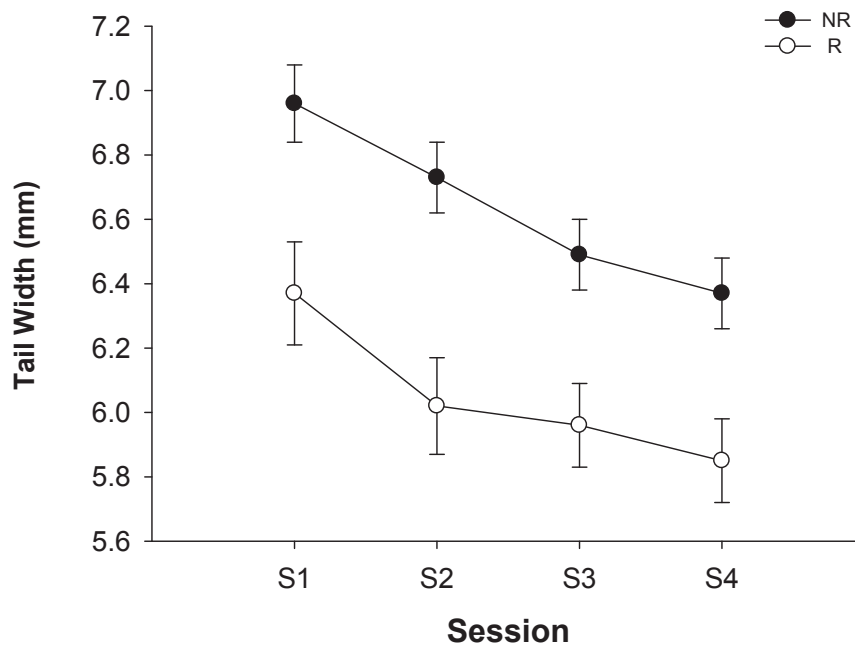


Figure 2. Evolution de l'épaisseur de la queue en fonction du statut reproducteur et de la session. Les femelles reproductrices sont représentées par des cercles blancs, et les femelles non-reproductrices par des cercles noirs. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards.

Force de traction

La force maximale de traction est influencée par le statut reproducteur, la session, la masse corporelle, ainsi que l'interaction du statut et de la session et du statut et de la masse corporelle (Table1 ; Fig.3). Chez les femelles reproductrices, la force maximale de traction était négativement corrélée à la taille de portée ($r^2 = -0.53$, $P = 0.003$).



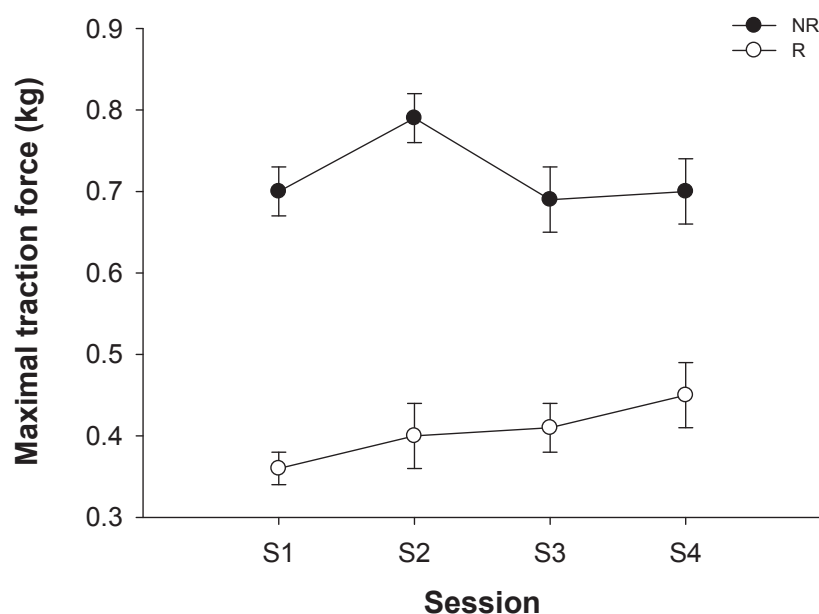


Figure 3. Evolution de la force maximale de traction (kg) en fonction du statut reproducteur et de la session. Les femelles reproductrices sont représentées par des cercles blancs, et les femelles non-reproductrices par des cercles noirs. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards.

La force moyenne de traction pour l'ensemble des trois essais était également influencée par le statut reproducteur, la masse corporelle, et l'interaction du statut reproducteur et de la session, ainsi que l'interaction du statut reproducteur et de la masse (Table 1).

Chez les femelles reproductrices, la force moyenne était négativement corrélée à la taille de portée ($r^2 = -0.48$, $P = 0.002$).

II) Modifications physiologiques liées à la gestation

Corticostérone

Le taux basal de corticostérone (CORT) est influencé par le statut reproducteur ($F_{1,32} = 7.842$, $P = 0.009$). Il n'était pas influencé par la session ($F_{3,91} = 4.959$, $P = 0.559$), mais par l'interaction du statut reproducteur et de la session ($F_{3,91} = 4.959$, $P = 0.003$; Fig.4). Les taux basaux diffèrent entre les statuts pour les sessions 3 et 4 (tests *post hoc* de Tukey, respectivement, $P = 0.022$ et $P = 0.040$), avec des taux plus élevés pour les femelles reproductrices (Fig. 4). Le taux basal des femelles post-reproductrices n'était pas différent des taux des femelles reproductrices, quelque soit la session considérée (test *post hoc* de Tukey, S5 vs. all, $P > 0.05$), avec une moyenne de 26.15 ± 5.91 ng/ml.



Les taux basaux de corticostérone ne sont pas liés à la taille de portée ($r^2 = -0.139$, $P = 0.855$).

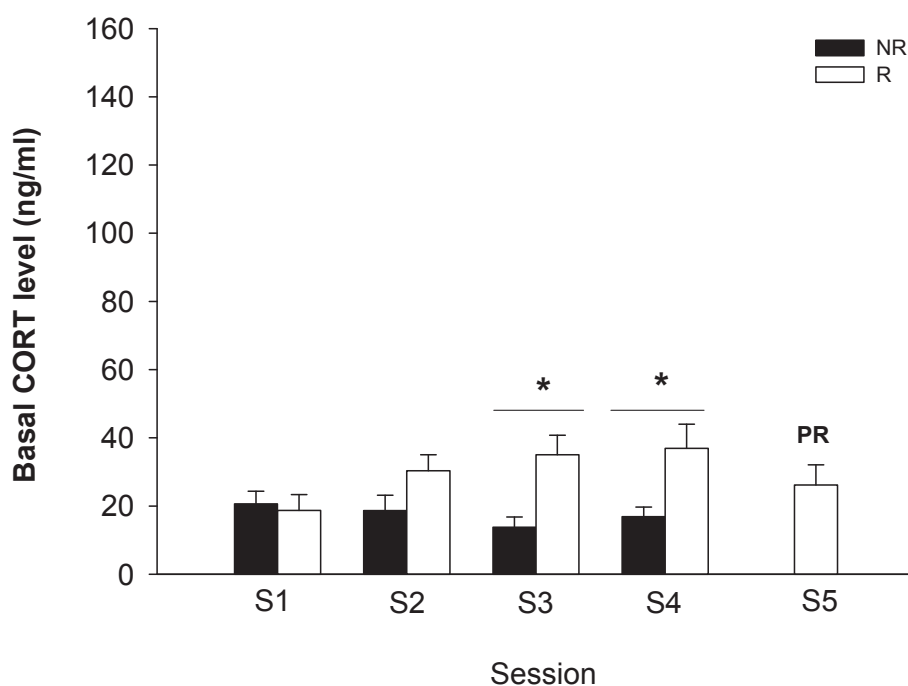


Figure 4. Evolution du taux basal de corticostérone en fonction du statut reproducteur et du temps. La session 5 correspond à la mesure réalisée pour les femelles reproductrices en post mise-bas (PR). Les femelles reproductrices sont représentées par des barres blanches, et les non-reproductrices par des barres noires. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards. *, $P < 0.05$.



Pour la réponse au stress, les taux de corticostérone sont influencés par le statut reproducteur ($F_{1,32} = 5.072$, $P = 0.031$). Nous n'avons pas trouvé d'effet session ($F_{3,90} = 2.313$, $P = 0.081$), mais un effet de l'interaction du statut reproducteur et de la session ($F_{3,90} = 4.114$, $P = 0.009$). Les taux diffèrent entre les statuts pour les sessions 3 et 4 (tests *post hoc* de Tukey, respectivement, $p = 0.033$ et $P = 0.004$), avec des taux supérieurs pour les femelles reproductrices (Fig. 5). La réponse au stress des femelles post-reproductrices est significativement plus basse après la mise (test *Post hoc* de Tukey, S5 vs. S4, $p = 0.008$; toutes les autres comparaisons avec S5, $P > 0.05$), avec une moyenne de 80.45 ± 11.98 ng/ml).

Concernant les femelles reproductrices, la réponse au stress n'était pas influencée par la taille de portée ($r^2 = 0.193$, $P = 0.110$).

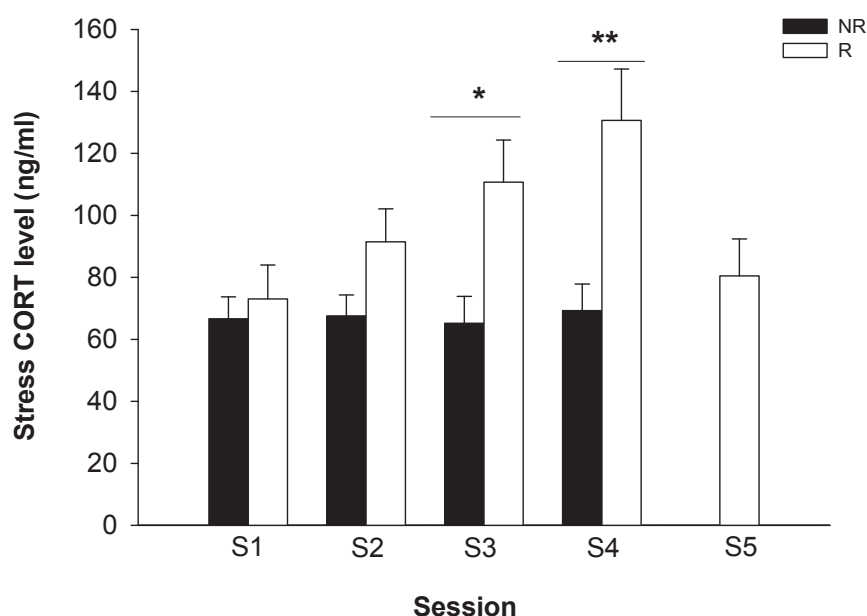


Figure 5. Evolution de la réponse au stress de corticostérone en fonction du statut reproducteur et du temps. La session 5 correspond à la mesure réalisée pour les femelles reproductrices en post mise-bas (PR). Les femelles reproductrices sont représentées par des barres blanches, et les non-reproductrices par des barres noires. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Progestérone

Le taux de progestérone est influencé par le statut reproducteur ($F_{1,29} = 73.540$, $P < 0.001$), la session ($F_{3,69} = 14.090$, $P < 0.001$) et par l'interaction des deux ($F_{3,69} = 17.758$, $P < 0.001$; Fig.6). Ce taux restait bas et stable au cours du temps chez les femelles non-reproductrices (tests *post hoc* de Tukey, $P >$



0.05). Chez les femelles reproductrices, ce taux atteignait un maximum en session 2 et s'effondrait en post mise-bas (tests post hoc de Tukey, S2 vs. les autres sessions, $P < 0.001$; S5 vs. S1, $P < 0.001$ et S5 vs. S3, $P = 0.02$; toutes les autres comparaisons, $P > 0.05$). Le taux de progestérone n'est pas corrélé à la taille de portée ($r^2 = -0.08$, $P = 0.644$).

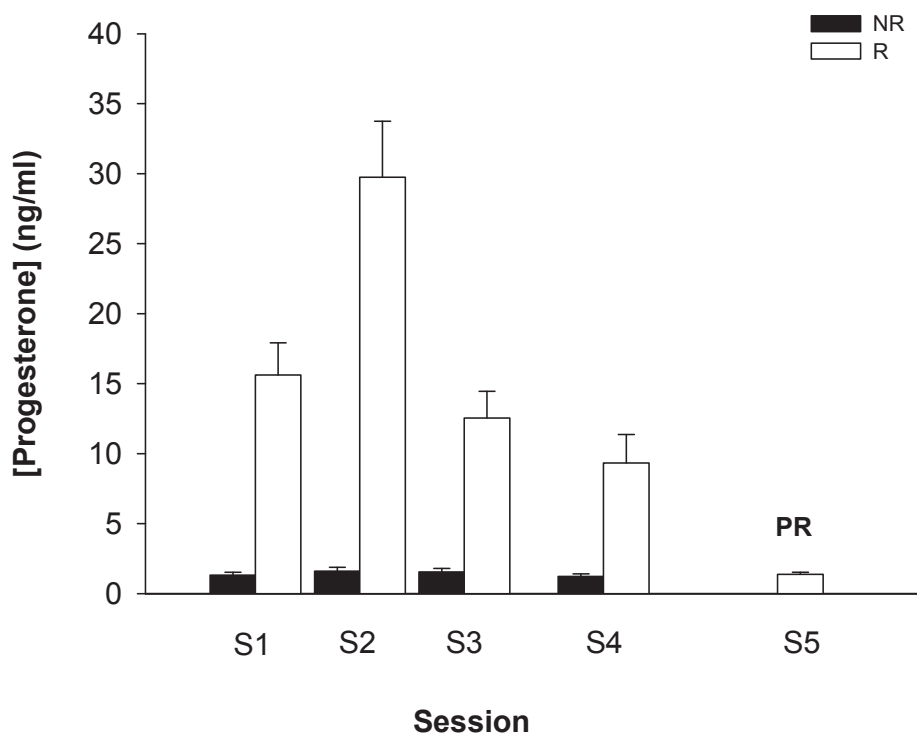


Fig.6. Evolution des taux de progestérone plasmatique en fonction du statut reproducteur et de la session. La session 5 représente la mesure réalisée pour les femelles reproductrices en post mise-bas (PR). Les femelles reproductrices sont représentées par les barres blanches, et les non-reproductrices, par les barres noires. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards.



DISCUSSION

La gestation induit de profondes modifications physiques et physiologiques chez les individus. Notamment un jeûne prolongé induit une mobilisation lipidique et protéique (Cherel *et al.* 1988, 1992 ; Cherel and Grocolas 1999). Nous avons mis en évidence une évolution des modifications structurales et des performances chez une espèce à reproduction sur capital. La gestation est une étape contraignante et les femelles de *V. aspis* sont extrêmement émaciées après la reproduction, et le taux de mortalité post mise-bas est relativement important (Bonnet *et al.* 1999 ; Bonnet *et al.* 2002; Lourdais *et al.* 2002a). Tandis que les études sur les modifications liées à la reproduction chez les Squamates sont nombreuses (Shine 1980 ; Bonnet and Naulleau 1996 ; Madsen and Shine 1994), cette étude apporte une contribution directe sur leur dynamique au cours de la gestation.

Evolution des coûts structuraux et des performances

Le suivi de la masse corporelle au cours du temps indique une diminution d'environ 15% chez les femelles non-reproductrices, lié au jeûne prolongé. Au contraire, cette diminution n'était pas apparente chez les femelles reproductrices, ce qui est probablement liée à une évolution concomitante de la perte de masse liée à des contraintes énergétiques, et une prise volumique des embryons en développement. La masse corporelle est donc un mauvais indicateur de la contrainte énergétique liée à la gestation.

L'évaluation de la perte musculaire (épaisseur de queue) traduit une nette diminution au cours de la gestation, aussi bien pour les femelles gestantes que pour les femelles non-reproductrices. Un tel effet avait déjà reporté chez le Boa arc-en-ciel, *Epicrates maurus*, (Lourdais *et al.* 2004a), avec une protéolyse importante associée à la gestation. Plus particulièrement, nous observons que dès l'ovulation (session 1), la différence de condition musculaire est déjà bien marquée entre les statuts. Ainsi, la condition musculaire initiale des femelles reproductrices, est équivalente à celle des femelles non-reproductrices en fin d'expérimentation (après plusieurs mois de jeûne). L'investissement initial dans la formation des œufs semble donc mobiliser une quantité importante de protéines musculaires (Santos *et al.* 2007). Cependant, la dynamique de la perte musculaire semble équivalente pour les femelles reproductrices et non-reproductrices et pourrait traduire l'état de jeûne prolongé des deux groupes.

En parallèle, nous observons que la force de traction est bien plus faible chez les femelles reproductrices, en comparaison aux femelles non-reproductrices. Cependant, de manière surprenante, nous n'observons pas de modifications au cours du temps, quelque soit le statut reproducteur. Par ailleurs, les légères variations observées pourraient refléter des variations de



motivation des individus. La force de traction est également fortement influencée par la masse corporelle des individus. Nous avons démontré que cette capacité musculaire était fortement impactée par la taille de portée chez les femelles reproductrices. Ceci pourrait refléter un coût important lié à la charge physique des embryons. En effet, de nombreuses études ont démontré des altérations locomotrices chez les femelles reproductrices (Shine 1980 ; Bauwens and Thoen 1981 ; Miles *et al.* 2000 ; Le Galliard *et al.* 2003a). Ces deux paramètres témoignent ainsi des altérations des performances liées à la charge physique des embryons, et sont susceptibles d'augmenter les risques de prédation associés à une exposition accrue en thermorégulation.

Evolution des modifications physiologiques au cours de la gestation

L'axe hypothalamo-adréno-pituitaire (HPA) contrôle la production de corticostérone et module les réponses physiologiques et comportementales des animaux face à un événement stressant (Sapolsky 1992). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'évolution des taux basaux de corticostérone, et de la réponse allostasique face à un élément stresser, à différents stades de la gestation. Chez les femelles non-reproductrices, les taux de corticostérone n'évoluent pas selon les sessions (en taux basaux et réponse au stress). Au contraire, nous avons pu observer une augmentation progressive à la fois des taux basaux et de la réponse au stress chez les femelles reproductrices. Plusieurs études ont reporté une relation positive entre la corticostérone et la reproduction chez des reptiles et des amphibiens, avec dans certains cas une augmentation assez prononcée des taux basaux de corticostérone qui coïncideraient avec des comportements reproducteurs énergétiquement coûteux (Cree *et al.* 2003 ; Moore and Jessop 2003). Ainsi de nombreuses espèces ont des taux basaux de corticostérone plus élevés durant la saison de reproduction (Wilson and Wingfield 1992 ; Tyrell and Cree 1998 ; Moore *et al.* 2001). Au contraire, d'autres études démontrent une absence d'élévation des taux basaux liés à la reproduction (Guillette *et al.* 1997 ; Tokarz *et al.* 1998 ; Ott *et al.* 2000). Ainsi l'évolution des taux basaux que nous observons pourrait suggérer une augmentation des contraintes énergétiques des femelles en relation avec une thermorégulation accentuée. Cependant, le fait que l'augmentation soit progressive et que peu de temps après la mise-bas les taux reviennent à un niveau équivalent à celui de début de gestation suggèrent l'existence d'autres pistes.

En parallèle, nous avons obtenu le même patron de variation pour la réponse au stress. Chez de nombreuses espèces, la reproduction est également associée à une diminution de la réponse adrénocorticale. Cette atténuation de la réponse au stress est généralement associée au maintien de l'expression des soins parentaux (Wingfield and Sapolsky 2003 ; Lendvai *et al.* 2007). Ceci est également observé chez les reptiles (Grassman and Crews 1990 ; Jessop 2001). Nos résultats



semblent aller à l'encontre de ces tendances avec une augmentation progressive des taux associés à la réponse au stress, mais avec une évolution concomitante des taux basaux. Par ailleurs, nos travaux ont démontré que les femelles gestantes maintiennent un comportement de thermorégulation intensif tout au long de la gestation. Ainsi, chez cette espèce, la modulation adrénocorticale mesurée ne semble pas être impliquée dans l'expression du comportement maternel lors de la reproduction. Signalons que la femelle gestante régule les conditions thermique mais assure également l'approvisionnement en eau aux embryons. Une étude a montré qu'il existait un lien entre les taux de corticostérone et la prise en eau des œufs (Dauphin-Villemant and Xavier 1986). Il se pourrait donc, que la corticostérone soit impliquée dans la prise eau des œufs qui se manifeste notamment en fin de gestation (données non publiées). Ceci pourrait conduire à une contrainte hydrique maternelle forte, notamment en fin de gestation. Les analyses des osmolites plasmatiques chez les femelles sont actuellement en cours et permettront de tester cette hypothèse.

Les variations des taux de progestérone observées sont en accord avec les travaux précédents (Naulleau and Fleury 1990 ; Bonnet *et al.* 2001b), mais cette fois-ci en réalisant un suivi longitudinal des mêmes femelles et du développement. Nous observons un pic de progestérone durant le premier tiers de la gestation (mi-Juillet), tandis que la phase de vitellogénèse et la période post mise-bas sont associées à des taux très bas. En terme embryonnaire, cette période correspond à la phase de croissance précoce (Hubert and Dufaure 1968 ; Andrews 2004). Les mêmes variations ont été obtenues chez d'autres espèces de squamates vivipares (Chan *et al.* 1973 ; Guillette *et al.* 1981 ; Edwards and Jones 2001). La progestérone est invoquée comme étant à l'origine de modifications physiologiques importantes en étant un antagoniste de l'oestradiol, et améliorerait les échanges foëto-maternels au niveau de l'oviducte (Ho *et al.* 1981 ; Riley *et al.* 1987 ; Perez and Callard 1989). Par ailleurs, cette hormone serait impliquée dans l'évolution de la transition entre les formes ovipares et vivipares (Shine and Guillette 1988).

Ainsi, cette étude nous a permis de démontrer la dynamique des modifications structurales et physiologiques au cours de la gestation chez un reptile à reproduction sur capital. Particulièrement, ces contraintes apparaissent alors que les femelles sont déjà fortement affectées par l'allocation dans la formation des œufs. Ces contraintes génèrent alors une altération progressive de la musculature et une mobilisation énergétique croissante. Ceci explique l'émaciation importante des femelles après la mise-bas et la période de récupération énergétique relativement longue pour s'engager dans une nouvelle reproduction chez cette espèce.

Remerciements



Nous remercions Christian Thiburce pour la construction de cages expérimentales. Nous remercions également Emeline Audebaud, Charline Parenteau et Colette Trouvé qui ont réalisé les dosages hormonaux. Marie Vaugoyeau et Emeline Audebaud ont aidé dans la collecte des mesures. Ces travaux ont bénéficié du soutien de la fondation FYSEN et du plan Loire Grandeur Nature.



Annexe du chapitre 3: Résultats préliminaires des modifications physiologiques liées à la reproduction chez le python de Children

Le but de cette étude a été de mesurer les modifications physiologiques associées à la gestation chez des femelles reproductrices de *A. childreni*, à différents stades de la reproduction. Nous avons mesuré les taux de corticostérone basaux, ainsi que le stress oxydatif. Le stress oxydatif correspond à une agression des cellules par des radicaux libres et peut à terme devenir une situation pathologique. Les T-bars dont le malondialdéhyde (MDA) sont des substances qui réagissent avec l'acide Thio barbiturique et sont des marqueurs de la dégradation des lipides.

Tout comme chez *V. aspis*, nous avons mesuré réalisé des prises de sang à différents stades de la reproduction chez *A. childreni* (Gravidité, 7 jours après la ponte, 40 jours après la ponte et en post-reproduction (7 mois après, lorsque les femelles ont été re-nourries)). Ceci a été conduit sur 15 femelles reproductrices en 2010, au CEBC.

Les prises de sang nous ont permis d'évaluer 1) les patrons de corticostérone (taux basaux) et 2) le stress oxydatif (T-bars). Les résultats préliminaires sont présentés ci-dessous :

Résultats

Corticostérone

Nous avons trouvé un effet de la période sur le taux basal de corticostérone (ANOVA à mesures répétées, $F(3,55) = 7.0210$, $p = 0.004$). Les valeurs les plus basses se trouvent pour la période post-reproduction, avec une valeur maximale juste après l'oviposition (Fig.1)



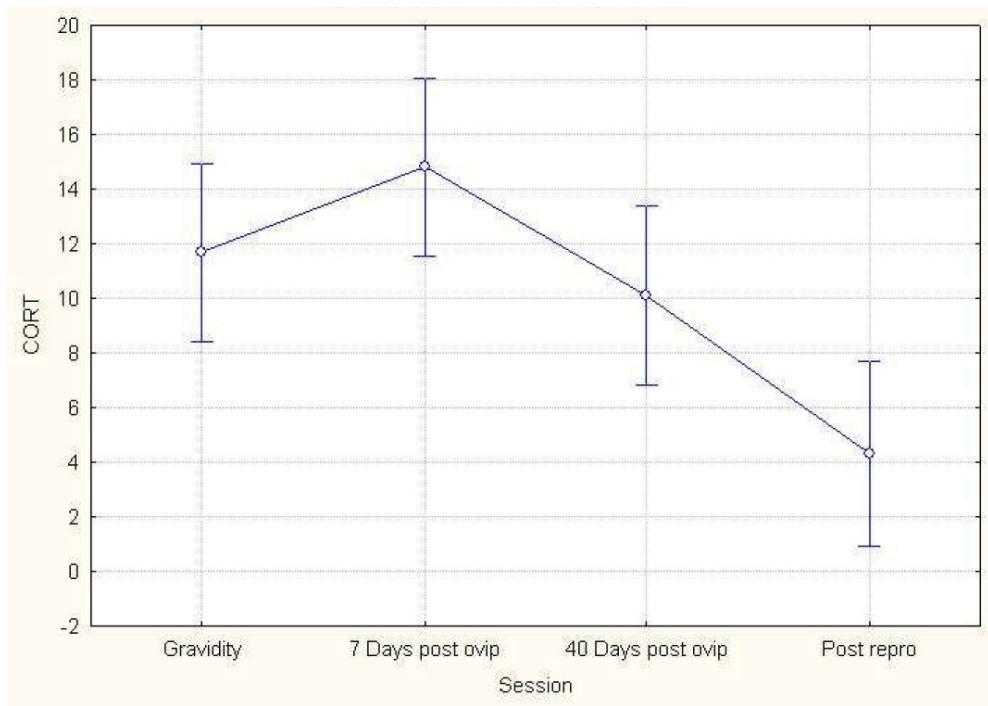


Figure 1 : Taux de CORT basal en fonction de la période chez les femelles reproductrices *A. childreni*

- *Stress oxydatif*

Le stress oxydatif a été mesuré en utilisant des mesures des T-bars (Malondialdéhyde plasmatique (MDA)).

Nous avons trouvé une influence de la période de reproduction sur les concentrations de malondialdéhyde (ANOVA à mesures répétées, $F(3,53) = 2.995$, $p = 0.039$). La valeur maximale correspondait à la période juste après la ponte, et la plus basse valeur en période post-reproduction (Fig.2).



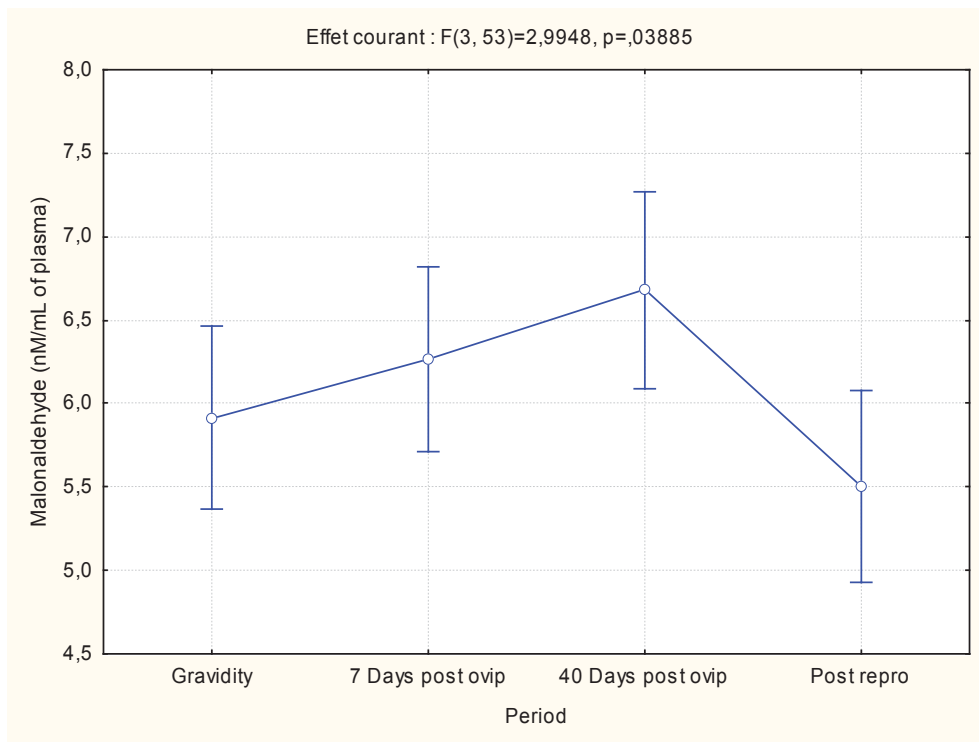


Figure 2 : Taux de MDA en fonction de la période chez les femelles reproductrices *A. childreni*

Interprétation

Les femelles montrent de fortes modifications physiologiques pendant la période de reproduction (i.e. gravité + incubation). Ces résultats pourraient correspondre à, tout d'abord, des demandes énergétiques qui sont importantes pendant la gravité, mais pourraient également suggérer des contraintes dues à l'approvisionnement en eau dans les œufs juste avant la ponte. Même si la prise de sang a eu lieu 7 jours après la ponte, les niveaux de CORT impliqués dans l'osmorégulation restent élevés pendant plusieurs jours après un stress hydrique (Bentley 2002).

Le stress oxydatif augmente au cours du temps, révélant une période de fortes contraintes pour les femelles, comme cela a été montré dans ce chapitre. Après la période de récupération, les niveaux de malonaldéhydes étaient bas.





CHAPITRE 4 :

Régulation hydrique et contraintes maternelles



Résumé du chapitre 4

Les travaux précédents se sont principalement concentrés sur la régulation des conditions thermiques et la nature des contraintes maternelles (énergie, performance). Les embryons de Squamates sont également sensibles aux influences hydriques durant le développement, comme cela a été mis en évidence dans de nombreuses études. L'eau est notamment essentielle pour la conversion des réserves lipidiques en tissus. Chez les espèces ovipares, la source d'eau principale est l'environnement extérieur avec des échanges de vapeurs d'eau et d'eau liquide à travers la coquille. En revanche, la gravidité et la rétention des embryons sont associées à un approvisionnement maternel en l'eau. Il s'agit donc d'une autre forme d'allocation maternelle au cours du développement qui doit être considérée.

Il est donc important de quantifier la prise en eau des œufs chez les espèces vivipares afin d'évaluer la « charge » que la gestation représente. La description des patrons de prise en eau est également importante car cette contrainte peut être dynamique et dépendante du stage de gestation. En parallèle, les femelles gravides thermorégulent activement ce qui les expose potentiellement à des pertes hydriques plus élevées. Pourtant, un éventuel conflit entre thermorégulation et perte hydriques n'a attiré qu'un intérêt scientifique limité. Dans ce contexte, nous avons donc voulu :

- (i) mesurer la prise en eau des œufs au cours de la gestation, afin de détecter l'évolution des contraintes hydriques chez les embryons;
- (ii) quantifier les pertes en eau associées à la gestation chez la vipère aspic, à la fois en mesurant les pertes hydriques totales et respiratoires (EWL, « evaporative water loss »).

Le volume des œufs a été mesuré au cours de la gestation chez *V. aspis* grâce au suivi échographique. Le volume a ensuite été estimé en utilisant des formules prédéfinies en fonction de la forme de l'œuf. Les résultats obtenus démontrent une prise en eau massive des œufs au cours du développement. En opposition avec la sensibilité thermique, l'essentiel de la prise en eau s'effectue en fin de gestation, pendant la vie fœtale. La prise en eau est étroitement liée à la fécondité, et la régulation hydrique maternelle semble donc être une allocation dépréciable contrairement à la régulation thermique. Ainsi plus la taille de la portée est élevée, plus la ressource hydrique apportée par la femelle était importante.

Les pertes hydriques totales ont été mesurées chez les femelles gestantes et non gestantes en milieu de gestation. Les pertes hydriques (somme des pertes respiratoires et cutanées) sont fortement affectées par la température et le statut reproducteur. Pour une température donnée, elles sont nettement supérieures pour les femelles gestantes en comparaison aux femelles non-reproductrices. La différence entre statut est amplifiée par le contraste dans les préférences



thermiques. Ces résultats suggèrent l'existence d'un conflit entre la régulation thermique maternelle et le budget hydrique dans une période où la demande embryonnaire en eau est très élevée.

Si de nombreux travaux se sont penchés sur les coûts de la thermorégulation (énergie, survie) peu se sont intéressés aux contraintes hydriques et ce, notamment pendant la gestation. Nos résultats apportent un éclairage original sur ces aspects. Les soins thermiques exposent les femelles à des pertes hydriques importantes alors que l'approvisionnement en eau des jeunes est une composante de la régulation du développement (notamment durant les derniers stades). Les données de terrain suggèrent que les femelles répondent à ce conflit en sélectionnant des habitats à la fois chauds et humides ce qui doit significativement limiter les pertes. On peut cependant prédire que les contraintes hydriques vont dépendre des conditions climatiques et seront plus fortes dans les milieux où les conditions estivales sont sèches. Les besoins hydriques doivent donc être pris en compte pour une meilleure compréhension des soins prénataux chez les Squamates.



I. Prise en eau par les œufs pendant la gestation chez *V aspis* : quantification et déterminants

I-1-CONTEXTE

La prise en eau des œufs est un phénomène largement connu chez les espèces ovipares. Dans ce cas, la prise en eau des œufs s'effectue à partir de l'humidité ambiante ou par contact avec les substrats (Ackerman and Lott 2004 ; Belinsky 2004). L'eau est importante pour le développement embryonnaire et plusieurs travaux ont démontré l'impact de l'hygrométrie sur la qualité phénotypique des jeunes (Packard 1991 ; Shine and Brown 2002 ; Belinsky *et al.* 2004).

Des travaux menés chez des espèces vivipares ont également mis en évidence un tel phénomène. L'étude de Dauphin-Villemant et Xavier (1986) sur le lézard vivipare met clairement en évidence la prise en eau au cours du temps en utilisant une méthode invasive (sacrifice des animaux) et donc sans suivi individuel. Dans le cas des espèces vivipares, c'est la femelle qui fournit l'eau aux embryons en développement et il s'agit donc d'une forme d'allocation maternelle pendant la période prénatale. Cette composante est importante à clarifier car la gestation peut affecter la balance hydrique maternelle et l'exposer à des contraintes spécifiques (déshydratation). Pourtant ces aspects demeurent insuffisamment considérés.

I-2-METHODE

Volume des œufs

Nous avons quantifié l'évolution du volume des œufs (*sensus lato* : embryons, vitellus et annexes) au cours de la gestation à partir des suivis obtenus lors des échographies. Ces mesures ont été réalisées en 2010 sur un groupe de 35 femelles de *V aspis* en gestation. Le suivi échographique a été mené régulièrement avec des examens à trois ou quatre reprises pendant la gestation. Une observation des images laisse transparaître des modifications massives du volume des œufs. Un des problèmes dans l'estimation de ce volume repose sur des modifications progressives de la forme même des œufs.

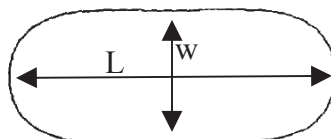
Nous avons utilisé une méthode élaborée pour les estimations de volume sur les reptiles ovipares (Maritz et Douglas 1994). Le volume de l'œuf va dépendre de sa longueur, de sa largeur et de sa forme. Maritz et Douglas, ont ainsi formulé 35 possibilités pour les formats des œufs. Dans ce cadre de cette étude, 5 formes différentes ont été retenues (ci-dessous). Elles correspondent



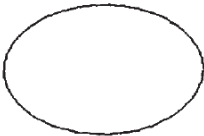
globalement à l'évolution constatée chez *Vipera aspis* depuis l'ovulation jusqu'aux jours précédant la mise-bas. Nous avons utilisé la formule de Maritz et Douglas (1994) dans le calcul du volume.

$$V = \pi LW^2(3c^2 + 14c + 35)$$

Avec $c = \lambda(VE - 1)210$



Formes retenues et paramètres associés pour le calcul du volume:

	$\lambda=0$ $E=1,6$
	$\lambda=0$ $E=1,8$
	$\lambda=1/2$ $E=2$
	$\lambda=3/4$ $E=2,2$
	$\lambda=1$ $E=2,6$

un champ de 38mm de large. Certains œufs étaient trop volumineux pour être pris en une seule fois (notamment en fin de développement). Plusieurs images ont donc été réalisées afin de permettre une vue d'ensemble (Fig.1). L'estimation de la longueur totale a ainsi pu être déterminée avec des repères sur les différentes échographies.

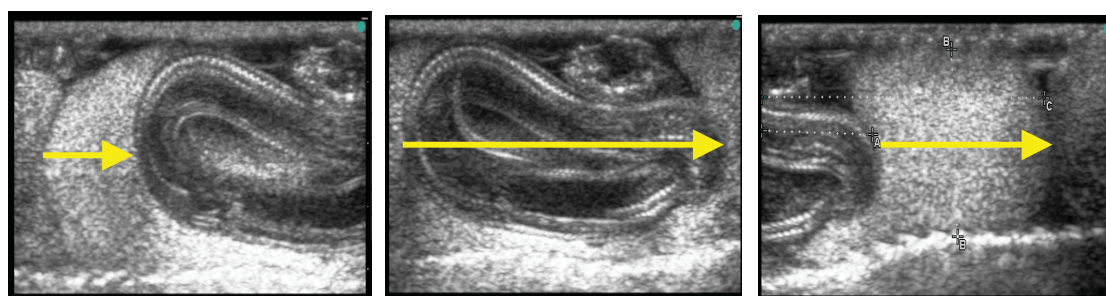


Figure 1. Exemple de mesures de longueur à partir d'une photo composite. La mesure de la longueur totale est obtenue à l'aide de repères en chevauchement sur les trois images. Cette procédure aura été nécessaire principalement en fin de gestation.



Variations pondérales

En parallèle nous nous sommes également intéressés aux variations pondérales observées chez les femelles reproductrices. Les femelles étaient maintenues en enceintes climatiques avec un contrôle du cycle thermique (cycle de type « O », cf Article 2, Fig.1) et une hygrométrie élevée (80%).

Dans le cadre de l'étude sur les modifications physiologiques et structurales (Article 5), nous avons mis en évidence une certaine « stabilité » au cours du temps de la masse des femelles reproductrices (cf Article 5 ; Fig.1), alors qu'elles perdent en musculature (cf Article 5 ; Fig.2). Deux phénomènes opposés se superposent donc potentiellement (gain pondéral lié à la prise en eau et perte liée aux contraintes énergétiques). Dans l'expérimentation menée en 2010, nous avons donc réalisé des prises de masses plus fréquentes (tous les 3 semaines environs). Cette approche a permis de détecter des prises de masse qui ne peuvent être dues qu'à l'absorption de l'eau. Nous avons réalisé le cumul de ces variations de masse afin d'évaluer la prise en eau pendant la gestation. Les variations pondérales ont été reliées à la taille de la portée totale et au nombre de jeunes viables.

Statistiques

Nous avons mesuré l'évolution du volume des œufs au cours du temps avec des ANOVA sur mesures répétées. Par ailleurs nous avons examiné la relation entre la prise en eau et la fécondité, en considérant la prise en eau relative à la mesure de départ (log transformé), et en co-facteurs, la fécondité et le stade d'avancement de la mesure.

I-3-RESULTATS

Evolution du volume des œufs

Le suivi échographique a permis de mettre en évidence un gain volumique substantiel (Fig.2, effet Session, $F_{2,62}=221.06$, $p < 0.001$). Ainsi, entre la première et la dernière session, l'augmentation de volume est de 260% en moyenne. L'estimation de volume d'eau requis par œuf est d'environ $6,35 \pm 2.31$ ml.



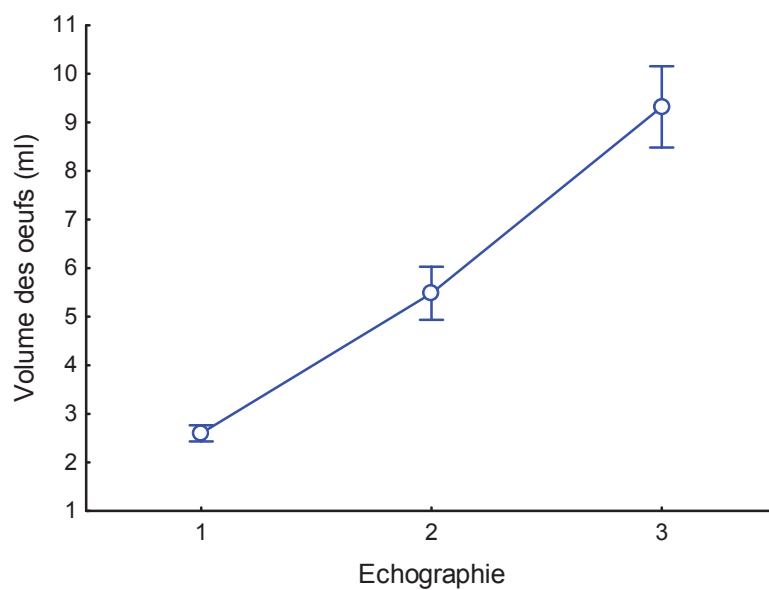


Figure 2. Evolution du volume estimé des œufs selon les trois sessions d'échographie

Les mesures échographiques suggèrent une évolution régulière au fil des trois sessions. Cependant, les femelles examinées sont à des stades d'avancement variés du fait de différences dans les dates de démarrage de la gestation. La mue est étroitement associée à l'ovulation et ce repère temporel fournit un moyen simple pour replacer les mesures, relativement à l'avancée dans le développement (Fig.3).

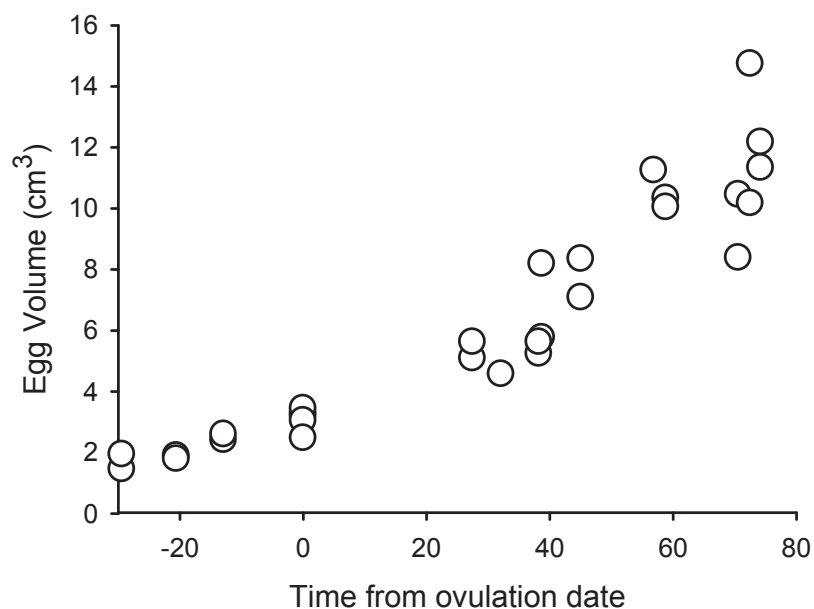


Figure 3: Evolution du volume des œufs selon le stade développement. L'axe des abscisses est centré sur la date d'ovulation (t=0).



Cette représentation souligne une évolution non linéaire en accord avec les travaux de Dauphin-Villemant (1986) sur *Z. vivipara*. Une accélération de la prise en eau s'observe en fin de développement, lors de la vie fœtale. Cette période de croissance somatique est donc la plus nécessitante en termes hydriques. Cette forte demande est probablement due à deux composantes embryonnaires liées:

- i) activités anaboliques avec synthèses protéiques et tissulaires avec la mobilisation du vitellus
- ii) activités cataboliques avec production de déchets métaboliques qui s'accumulent dans l'allantoïde

Changements pondéraux

L'évolution de masse apporte des éléments complémentaires. On observe une forte hétérogénéité entre femelles dans les variations pondérales (gamme – 9g à +26g). Ces variations sont étroitement liées à la taille de portée viable (Fig.4, $r^2 = 0,74$, $F(1,49)=143.52$, $p < 0.0001$) et plus faiblement à la taille de portée totale ($r^2 = 0,21$, $F(1,49)=14.77$, $p < 0.001$). On observe ainsi des prises élevées chez les femelles avec un nombre de jeunes importants (+25g pour une femelle avec 13 petits vivants) alors que les valeurs sont négatives, notamment chez les femelles avec faible nombre de jeunes.

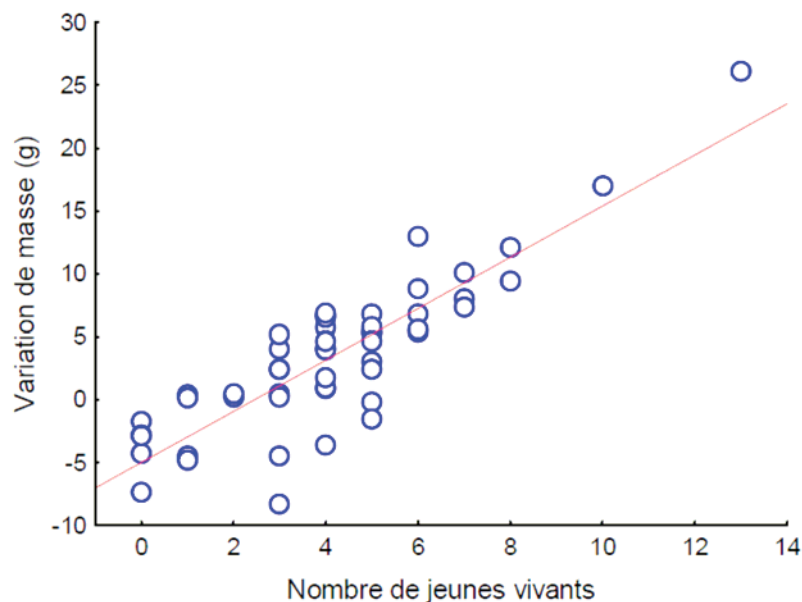


Figure 4. Relation entre les changements de masse pendant la gestation et le nombre de jeunes vivants



Cette corrélation démontre bien la relation proximale entre la prise en eau et le nombre de jeunes. Contrairement à la régulation thermique, l'allocation maternelle de l'eau est directement dépendante de la fécondité (soin dépréciable). Soulignons que les contraintes énergétiques de la gestation sont largement liées aux préférences thermiques modifiées et plutôt indépendantes de la fécondité (Ladyman *et al.* 2003). La relation entre variation de masse et fécondité est le produit de deux phénomènes qui se surimposent et sont intégrés en terme pondéral : la prise en eau et les pertes de masse induites par le métabolisme. Ainsi, chez les femelles avec une fécondité élevée, les contraintes énergétiques sont « masquées » par la prise en eau. Les variations pondérales pendant la gestation relèvent donc de deux phénomènes concomitants et, de fait, ne peuvent être utilisées comme moyen d'estimation précis du gain en eau ou bien des coûts énergétiques.

II. Impact de la gestation et de la température sur les pertes hydriques totales chez la vipère aspic (*V. aspis*)

II-1- CONTEXTE

Les femelles gestantes choisissent de maintenir des températures corporelles élevées ce qui permet d'optimiser la qualité des jeunes produits et d'accélérer la cinétique du développement. Si le maintien de régimes thermiques élevés est avantageux pour la reproduction, il existe des contraintes significatives notamment en termes énergétiques. Une autre forme de contraintes est celle des pertes hydriques. En effet, les pertes se manifestent à la fois de façon passive au niveau cutanée mais aussi en relation avec les échanges respiratoires et le métabolisme. Ainsi, il pourrait exister un compromis entre la thermorégulation comportementale et la régulation du budget hydrique. Ce type de conflit est rarement pris en compte (Davis and Denardo 2007) alors que la femelle fait face à des besoins conflictuels avec la régulation de la température et l'approvisionnement en eau des œufs. Notre objectif était de mesurer les déterminants des pertes hydriques totales chez *Vipera aspis* selon i) la température et ii) le statut reproducteur (gestante ou non).



II-2- METHODE

Mesures

Les mesures ont été réalisées de façon ponctuelle à une période correspondant au milieu de la gestation pour les femelles reproductrices. Nous avons comparé 15 femelles gestantes à 20 femelles non gestantes avec des gammes de masse et de taille comparables. Les mesures ont été réalisées à 15, 25 et 33°C.

Nous avons utilisé le système de calorimétrie en circuit ouvert mis au point au Centre d'Etudes Biologiques de Chizé. Ce système repose sur un système en air « poussé » ce qui limite les risques de problème d'étanchéité. Un compresseur permet d'accumuler, dans une cuve de 300l, un air préalablement déshydraté et dont le CO₂ a été retiré. Le débit de l'air en sortie de la bouteille de gaz est contrôlé par un débitmètre de masse (0-1L.min⁻¹). Cet air alimente une chambre climatique (LMS) et passe dans un système de vaporisation de l'eau qui permet de produire un air saturé en humidité à une valeur de température consigne (identifié par la température de point de rosée ou « dewpoint »). En effet des mesures réalisées avec un air parfaitement sec seraient non cohérentes en termes écologiques et ces conditions seraient stressantes pour les individus.

L'air avec point de rosée voulu (12°C) est transféré dans une seconde chambre climatique où sont placés les animaux et l'hygromètre. Cette chambre est réglée à une température qui correspond à la valeur expérimentale souhaitée. Cette valeur est, toujours supérieure d'au moins 2°C au point de consigne de la première chambre afin d'éviter toute condensation. L'air alimente une chambre expérimentale (bocal « Le parfait » volume de 500ml, Fig. 5a). L'air est collecté en sortie vers un hygromètre (SableSystem, RH 300, Fig. 5b) qui mesure le nouveau point de rosée qui correspond à l'air enrichi par les pertes hydriques de l'animal. A la sortie de l'hygromètre, l'air est séché et envoyé vers des analyseurs d'oxygène (FC10a) et de CO₂ (CA10a). Considérant les dimensions de la chambre et la consommation d'oxygène, nous avons choisi un débit de 65ml.min⁻¹. Le temps d'attente pour obtenir un renouvellement à 99% de l'air dans la chambre était donc de 106 minutes (e.g., 4.6 *

Volume Chambre/ Flux d'air).



Figure 5a. Chambre de mesure (bocal « le parfait ») avec une *V. aspis* gestante.



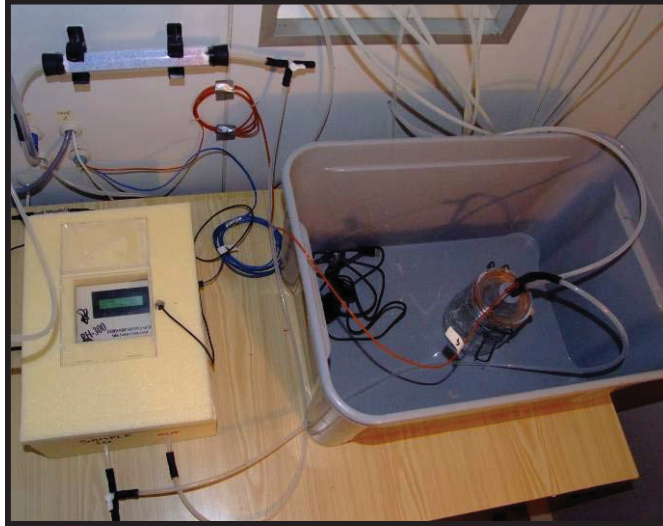


Figure 5b. Prise de vue dans le caisson à température contrôlée dans lequel les mesures sont réalisées. L'air avec une humidité connue (point de rosée = 12°C) arrive dans la chambre avec l'individu (à droite). L'air en sortie est transféré vers l'hygromètre (à gauche) qui mesure le nouveau point de rosée (« dewpoint »). L'air est ensuite séché et transféré vers les analyseurs d'O₂ et de CO₂.

L'analyseur d'hygrométrie a été préalablement calibré avec un point 0 réalisé avec de l'azote pur, ce qui permet d'obtenir un air virtuellement sec (point de rosée : -37°C). L'autre point de calibration (valeur haute) est obtenu en produisant un air humide avec un point de rosée connu (25°C). Les mesures de point de rosée, ce CO_2 et d' O_2 sont transmis par un signal analogique ($\pm 2,5\text{mV}$) vers une centrale d'acquisition (21X, Campbell Scientific). Les conversions sont ensuite assurées à l'aide d'équations spécifiques et les mesures collectées grâce au logiciel PC208.

La première chambre climatique avec le générateur de point de rosée est mise en route la veille. Environ 3h avant chaque expérimentation, le reste du système est démarré jusqu'à la stabilisation des températures. Les animaux sont également placés dans la seconde chambre climatique ce qui permet de s'assurer que leur température corporelle s'équilibre à la température expérimentale souhaitée. Une cage vide est réalisée en début et fin de session afin de suivre une potentielle dérive. Une fois la première cage vide réalisée, le premier animal est placé dans le bocal qui est alors connecté à l'arrivée et la sortie d'air. La stabilisation est obtenue après environ 45 minutes.

Les mesures collectées par l'hygromètre correspondent à une densité en vapeur ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$). Les mesures sont corrigées par le débit ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) pour obtenir le flux ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Les concentrations en oxygène et CO_2 sont obtenues à l'aide des équations suivantes de Hoffman (cf Annexe).

Statistiques

Pour chaque individu, des mesures ont été collectées à trois températures (15 , 25 et 33°C). Nous avons analysé les pertes hydriques totales et le métabolisme à l'aide de modèles linéaires généralisés, en traitant l'individu comme facteur aléatoire, le statut reproducteur comme facteur fixe et la masse corporelle comme co-facteur. Nous avons également testé ces effets en prenant en compte les valeurs masse-spécifiques pour le métabolisme et les pertes hydriques. Ces données sont en cours de traitement. Dans ce contexte nous avons privilégié une présentation basée sur une approche graphique simple en faisant état des principaux résultats.

II-3-RESULTATS



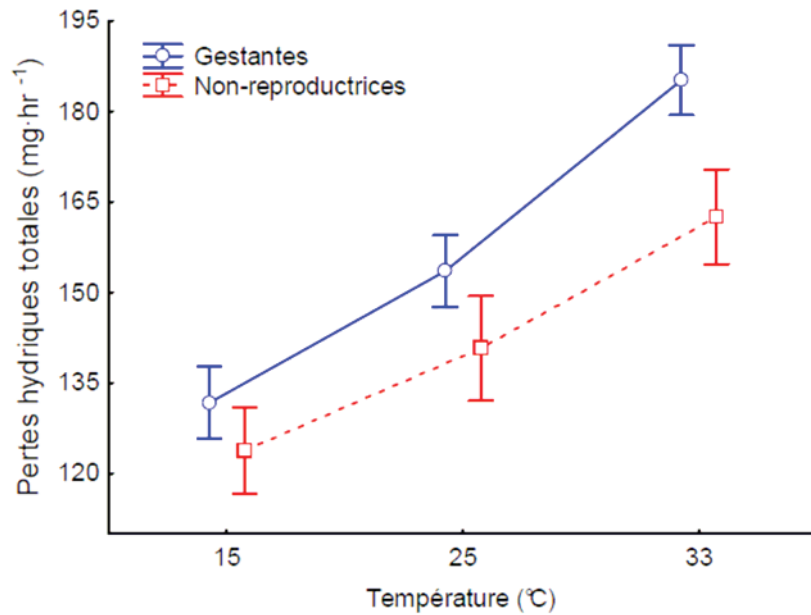


Figure 6. Pertes hydriques totales (mg.h-1) selon la température et le statut reproducteur

Les pertes hydriques sont les mieux expliquées lorsque l'on considère la température, la masse des animaux et le statut reproducteur (Fig.6). Ainsi, on observe une nette progression des pertes hydriques totales avec des valeurs environ 40% plus élevées à 33°C par rapport à 15°C. On détecte un fort effet du statut reproducteur avec des valeurs plus élevées pour chaque température.



Ces contrastes demeurent lorsque l'on considère les valeurs ajustées par la masse de l'individu (Fig.7). Les femelles gestantes présentent un niveau de pertes hydriques totales en moyenne 50% plus élevé par rapport aux femelles non-reproductrices.



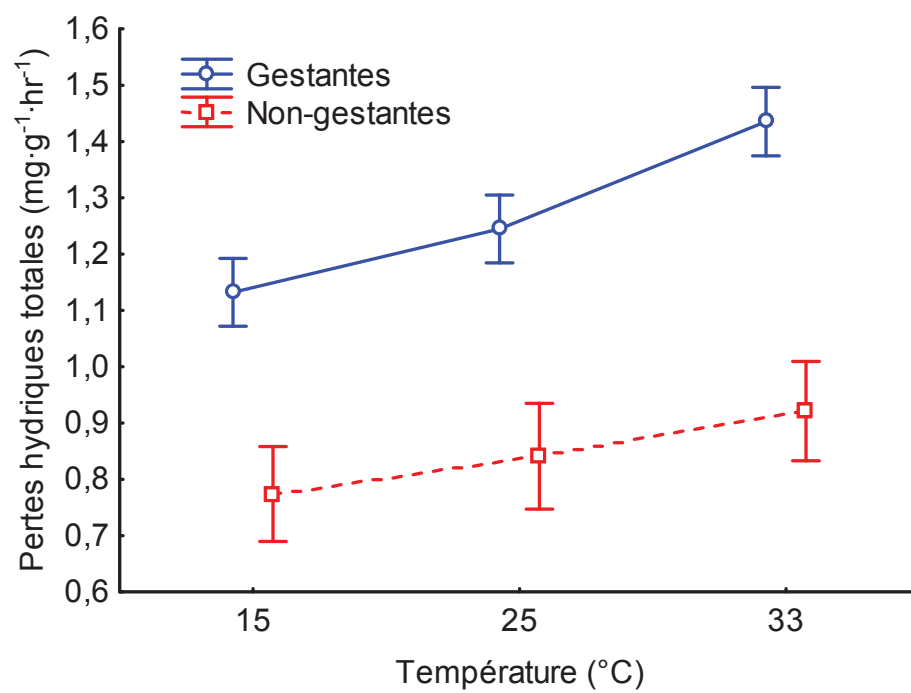


Figure 7. Pertes hydriques totales masse spécifiques (mg.g⁻¹.h⁻¹) selon la température et le statut reproducteur.



L'étude du métabolisme respiratoire (Fig.8) permet de mettre en évidence des valeurs également plus élevées chez les femelles gestantes comparativement aux non gestantes, notamment aux températures élevées (33°C).

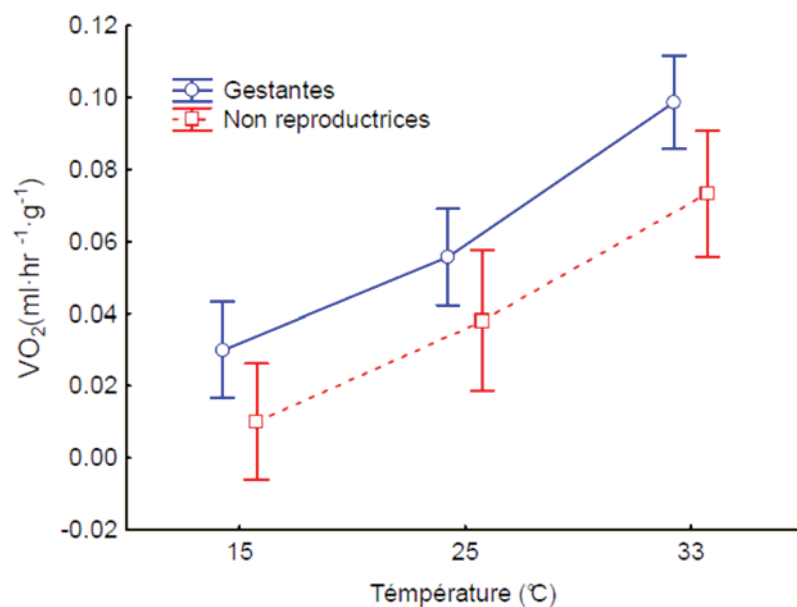


Figure 8. Consommation d'oxygène masse spécifique ($ml \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) selon la température et le statut reproducteur.



Enfin, le métabolisme respiratoire et les pertes hydriques totales semblent étroitement liés (Fig.9). Ces données suggèrent donc que les pertes hydriques totales sont largement dues à la respiration par rapport aux échanges plus passifs (pertes transcutanées).

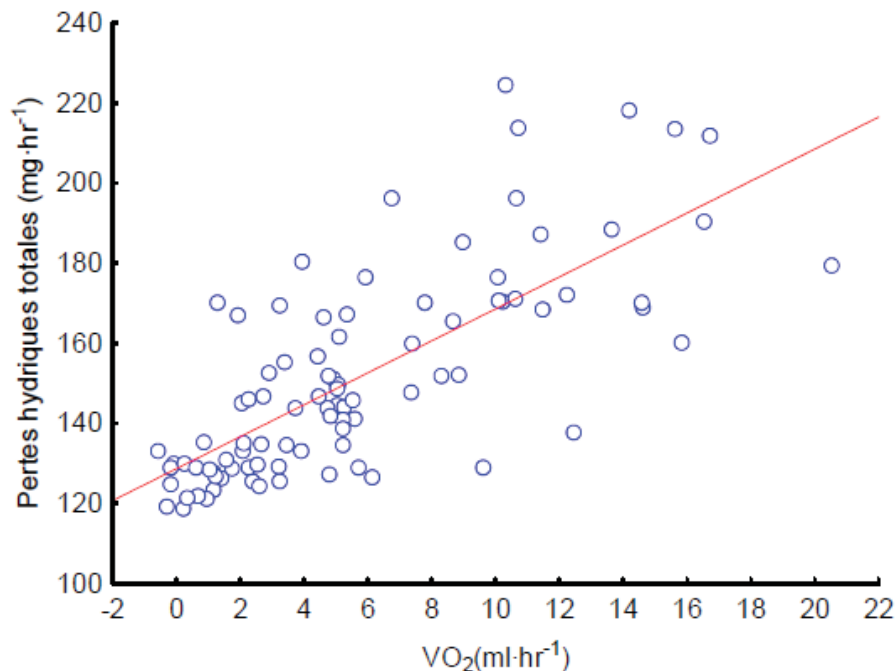


Figure 9. Relation entre la consommation en oxygène et les pertes hydriques totales

Ces résultats apportent un éclairage original sur les modifications métaboliques liées à la gestation. La relation entre température et pertes hydriques n'est pas linéaire, avec des valeurs plus élevées aux hautes températures. Pour une température donnée, les femelles gestantes présentent un métabolisme et des pertes hydriques totales toujours plus fortes que les non-reproductrices. Cette différence est d'autant plus accentuée que les femelles gestantes vont maintenir des températures élevées (33°C) en comparaison avec les non-reproductrices dont les préférences thermiques sont plus basses.

Des travaux précédents au CEBC sur le métabolisme suggéraient une absence de l'effet du statut reproducteur (Ladyman *et al.* 2003). Soulignons que le système de mesure utilisé était de type « air tiré », plus exposé aux fuites et aux erreurs de mesures. Dans notre cas, le système en « air poussé » réduit cette exposition. De plus nous avons toujours utilisé un air calibré ce qui a permis de s'affranchir de l'air extérieur et des fluctuations journalières.



Nos résultats sur les pertes hydriques sont originaux et soulèvent un conflit entre la thermorégulation et le budget hydrique. Les modifications des préférences thermiques compromettent donc le budget hydrique. En parallèle nous avons mis en évidence une prise en eau au cours de la gestation avec des besoins hydriques marqués notamment pendant la vie fœtale. Cette période doit donc être particulièrement problématique pour les femelles pour pouvoir réguler les conditions prénatales, et combiner la régulation thermique (soin non-dépréciable) et l'approvisionnement en eau (soin dépréciable).

Une possibilité pour minimiser l'exposition aux pertes hydriques repose sur la sélection de micro-habitats spécifiques, à la fois favorables à la thermorégulation et avec une hygrométrie élevée. Des données préliminaires sur le terrain suggèrent que de telles modifications se manifestent. Ainsi, des relevés d'hygrométrie au niveau des placettes de thermorégulation suggèrent des valeurs plus élevées chez les femelles gestantes par rapport aux non gestantes (Fig.10).

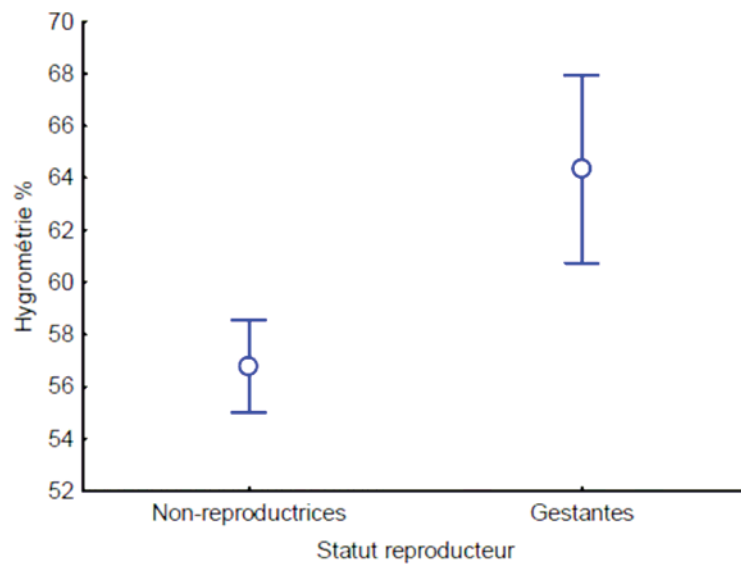


Figure 10. Relevés d'hygrométrie sur le terrain au niveau des placettes d'exposition de femelles reproductrices et non reproductrices.

ANNEXE :

Equations de Hoffman

$$RER = \frac{F_C(F'_O + F'_W - 1) + F'_C(1 - F_O - F_W)}{F_O(1 - F'_C - F'_W) + F'_O(F_C + F_W - 1)}$$

$$\dot{V}_{CO_2} = \frac{R_B[F_C(F'_O + F'_W - 1) + F'_C(1 - F_O - F_W)]}{F_C + F_O + F_W - 1}$$

$$\dot{V}_{O_2} = \frac{R_B[F_O(1 - F'_C - F'_W) + F'_O(F_C + F_W - 1)]}{F_C + F_O + F_W - 1}$$

$$\dot{V}_{H_2O} = \frac{F'_W R_B - F_W(R_B + \dot{V}_{CO_2} - \dot{V}_{O_2})}{F_W - 1}$$



R_B is the rate of flow of air entering respirometry chamber.

F'_C is the fractional content of carbon dioxide in air entering respirometry chamber.

F'_O is the fractional content of oxygen in air entering respirometry chamber.

F'_W is the fractional content of water vapor in air entering respirometry chamber.

F_C is the fractional content of carbon dioxide in air exiting respirometry chamber.

F_O is the fractional content of oxygen in air exiting respirometry chamber.

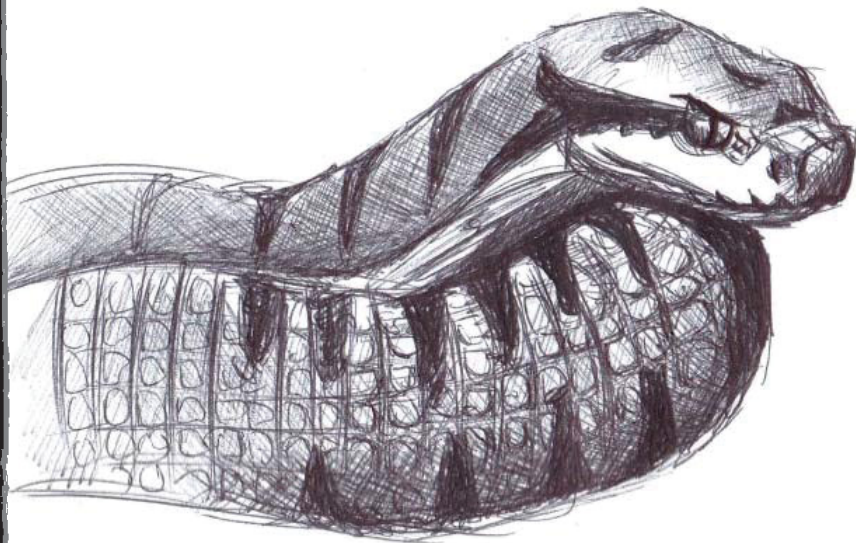
F_W is the fractional content of water vapor in air exiting respirometry chamber.



DISCUSSION

ET

PERSPECTIVES



Les soins parentaux ont attiré un intérêt scientifique considérable (Clutton-Brock 1991). La diversité des travaux a été menée sur des composantes complémentaires avec notamment (i) les facteurs évolutifs impliqués dans leur émergence, (ii) les mécanismes proximaux contrôlant leur expression et (iii) les compromis comportementaux et les stratégies parentales associés aux bénéfices et aux coûts des soins parentaux. Chez les vertébrés, l'effort de recherche a principalement été mené sur les oiseaux et les mammifères (Clutton-Brock 1991 ; Farmer 2000 ; Koteja 2000) chez qui la prise en charge post-natale des jeunes est particulièrement prononcée. Traditionnellement, les vertébrés ectothermes et notamment les reptiles squamates ont été sous considérés dans ce champ thématique. Ce constat est probablement lié aux soins post-nataux faibles ou absents. Ces organismes déploient cependant des comportements parentaux prononcés dans la régulation des conditions de développement prénatales (vie embryonnaire). Il est crucial de considérer la diversité des comportements parentaux pour répondre à des questions évolutives centrales. Dans ce contexte, Farmer (2000) a précisément proposé une hypothèse pour comprendre l'évolution des soins parentaux complexes, tels que nous les connaissons chez les mammifères et oiseaux. Cet auteur suggère notamment l'importance centrale de la régulation des conditions précoces du développement (début de développement embryonnaire) comme contexte évolutif de départ. Cette théorie de Farmer est unique car elle donne un cadre cohérent à l'évolution convergente des soins parentaux des endothermes. Par ailleurs, elle peut être testée empiriquement, au moins en partie.

Cette thèse avait précisément pour but d'examiner la signification des soins parentaux prénataux chez des vertébrés ectothermes (serpents). Si ces organismes ne constituent aucunement une étape « intermédiaire » vers l'endothermie, ils permettent cependant d'étudier l'importance de la sensibilité thermique et les bénéfices du contrôle parental dans un contexte ectothermique (i.e. contexte ancestral) et indépendant des soins post-nataux. Une telle étude est essentielle pour évaluer l'étape initiale de la théorie (Fig.8, p.18) et l'influence de la sensibilité thermique sur les stratégies parentales aux stades prénataux. Dans la pratique, nous avons examiné deux espèces de squamates aux modes de reproduction contrastés : l'une ovipare et l'autre vivipare. Nous avons déployé une approche intégrée considérant deux facettes complémentaires : i) l'impact des conditions thermiques sur les jeunes et ii), l'expression des comportements maternels et leurs sous-bassements physiologiques.

Dans ce contexte, nous avons manipulé expérimentalement les conditions de développement en imposant des régimes de températures choisis, aux femelles reproductrices. Enfin, nous avons mis au point des méthodes originales pour clarifier les comportements des nouveau-nés et le degré d'investissement du comportemental maternel. L'aspect central de l'hypothèse de Farmer se fonde sur une sensibilité non linéaire du développement et l'importance de



la régulation parentale en début de vie embryonnaire. La mise en place d'une approche expérimentale nécessite d'avoir une lecture dynamique de la cinétique de développement embryonnaire pour explorer les deux facettes proposées. Un tel suivi est classiquement impossible à réaliser sans une technique adaptée et cette limite explique possiblement l'absence d'étude expérimentale de l'hypothèse de Farmer. Nous avons appliqué avec succès l'outil échographique comme moyen de suivi du développement embryonnaire et des contraintes maternelles. Enfin, nous avons mis au point des méthodes originales pour évaluer les comportements des nouveau-nés et le degré d'investissement du comportement maternel. Nos travaux apportent un éclairage original sur la dynamique de la sensibilité thermique embryonnaire, la régulation maternelle et les contraintes associées. Ces travaux ne permettent pas de fournir un cadre évolutif à l'émergence des soins prénataux. Nos résultats apportent cependant des éléments de réflexion innovants sur des modèles contrastés et devraient contribuer à une meilleure compréhension de la diversité des stratégies parentales des ectothermes. Les résultats obtenus sont discutés ci-dessous.



1- Sensibilité thermique embryonnaire et bénéfices de la régulation maternelle

1-1-Sensibilité thermique du développement

1-1-1.Cadre conceptuel

La sensibilité du développement est bien connue notamment en biologie du développement et en santé humaine où la littérature est abondante (Henry and Ulijaszek 2009). La sensibilité thermique des embryons semble être une caractéristique universelle des vertébrés. Chez les reptiles squamates, les conditions thermiques peuvent avoir des impacts variés sur la morphologie (Burger *et al.* 1987 ; Elphick and Shine 1998 ; Qualls and Andrews 1999 ; Ji and Braña 1999; Braña and Ji 2000 ; Parker and Andrews 2006), la physiologie (Qualls and Andrews 1999 ; O'steen and Janzen 1999 ; Braña and Ji 2000 ; Wapstra 2000 ; Parker and Andrews 2006), le comportement (Burger 1989 ; Burger 1998; Downes and Shine 1999 ; Webb *et al.* 2001 ; Blouin-Demers *et al.* 2004) ou la survie (Burger and Zappalorti 1998 ; Shine and Harlow 1993 ; Brown and Shine 2004 ; Lourdais *et al.* 2004b ; Uller and Olsson 2010).

La sensibilité thermique a donc été largement étudiée, à la fois de façon corrélative ou expérimentale (Shine and Harlow 1996 ; Elphick and Shine 1998 ; Lourdais *et al.* 2004b ; Braña and Ji 2007). Cependant, peu d'études se sont intéressées à la sensibilité différentielle des différents stades du développement et ce, dans un contexte écologique (contraintes thermiques) et évolutif (régulation maternelle). Dans un cadre théorique, plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour interpréter l'impact des conditions thermiques avec notamment, « colder is better » (Huey *et al.* 1999), « warmer is better » (Huey *et al.* 1999) ou bien l'« Optimal Developmental Temperature » (Cohet and David 1977 ; Huey *et al.* 1995). Ces hypothèses doivent être replacées dans un contexte variable où les organismes font face à des fluctuations journalières.

Nous avons employé des conditions thermiques réalistes en terme écologique afin d'éviter des réponses extrêmes et pathologiques rendant l'interprétation subjective. En effet l'application de régimes non réalistes peut apporter des résultats problématiques dans la mesure où ces traitements extrêmes génèrent nécessairement des perturbations. Nos travaux démontrent clairement l'importance de la régulation thermique maternelle aux stades précoces avec des effets complexes développés ci-après. Notre étude sur l'impact de perturbations thermiques durant les phases précoces du développement, à la fois chez le python de Children et chez la vipère aspic, nous a permis de vérifier l'hypothèse d'une sensibilité thermique accrue des premiers stades de



développement, souvent empiriquement invoquée mais rarement testée (Shine 1995, 2006 ; Kim and Monaghan 2006 ; Rodríguez-Díaz and Braña 2011).

1-1-2. L'importance de la température préférée (T_{set})

Des mesures comportementales sur le python de Children durant la phase de gravidité ont, en parallèle, mis en évidence que le choix des femelles s'orientait vers un maintien constant des températures à T_{set} en situation de confort, et lorsque les températures n'étaient pas limitantes (Lourdais *et al.* 2008 ; Fig.9 du Matériel et Méthode). Nous avons pu montrer que les conditions optimales (atteinte de la température préférée) permettent la production de jeunes de meilleure qualité, tant au niveau morphologique, comportemental que des performances. Nous avons également pu détecter un bénéfice majeur en termes de raccourcissement de la durée de gravidité. Au contraire, les jeunes issus des deux traitements reflétant une thermorégulation maternelle altérée (accès partiel ou absent à T_{set} mais avec une température journalière moyenne identique), étaient impactés d'un point de vue des caractéristiques comportementales, locomotrices et physiologiques. Par ailleurs, nous avons démontré qu'un accès même partiel à T_{set} fournit un bénéfice substantiel en termes de qualité des jeunes et de durée de développement. En effet les nouveau-nés issus du traitement thermique intermédiaire (4H- T_{set}) répondaient mieux face à un prédateur, et avaient des capacités de nage et une force de traction meilleures que ceux du régime « NR », et étaient comparables aux jeunes issus du traitement optimal. Ainsi nous avons pu démontrer l'existence d'une sensibilité thermique initiale chez cette espèce et les bénéfices associés à l'amélioration d'une prise en charge maternelle aux stades précoces du développement, et l'importance fonctionnelle d'atteindre la température préférée. Ainsi, ce résultat vient compléter des démonstrations précédentes où la variance thermique était souvent plus pertinente qu'une même température moyenne (Webb *et al.* 2001 ; Shine 2004b ; Du and Shine 2010).

Il est essentiel de considérer de tels effets non linéaires dans l'étude de la thermorégulation maternelle qui est dépendante des opportunités de thermorégulation et des cycles journaliers. Ainsi, pour une même température journalière moyenne, les embryons semblent bénéficier d'un accès prolongé aux températures préférées et ce, même lorsque la température baisse au dessous de la gamme optimale (par exemple températures nocturnes). La sensibilité non-linéaire du développement serait invoquée comme étant la raison pour laquelle les fluctuations thermiques journalières accélèrent l'embryogénèse (Du and Shine 2010). Notre contribution originale a donc résidé dans la démonstration que le temps d'accès aux températures préférées, accélérât la dynamique de la durée de développement, et influençait la qualité phénotypique des jeunes. Ainsi, il



semblerait que le temps passé à T_{set} soit un facteur primordial pour le bon déroulement du développement embryonnaire, et que les femelles semblent optimiser ce paramètre.

Concernant la vipère aspic, nous avons pu mettre en évidence des résultats sur les préférences thermique comparables aux pythons. Les femelles gestantes maintiennent des températures élevées (33.45°C), avec une grande précision. Des travaux de manipulation thermiques en cours soutiennent l'hypothèse de l'importance de l'accès à la température préférée (Lourdais *In prep.*). Ainsi pour une même température moyenne, l'accès à T_{set} joue fortement sur la date de mise-bas et la qualité des jeunes. A l'image des travaux sur les pythons, ces données permettent de comprendre les bénéfices de la précision de la thermorégulation maternelle que nous avons mis en évidence (chapitre 1).

La température préférée a attiré un intérêt considérable chez les ectothermes (Patterson and Davies 1978 ; Hertz *et al.* 1993 ; Blouin-Demers *et al.* 2000 ; Gvoždik and Castilla 2001) avec l'hypothèse d'optimum multiples selon les fonctions physiologiques considérées. De même la relation entre la température corporelle, les performances et de façon ultime la fitness a fait l'objet de travaux théoriques (modèle d'optimalité) où l'investissement dans la thermorégulation dépend fortement du lien attendu avec la « fitness ». Cependant le lien entre température et fitness est difficile à établir et d'autres aspects plus éloignés comme les performances locomotrices sont généralement considérés (vitesse de sprint par exemple, e.g. Hertz *et al.* 1983 ; van Berkum 1986 ; Huey and Kingsolver 1993 ; Angilletta 2009). Dans le contexte du développement, le lien entre température préférée et performance reproductrice est beaucoup plus direct dans la mesure où les régimes thermiques maternels influencent fortement les trajectoires de développement. Ainsi la thermorégulation maternelle en phase de gravidité serait particulièrement importante en optimisant le temps d'accès à la température préférée qui va jouer sur la phénologie de la reproduction (naissance précoce) et la qualité phénotypique des jeunes.

1-1-3-Sensibilité thermique embryonnaire stade-dépendant

Nous avons étudié la dépendance au stade du développement (début, milieu et fin de gestation) de la sensibilité thermique chez l'espèce vivipare (*V. aspis*). Les résultats indiquent une sensibilité thermique accrue durant le premiers tiers du développement : les jeunes ayant fait l'expérience de températures (sub-optimales) froides durant cette période sont fortement impactés : ils sont plus petits, ont une croissance plus faible, présentent des altérations cognitives face à un prédateur et dans un nouvel environnement. Des effets à moyen-termes ont également été détectés avec une survie post-hivernale faible et une prise alimentaire limitée. Au contraire, les stades tardifs du



développement (vie fœtale) sont moins sensibles aux perturbations thermiques et sont uniquement affectés par des naissances plus tardives. Si la régulation maternelle semble primordiale durant le premier tiers du développement, une plus grande flexibilité du développement existe en fin de développement. Ainsi, des contraintes thermiques (simulant une thermorégulation maternelle altérée) semblent générer des réponses compensatoires et une modulation du phénotype des jeunes.

Une réponse dynamique à l'environnement maternel peut être importante notamment sous des climats tempérés où les fluctuations de température contraignent la reproduction (Lourdais *et al.* 2004b). Les embryons en fin de développement ont pu développer une réponse métabolique, reflétant possiblement une acclimatation métabolique au froid (Johnston and Benett 1996 ; Seebacher *et al.* 2009 ; Hare *et al.* 2010) qui permettrait aux individus d'être ainsi plus efficaces dans un environnement futur similaire. Ainsi, la vie fœtale serait une fenêtre d'intégration des influences environnementales transmises par la mère. Cependant, si l'idée d'une manipulation maternelle apparaît séduisante, de nombreuses études se focalisent sur les effets maternels et leur potentiel adaptatif, en omettant souvent la perspective d'ajustements propres aux embryons (Du *et al.* 2010 ; Du and Shine 2010). La perspective embryonnaire et fœtale semble donc essentielle à prendre en considération. Nos résultats suggèrent également une réversibilité des effets mesurés à la naissance : en effet, un an après la naissance, plus aucune différence de métabolisme n'apparaît entre les différents traitements (données non présentées). Des transmissions adaptatives des indices environnementaux durant la vie fœtale, sembleraient ainsi possibles, sous réserve que les stades précoces du développement aient été optimisés, et que les conditions thermiques ne dépassent pas un seuil au delà duquel la réponse dynamique des embryons devient impossible (Introduction, Fig.1).

Les données sur la phénologie de la reproduction démontrent en revanche que l'accès à T_{set} est important pour toutes les périodes considérées en garantissant une accélération du développement avec des naissances plus précoces dans le groupe optimal. La date de naissance est un paramètre important notamment dans un contexte tempéré où le temps d'activité avant l'hiver peut être essentiel pour la survie des jeunes, et possiblement la récupération énergétique des femelles. De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance d'une naissance précoce (Olsson and Shine 1998 ; Shine and Elphick 2001 ; Altwegg *et al.* 2005). Ainsi, les effets thermiques maternels sur la phénologie et la qualité phénotypique présentent des dépendances contrastées selon les stades de développement.



2- La régulation maternelle : spécificités et contraintes

2-1- Des soins thermiques non-dépréciables

L'étude du comportement maternel démontre que les femelles fournissent des soins non-dépréciables à leurs jeunes. En effet, les choix thermiques et la durée de thermorégulation ne sont pas ajustés avec la taille de portée. Ces résultats sont étroitement liés à la nature spécifique de la sensibilité thermique des embryons (Fig.1) et du fait que la température n'est pas une ressource divisible. Ainsi, lorsque la femelle thermorégule, tous les embryons vont bénéficier des conditions thermiques et de l'exposition prolongée à T_{set} . En terme d'optimalité, cela signifie que l'investissement maternel est bénéfique pour l'ensemble des embryons exposés et ce, pour un effort maternel donné. Ces informations sont en accord avec le scénario de Farmer et notamment l'étape 1 de la régulation prénatale. La nature spécifique de la sensibilité des embryons et les bénéfices indépendants de la fécondité sont des composantes importantes pour comprendre la diversité des comportements de régulation des conditions prénatales chez les invertébrés et les vertébrés.

Ceci contraste fortement avec le cas des soins parentaux post-nataux qui sont généralement ajustés selon le nombre de jeunes (Shine and Bull 1979). Ainsi, chez les oiseaux et les mammifères la prise en charge des jeunes (approvisionnement en ressources) est directement dépendante de la fécondité. Des ajustements de l'effort parental ont ainsi été mis en évidence chez de nombreuses espèces selon la « valeur » de la reproduction en cours. Il semble donc que les soins pré et post-nataux diffèrent fondamentalement dans leur relation à la fécondité et donc la relation coûts-bénéfices.



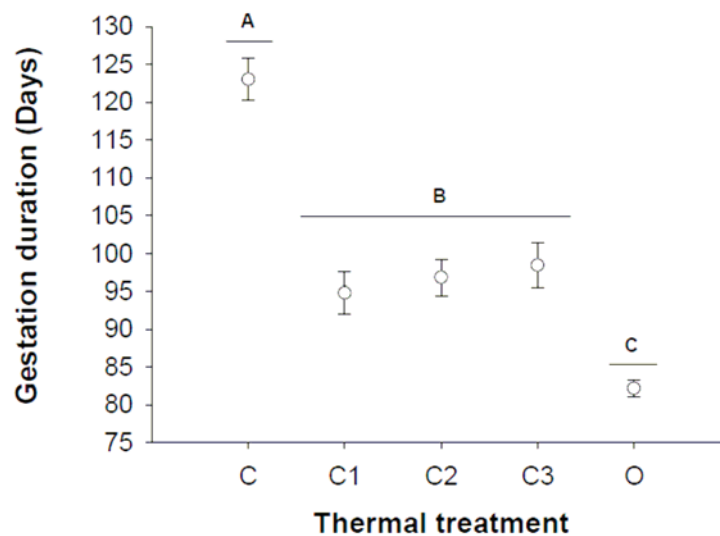


Figure 1. Impact des traitements thermiques sur la durée de gestation chez *Vipera aspis*. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards. Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différents.

2-2- Des contraintes élevées

2-2-1- Altération structurale et réduction des performances

Nous avons pu démontrer que la reproduction est associée à des coûts élevés chez les deux espèces, malgré des modes de reproduction contrastés. La vitellogénèse mobilise une quantité considérable d'énergie particulièrement pour les reproducteurs sur réserves lipidiques. Cependant les protéines sont également importantes pour subvenir aux besoins élevés en acides aminés, à la fois pour l'allocation dans les follicules en croissance mais aussi pour les besoins en glucose associés au jeûne prolongé. Notre suivi chez le python souligne que la reproduction induit une perte musculaire d'environ 34% chez les femelles reproductrices, avec une proportion de fonte musculaire plus importante durant la phase de vitellogénèse (64%) et une mobilisation des réserves protéiques lors de la phase de formation des œufs. Les coûts associés à l'incubation sont également significatifs. Cette altération structurale entraîne des coûts en termes de performances avec une force de traction réduite, notamment chez les femelles post-reproductrices. Ainsi, l'altération de ces performances s'avère écologiquement pertinente, dans un système où les animaux tuent leurs proies par constriction. Le comportement de couvain (Slip and Shine 1988 ; Shine *et al.* 1997b ; Aubret *et al.*



2003 ; Lourdais *et al.* 2007) semble également induire des coûts structuraux importants en prolongeant les contraintes énergétiques de la reproduction (jeûne obligatoire).

Les résultats obtenus chez les vipères sont comparables. A l'ovulation, les femelles reproductrices présentent une condition musculaire plus faible associée à une force altérée, en comparaison avec les non-reproductrices. Nous observons un impact structural progressif de la gestation sur la musculature. Sur le plan énergétique, cette fonte témoigne d'une mobilisation protéique en relation avec le jeûne (Cherel *et al.* 1988, 1992 ; Cherel and Grocolas 1999 ; Lourdais *et al.* 2004a), et d'une augmentation du métabolisme liée aux embryons en développement et à la thermorégulation plus prononcée (Ladyman *et al.* 2003).

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence des coûts de reproduction élevés chez deux espèces qui présentent pourtant des modes de reproduction différents. La dynamique des coûts de la reproduction semble également similaire et compromet la balance énergétique et les performances des femelles. La prise en charge du développement des embryons induit donc des coûts marqués chez les mères. Malgré l'ampleur de ces contraintes, il convient de souligner que les vipéridés et les boïdés sont spécialisés dans la capitalisation de la ressource (lipides) avec des besoins énergétiques de base très faibles (i.e. « low energy specialist ») ainsi qu'une fréquence d'alimentation réduite. Ce contexte spécifique (découplage entre acquisition et allocation de la ressource) est probablement facilitateur à l'expression de soins prénataux prolongés.

2-2-2- Contraintes hydriques

En parallèle, un suivi échographique régulier a permis de quantifier l'importance de la ressource hydrique chez l'espèce vivipare. Le budget hydrique des embryons est une composante majeure car l'eau est requise pour l'assimilation des réserves vitellines et est incorporée dans les tissus en formation (Ackerman and Lott, 2004 ; Lourdais *et al.* 2007 ; Du and Shine 2008). Il existe 3 sources potentielles d'eau pour la croissance : 1) l'eau métabolique, issue de la respiration des embryons, 2) l'eau stockée dans l'albumen, 3) l'eau acquise via les échanges avec l'environnement (ou la mère). Une incorporation importante d'eau a également été démontrée chez des espèces vivipares avec des travaux sur les lézards (Thompson 1977, 1981 ; Dauphin-Villemant and Xavier 1986). Nos résultats originaux sur *V. aspis* ont mis en évidence une prise volumique d'environ 200% dans la taille des œufs au cours du développement. Cette prise est requise pour la mobilisation du vitellus nécessaire à la croissance embryonnaire. Elle est associée au dernier tiers du développement, c'est à dire la période de croissance fœtale. L'allocation maternelle de l'eau est directement proportionnelle à la fécondité.



La ressource hydrique est limitante comme le souligne la relation négative entre la prise en eau moyenne par embryon et la fécondité.

En parallèle, les femelles gestantes sélectionnent des températures corporelles élevées qui les exposent à des pertes hydriques importantes notamment respiratoires (Mautz 1980, 1982). Les résultats sur l'osmolalité sont en cours d'analyse mais notre prédiction principale est que la gestation est à l'origine de coûts hydriques importants avec un état déshydraté induit par les besoins des embryons, notamment lors de la croissance fœtale. L'évolution du taux de corticostérone observée pourrait refléter cette mobilisation hydrique croissante et possiblement la déshydratation des femelles gestantes au fur et à mesure que la prise en eau des œufs augmente (Dauphin-Villemant and Xavier 1986), puisque la variation observée ne semble ni être expliquée par l'évolution des contraintes énergétiques, ni exprimer un sous-bassement hormonal du comportement maternel. En effet, la corticostérone peut être liée à des processus d'osmorégulation, notamment du sodium et du potassium (Harvey *et al.* 1984 ; Bentley 2002).

Ces données permettent donc de révéler des compromis associés à la gestation. Ainsi, la régulation thermique est associée à des modifications comportementales fortes. En parallèle, l'état de gestation compromet la musculature et la force des femelles. Enfin, la thermorégulation renforcée expose les femelles aux pertes hydriques alors que ces dernières doivent mobiliser une quantité d'eau importante notamment en fin de vie embryonnaire. Ceci pourrait être une contrainte majeure, notamment sous les climats tempérés où les étés peuvent s'avérer parfois extrêmement secs. Des résultats partiellement équivalents ont été obtenus chez le python. La reproduction et les soins aux œufs sont assortis de contraintes énergétiques et structurales fortes. La phase d'allocation de l'eau dans les œufs s'effectue avant la ponte lors de la gravidité. En revanche, lors de l'incubation, la femelle ne s'expose pas à des pertes hydriques renforcées mais assure uniquement un rôle de régulation des échanges hydriques des œufs (Lourdais *et al.* 2007 ; Stahlschmidt *et al.* 2008b). Il s'agit là d'un contraste important entre les deux modes de reproduction.

2-3- Besoins hydriques : un conflit potentiel ?

2-3-1- Sensibilité hydrique des embryons

La sensibilité hydrique embryonnaire chez les reptiles est un phénomène connu depuis très longtemps chez les espèces ovipares. Les conditions hydriques d'incubation affectent de nombreux traits phénotypiques chez les jeunes (Deeming and Fergusson 1991 ; Deeming 2004) et permettent également d'assurer un bon développement des embryons (Ji and Braña 1999 ; Lorenzon *et al.* 2001 ;



Booth 2004 ; Stahlschmidt *et al.* 2011). La sélection de sites de pontes appropriés chez les espèces ovipares reflète un choix sur des paramètres thermiques et hydriques (Burger and Zappalorti 1986 ; Packard 1991 ; Shine and Harlow 1996 ; Stahlschmidt *et al.* 2011). Cependant, les nids plus chauds sont généralement plus secs et les nids plus froids, plus humides ce qui pourrait imposer des compromis dans la sélection de sites de pontes appropriés (Shine 2004a). Enfin, il a été démontré que des conditions hydriques défavorables pouvaient favoriser la durée de rétention des œufs chez certains lézards ovipares (Mathies and Andrews 1996).

Chez les espèces vivipares, la prise en eau des œufs est massive et s'effectue principalement en fin de développement (environ 200%). Nos données indiquent que la femelle doit faire face à une situation complexe afin de subvenir aux besoins thermiques des embryons, mais ce qui l'expose à des pertes hydriques accrues. Des compromis seraient ainsi susceptibles d'émerger entre la nécessité de thermoréguler et donc d'atteindre des températures élevées, et les besoins hydriques des embryons. Les femelles vivipares pourraient donc ajuster leur comportement et le choix des habitats en fonction de ces contraintes, afin d'optimiser la thermorégulation et réduire les pertes hydriques. Des données préliminaires obtenues sur le terrain suggèrent que de tels ajustements existent avec la sélection de micro-habitats plus chauds et humides par les femelles gestantes.

Enfin de forts contrastes semblent émerger entre la régulation maternelle thermique et hydrique. La régulation thermique est un soin non dépréciable alors que la régulation de l'approvisionnement en eau est directement dépendante de la fécondité. De plus si la sensibilité thermique est principalement marquée en début de développement, la prise en eau se fait essentiellement lors de la vie fœtale.

2-2-2- Conflit hydrique fœto-maternel

Tandis que les effets maternels affectent à la fois la fitness des mères et des enfants, la sélection va typiquement maximiser la fitness de la mère plutôt que celle des jeunes, particulièrement chez les espèces sans soins maternels post-nataux chez qui l'évolution des stratégies d'opposition des jeunes sont moins susceptibles d'évoluer (Smith and Fretwell 1974 ; Trivers 1974 ; Bernardo 1996 ; Marshall *et al.* 2006 ; Marshall and Uller 2007). Les conflits parents-enfants ont généralement été considérés chez les espèces à soins parentaux post-nataux, au travers d'interactions comportementales, telles que la sollicitation ou les fraticides (Trivers 1974 ; Clutton-Brock 1991 ; Mock and Parker 1997).

Plus récemment, des évidences de conflits physiologiques ont été décrites entre les mères et les jeunes avant la parturition, notamment chez l'humain (Haig 1993). Un tel conflit physiologique avait déjà été suggéré par Wells (2003), dans le cadre de l'hypothèse du phénotype économe



(« Thrifty Phenotype Hypothesis »), où l'orientation métabolique du fœtus donnée par la mère, ne correspondrait pas une manipulation adaptative en vue de préparer le futur individu à des conditions alimentaires restreintes, mais une manipulation de la mère en vue de diminuer le conflit énergétique entre son embryon et elle-même, en situation de carence alimentaire. Ainsi Crespi and Semeniuk (2004) ont postulé que de tels conflits étaient généralisables pendant la vie embryonnaire, notamment chez les espèces vivipares et ont formulé : « the viviparity conflict hypothesis ». L'évolution de la viviparité engendre des bénéfices clairs aux jeunes et pourrait imposer des coûts reproducteurs chez les femelles. Les bénéfices aux jeunes incluent une augmentation de la survie et de la qualité phénotypique. Ces bénéfices contrastent avec les nombreux coûts associés à la reproduction vivipare. Ces coûts comprennent une capacité de chasse réduite et une susceptibilité à la prédation plus élevée, une perte totale de la portée avec la mort, des coûts énergétiques élevés et une fécondité plus faible (Shine 1985, 1989 ; Heulin *et al.* 1994 ; Blackburn 1995, 2000 ; Schwarzkopf 1996 ; Bonnet *et al.* 2002). Ainsi les bénéfices phénotypiques de la viviparité envers les mères apparaissent peu nombreux et peuvent inclure une plus grande efficacité énergétique chez les formes placentaires (Wourms 1993). Dans ce contexte, ces auteurs suggèrent que chez les formes vivipares, les capacités des jeunes à manipuler leur mère sont bien plus élevées avant la naissance qu'après, en raison du contact physiologique prolongé.

Dans notre étude, les femelles présentent un fort investissement physiologique et comportemental en dépit des contraintes à priori importantes de la gestation. Il se pourrait que les femelles puissent être bénéficiaires, dans un contexte où les bénéfices semblent biaisés vers les jeunes en développement : tout d'abord, rappelons que le fait de maintenir des températures élevées durant la gestation diminue la durée de gestation et des dates de naissance précoces confèrent un avantage aux jeunes. Cependant, il se pourrait que les femelles bénéficient également d'un relargage plus précoce du « fardeau » physique de la portée (Shine and Olsson 2003 ; Shine 2004a).

Shine (2004a) propose également l'existence d'un conflit sur le volume de l'eau séquestrée. L'observation que la prise en eau est sévèrement restreinte dans les œufs retenus *in utero* au delà du moment normal de l'oviposition, apparemment lié à des contraintes volumétriques de l'oviducte maternel (Qualls and Andrews 1999), vont dans le sens de l'existence d'un tel conflit, avec une course aux armements possible entre la mère et ses embryons (i.e. limitation du volume physique disponible pour le développement des embryons du côté maternel afin de limiter une charge physique trop importante). Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence l'existence de besoins hydriques importants pour les embryons en fin de développement, de même qu'une transpiration cutanée accrue chez les femelles reproductrices, notamment aux températures préférées. Contrairement à la régulation thermique, la prise en charge hydrique semble dépréciable



puisque nous avons montré que l'investissement en eau était proportionnel au nombre de jeunes en développement (Fig.2). Cette situation pourrait être à l'origine de l'existence d'un conflit hydrique potentiel entre la mère et ses embryons en développement, notamment en fin de gestation, où les demandes embryonnaires semblent plus importantes.

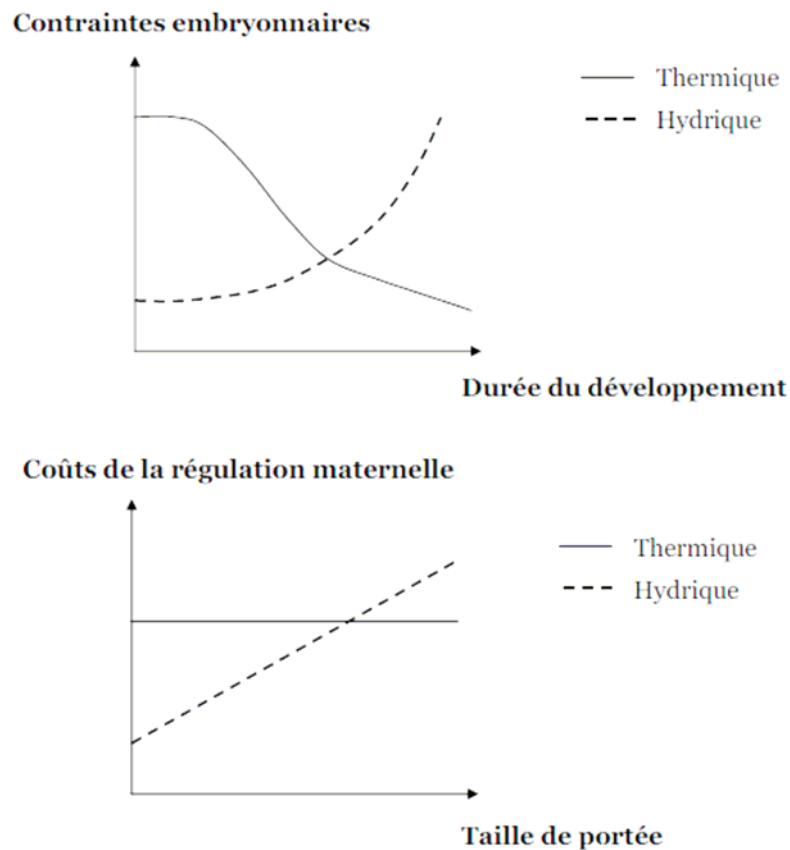


Figure 2. Evolution des besoins hydriques et thermiques des embryons au cours du développement, et la nature des coûts liée à leur prise en charge. (a) Les contraintes embryonnaires thermiques diminuent au cours du développement avec une sensibilité plus accrue des premiers stades. Au contraire, les contraintes hydriques apparaissent plus fortes en fin de développement, suggérée par une prise en eau massive à cette période ; (b) En fonction de la nature des contraintes embryonnaires (thermique ou hydrique), la nature des coûts associés à la régulation maternelle varie : la régulation thermique se traduit par des soins non dépréciables puisque la chaleur fournie par la thermorégulation maternelle est indivisible. Au contraire les besoins hydriques des embryons requièrent une allocation spécifique pour chaque œuf avec une division de la ressource hydrique (soins dépréciables).

L'existence d'un tel conflit pourrait ainsi expliquer les situations « intermédiaires » sur le continuum observé entre oviparité et viviparité. Par exemple, certaines espèces de serpents vivant dans des milieux xériques, telle que la vipère à cornes, *Cerastes cerastes* (Fig.3), pondent des œufs à un stade relativement tardif et les œufs terminent les 5 à 6 semaines de développement restantes, hors du corps de la mère (Fig.4). Ce mode de reproduction pourrait correspondre à un relargage de la ponte au moment où les contraintes hydriques s'avèreraient plus importantes, dans un milieu où la ressource hydrique est limitante. Il en va de même pour des boas des sables (genre *Eryx*) également adaptés aux zones arides.



Figure 3. La vipère à cornes, *Cerastes cerastes*, vit dans les déserts d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient.



Figure 4. La vipère à cornes, *Cerastes cerastes*, pond des œufs à un stade embryonnaire avancé. Les œufs éclosent 5 à 6 semaines après la ponte.

A l'opposé, de nombreux vipéridés tropicaux sont ovipares, dans des milieux chauds où les contraintes thermiques semblent réduites (Fig.5). Ce phénomène pourrait être associé aux contraintes hydriques maternelles qui aurait favorisé un mode de reproduction ovipare (avec soins aux œufs) et où la femelle s'affranchit de la prise en charge hydrique des œufs. De manière contre intuitive, il semblerait que chez ces espèces tropicales, les pertes d'eau transcutanées soient très importantes (Lourdais O., communication personnelle). Cette faible étanchéité cutanée pourrait traduire une sensibilité aigüe à la déshydratation chez ces espèces. Le comportement de couvaison observé chez les femelles pourrait refléter une régulation hydrique maternelle fine dans un milieu humide.

Ainsi contraintes hydriques et contraintes thermiques du développement pourraient avoir orienté l'évolution des modes de reproduction et des comportements parentaux divers, balançant



les conflits fœto-maternels afin de minimiser les contraintes maternelles et optimiser les bénéfices des embryons en fonction des contraintes écologiques du milieu.

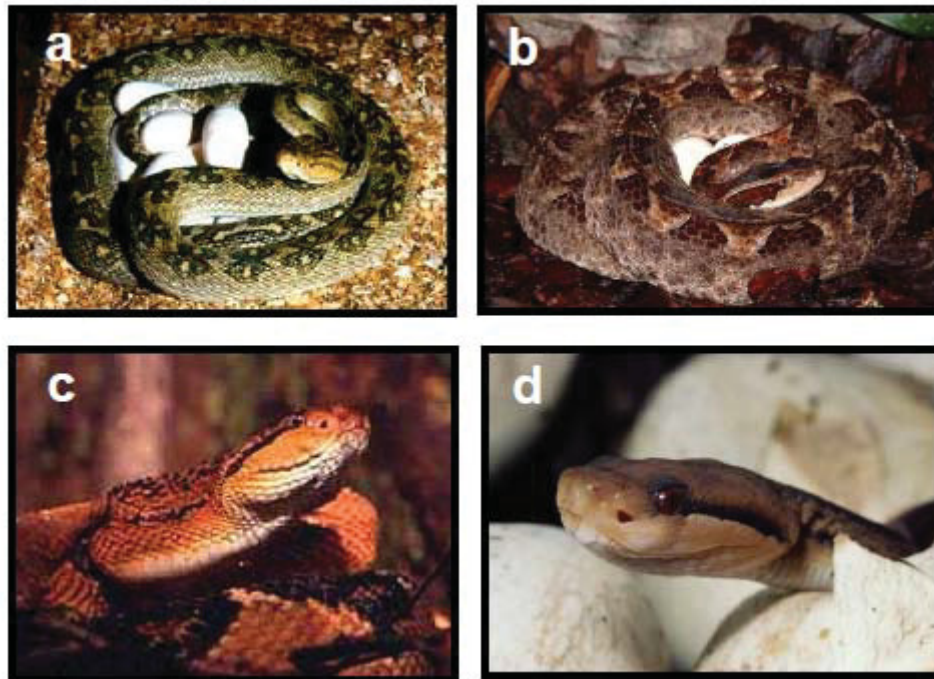


Figure 5. Exemples de vipéridés tropicaux ovipares. (a) Femelle Fer de lance, *Protobothrops flavoviridis* couvant ses œufs, (b) Femelle Mocassin à lèvres roses, *Calloselasma rhodostoma*, couvant ses œufs, (c) Femelle Maître de la brousse, *Lachesis muta*, et un nouveau-né à l'éclosion (d).

3- Evolution des soins parentaux

La sensibilité thermique des premiers stades du développement est probablement une condition préexistante qui aurait favorisé l'évolution de la rétention des œufs (Qualls and Andrews 1999; Braña and Ji 2007, Shine 2004a) et l'émergence d'une régulation parentale prénatale. Cette association a offert un contexte favorable pour la complexification des soins parentaux. Dans notre étude, la régulation thermique des conditions précoces (thermorégulation en phase de gravidité) pourrait avoir constitué un trait ancestral chez les pythons qui aurait ainsi favorisé l'extension vers un investissement maternel après l'oviposition (couvaion). Ainsi la couvaion chez les pythons pourrait constituer une alternative complète et évolutivement stable dans les systèmes de soins parentaux, avec pour bénéfice un affranchissement de conflit fœto-maternel hydrique.

La transition vers la viviparité a possiblement impliqué l'extension de ces comportements préexistants, comme cela a été mentionné dans la « Pre-adaptation hypothesis » (Shine 2006). La



viviparité a émergé de manière répétée (>105) chez les Squamates (Shine and Bull 1979 ; Shine 1995 ; Blackburn 2006). Son évolution serait apparue par transitions avec une rétention de plus en plus prolongée des « œufs » dans le corps de la femelle, selon le concept du continuum oviparité-viviparité (Packard *et al.* 1977 ; Shine and Bull 1979 ; Andrews and Mathies 2000), associée à des modifications morphologiques et physiologiques (Guillette 1991, 1993; Andrews 2002; Heulin *et al.* 2002; Blackburn 2005, 2006). Le bénéfice initial invoqué serait une accélération de la durée de développement (« Cold Climate Hypothesis »), notamment sous les climats froids où les contraintes thermiques environnementales sont fortes (Tinkle and Gibbons 1979 ; Shine and Bull 1979 ; Shine 1985 ; Lynch 2009). Cependant, l'association entre le mode de reproduction vivipare et les zones climatiques froides peut être secondaire. La thermorégulation maternelle permettrait de tamponner les effets de conditions thermiques défavorables et fournirait des températures corporelles plus élevées que ne seraient les températures des sites de ponte disponibles dans le milieu (Shine 2004b). Des études ont ainsi démontré que la fréquence de distribution des températures corporelles des femelles gestantes tendait à être bimodale, avec une grande proportion de temps passé dans une gamme étroite proche de la température moyenne corporelle préférée. Au contraire, les profils de température des nids présentaient des distributions plus larges, reflétant un réchauffement et un refroidissement graduel (Andrews 2000; Shine 2004b).

Par ailleurs, des bénéfices associés à la viviparité, notamment en terme de qualité phénotypique des jeunes ont été invoqués (« maternal manipulation hypothesis » Shine 1995, 2006). Notre étude sur la vipère aspic ne nous permet certes pas de tester l'évolution de la viviparité mais laisse cependant suggérer l'importance de la régulation des deux premiers tiers du développement, durant lesquels les processus organisationnels majeurs ont lieu, ce qui pourrait expliquer une rétention de plus en plus importante. Enfin la rétention des stades finaux du développement aurait pu être bénéfique notamment en termes d'accélération du développement, et de viabilité des jeunes (Lourdais *et al.* 2004b ; cette étude).

Nos résultats s'intègrent bien dans le cadre de la première étape du scénario de Farmer. La prise en charge embryonnaire (soins parentaux prénataux) est prévalente chez les vertébrés et la stabilisation des conditions du développement a probablement constitué une étape obligatoire dans la transition vers une prise en charge maternelle post-natale (endothermie et soins parentaux post-nataux) avec l'approvisionnement aux jeunes et les contraintes énergétiques associées (endurance, performances locomotrices). Il convient de souligner que les vertébrés ectothermes (notamment les serpents) sont spécialisés dans une faible consommation énergétique. Ce contexte spécifique a probablement favorisé un investissement maternel marqué mais se limitant à la régulation des conditions prénatales.



4- Perspectives expérimentales

4-1- Mise en évidence d'une sensibilité thermique secondaire

Nos travaux ont mis en évidence une grande sensibilité thermique des premiers stades du développement embryonnaire. Cependant, si la sensibilité thermique semble être un trait ancestral à l'origine de l'émergence des soins parentaux (Farmer 2000), les sensibilités thermiques des embryons pourraient être un caractère secondaire apparu de manière subséquente à la prise en charge maternelle. Ainsi la sensibilité des embryons pourrait en partie refléter le degré du contrôle parental, avec une adaptation aux régimes thermiques maternels (Lorenzon *et al.* 2001). Ainsi, les embryons des espèces endothermes sont bien moins exposés aux fluctuations thermiques extérieures puisqu'ils bénéficient de l'homéothermie parentale. En revanche, ils sont particulièrement sensibles aux fluctuations de leur environnement interne. Par exemple, chez les oiseaux si les températures d'incubation peuvent fluctuer sans compromettre la survie des embryons en développement, les gammes de températures non létales sont étroites (Deeming and Fergusson 1991 ; Durant *et al.* 2010). Au contraire, les embryons d'ectothermes ovipares peuvent supporter de très grandes variations de températures, ceci probablement lié au caractère fluctuant et parfois imprédictible de l'environnement pendant la phase d'incubation (Ackerman and Lott 2004). Selon l'hypothèse de sensibilité embryonnaire secondaire, la faible tolérance des embryons pourrait être en partie conséquence à l'émergence des soins parentaux et du contrôle thermique du développement. L'examen de cette hypothèse impose de s'affranchir de contraintes phylogénétiques.

Des pistes de recherches futures consisteraient à étudier des espèces à mode de reproduction bimodal pour tester une telle hypothèse. Une manipulation possible serait d'appliquer des conditions thermiques défavorables à différents stades de gestation et de comparer les effets sur le phénotype des jeunes des deux espèces. Les prédictions seraient que la sensibilité des stades précoces du développement (phase de gravidité (pré-ponte) chez la forme ovipare et 1^{er} tiers de la gestation chez la forme vivipare) soient identiques chez les deux modes de reproduction. En revanche, on s'attendrait à ce que la sensibilité des stades plus tardifs du développement (deux derniers tiers) soit plus importante chez la forme vivipare.

4-2- Mise en évidence d'une sensibilité hydrique stade-dépendent



Si la sensibilité hydrique des embryons est avérée, il se pourrait que sa prévalence varie fortement selon les stades de développement. Ainsi, il serait pertinent de conduire des expérimentations de contraintes hydriques à différents stades de gestation. Aux regards de nos résultats, notre prédiction se dirige vers une sensibilité plus prononcée aux stades les plus tardifs du développement (vie fœtale), c'est à dire à l'opposé de ce qui a été démontré pour les contraintes thermiques. Une telle expérimentation pourrait facilement être conduite chez les vipéridés (*V. aspis*) en limitant l'apport en eau au premier, second et dernier tiers du développement. Les conséquences de ces restrictions sur la qualité des jeunes pourraient ainsi être évaluées.

Cependant, il se pourrait également que conditions hydriques et thermiques agissent en interaction au cours du développement, et une manipulation conjuguée à la fois des contraintes hydriques et thermiques serait également envisageable.

4-3- Mise en évidence d'un potentiel conflit hydrique parent-enfant

Un conflit hydrique entre la mère et ses embryons serait susceptible d'émerger en conditions de déficit. Dans ce contexte, il serait intéressant de voir si l'allocation en eau dans les œufs est maintenue avec la même intensité. Pour tester cette hypothèse, une expérimentation possible serait de faire varier les quantités d'eau accessibles aux femelles (ou l'humidité du milieu) à différents stades de la gestation, et de voir si l'allocation d'eau des femelles vers les embryons est maintenue, notamment en fin de gestation lorsque les demandes hydriques embryonnaires semblent importantes. La mesure volumique des œufs étant accessible grâce à l'outil échographique, et la déshydratation maternelle par le dosage des osmolites plasmatiques.

5– Ouverture conceptuelle : épigénétique et transmission héréditaire des influences environnementales

5-1- Epigénétique

Des travaux récents suggèrent que la régulation parentale pourrait avoir un impact transgénérationnel sur les descendants, à travers des changements héréditaires dans l'épigénome induits par l'environnement (Fish *et al.* 2004 ; Weaver *et al.* 2006 ; Dolinoy *et al.* 2007). La régulation des conditions de développement offre donc une interface fonctionnelle clé entre le génome, l'épigénome et la réalisation des phénotypes. Les conséquences de la régulation parentale sur la



fitness pourraient largement surpasser l'échelle temporelle traditionnellement considérée (c'est-à-dire, la génération suivante) et engloberaient plusieurs générations.

L'épigénétique se réfère à des changements héréditaires dans l'expression des gènes qui n'impliquent pas de modifications dans la séquence d'ADN (Kiefer 2007). La différenciation d'un individu dans l'espace et dans le temps a lieu principalement via des mécanismes épigénétiques, c'est-à-dire des changements des patrons de méthylation de la cytosine et des marques de la chromatine de l'ADN. Ainsi, la méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle ($-CH_3$) à la place d'un atome d'hydrogène (Fig.6), généralement sur la base azotée Cytosine. La méthylation modifie les interactions entre les protéines et l'ADN et il semblerait que la méthylation des régions régulatrices corresponde à l'inactivation des gènes.

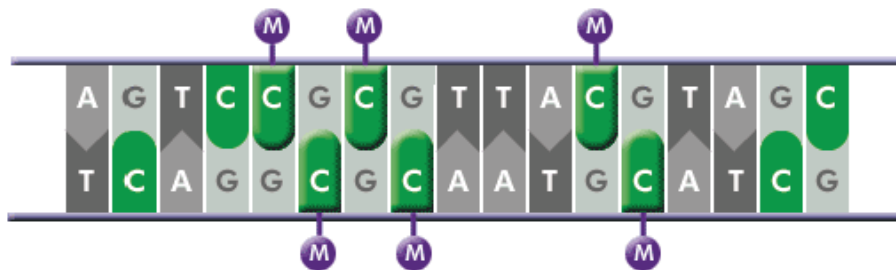


Figure 6. Exemples de méthylation d'une séquence de l'ADN. Les groupements méthyle (M) se fixent généralement sur les bases azotées Cytosine.

La méthylation de la cytosine agit en éteignant les gènes de régulation, tandis que les perturbations environnementales sont supposées enlever ces méthylations. Ainsi, la compréhension des interactions gènes-environnement (GxE) nécessite de considérer à la fois la génétique et les mécanismes épigénétiques (approche eco-evo-devo).

L'épigénome est sensible aux changements dans la régulation/dérégulation pendant le développement néonatal, et est bien plus sensible aux perturbations environnementales pendant l'embryogénèse, qui est une période de synthèse importante d'ADN (Jablonka and Lamb 2005 ; Peaston and Whitelaw 2006). La majorité de ces évidences provient de travaux récents en toxicologie et sur la sensibilité aux maladies chez les humains. Par exemple, chez les humains, l'acide folique est essentiel durant le développement fœtal précoce et représente l'un des plus importants donneurs de groupement méthyle (Dolinoy *et al.* 2007).

5-2- Influences environnementales précoces et programmation épigénétique



Un nombre croissant d'évidences épidémiologiques montre qu'une exposition à des facteurs extrinsèques, à des stades précoces de la vie, peut affecter le développement et augmenter la susceptibilité à développer diverses maladies chroniques, telles que des cancers, des maladies cardiovasculaires, de l'obésité, ainsi que des désordres comportementaux (Gluckman *et al.* 2007). Une diversité de facteurs extrinsèques peut affecter les patrons épigénétiques et la programmation, notamment le statut nutritionnel, les produits xénobiotiques, ainsi que des indices comportementaux (Crews *et al.* 2007 ; Dolinoy *et al.* 2007 ; Jirtle et Skinner 2007 ; Fig.7). Ces études indiquent également que les changements épigénétiques induits peuvent être transmis aux générations suivantes non-exposées. Ces éléments défient la vision conventionnelle de la génétique et de l'hérédité. Les théories émergentes placent l'épigénétique comme une révolution de la pensée évolutive et soutiennent la nécessité d'une synthèse qui intégrerait le développement et la régulation épigénétique (Gilbert *et al.* 1996, Johnson and Porter 2001).

5-3- Transmission héréditaire des phénotypes acquis : un nouvel apport dans la compréhension de la régulation maternelle du développement ?

Les influences environnementales pendant la vie embryonnaire comprennent un vaste ensemble de facteurs nutritionnels, chimiques et physiques qui peuvent influencer l'expression de l'épigénome et par conséquent le développement intégré du phénotype. Les échanges de nutriments pendant la vie fœtale peuvent programmer les systèmes métaboliques à l'état adulte (Kaati *et al.* 2002 ; Mc Gowan *et al.* 2008). Des études ont également démontré que le soin parental pouvait profondément affecter les patrons de méthylation et influencer la réponse au stress et le comportement futur des jeunes (Fish *et al.* 2004 ; Weaver *et al.* 2006). Ainsi les effets d'un environnement adverse peuvent être transmis par les interactions entre une mère et son jeune. Par exemple chez le rat, le degré de toilettage maternel influe sur la réponse comportementale de défense des jeunes (Weaver *et al.* 2006), notamment au travers de modifications du marquage de l'épigénome (Fig.7).



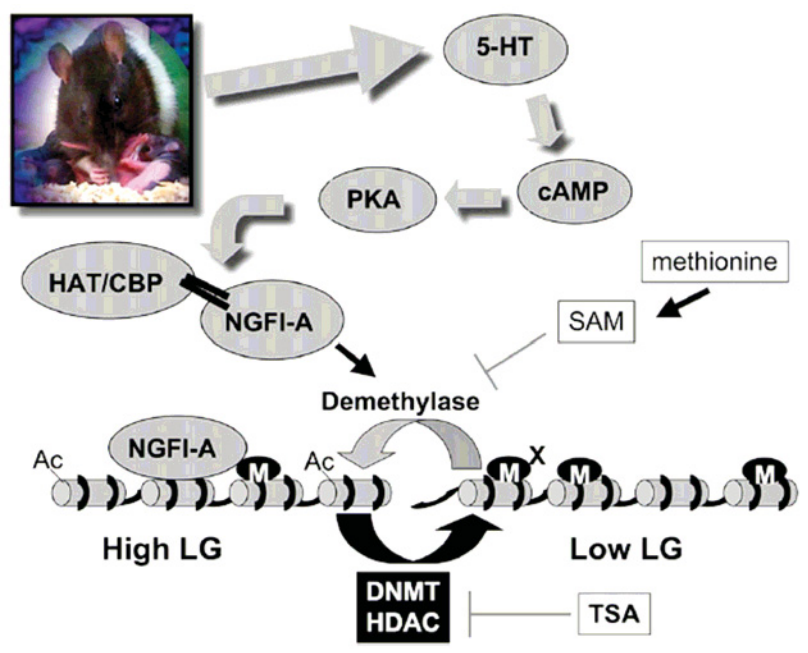


Figure 7. Reprogrammation épigénétique liée au soin maternel. Le léchage et le toilettage par la mère (LG) chez le rat déclenche l'activation des récepteurs 5-HT dans l'hippocampe, conduisant à l'augmentation des AMPc intracellulaires, l'activation des facteurs de transcription NGFI-A et le recrutement des HAT CBP vers l'exon promoteur 1 GR. L'acétylation des queues des histones facilite la déméthylation. Chez les jeunes issus d'un faible LG, ce processus est réduit en comparaison aux jeunes issus de mères à LG élevé, conduisant à une programmation épigénétique différentielle du promoteur GR.

Source : Mc Gowan *et al.* 2008

La pertinence des effets épigénétiques devrait directement contribuer à une meilleure compréhension des transitions évolutives majeures et des traits convergents. Dans ce contexte, la qualité des conditions précoces de développement est un aspect clé car la perturbation de la reprogrammation épigénétique (changement des marques épigénétiques pendant le développement) normale a des impacts sévères sur le développement de l'embryon (Li 2002). La considération des mécanismes épigénétiques en biologie évolutive est un phénomène récent (Gluckman *et al.* 2007) mais la pertinence de paramètres abiotiques cruciaux tels que la température, n'a pas encore été considérée. La compréhension de l'impact des conditions thermiques sur l'épigénome a attiré une attention scientifique limitée sans doute parce que la plupart des études se sont focalisées sur des espèces endothermes ayant une haute sélectivité thermique. Des avancées récentes chez les plantes (Cai and Chinnappa 1999 ; Jaenisch and Bird 2003) suggèrent que l'influence thermique sur l'épigénome existe et démontrent ainsi clairement la nécessité d'une étude détaillée chez les vertébrés ectothermes. Dans ce contexte, deux pistes de recherche intégrant la régulation parentale pourraient être envisagées :



(1) Héritabilité transgénérationnelle de la variation phénotypique

Il serait ainsi envisageable d'examiner jusqu'à quel point, les effets de perturbations thermiques pendant le développement pourraient montrer une transmission transgénérationnelle chez les reptiles.

(2) Exploration des mécanismes épigénétiques comme sous-bassement de la régulation maternelle

La méthylation de l'ADN constitue un mécanisme épigénétique possible qui pourrait être affecté par la température. Il serait ainsi pertinent de clarifier l'influence de la température sur les patrons de méthylation de l'ADN, dans des régions épigénétiquement labiles chez les squamates. Des mort-nés de vipère aspic, issus des différents traitements thermiques sont disponibles et pourraient fournir une base préliminaire à ces explorations futures.



Crédit photos



Page 3 : Photo © Guido Mocafico

Page 31 : Photo 9a : © Paul Zahl

Photo 9b : © NPHA/SuperStock.

Photo 9c : © 2002 MBARI

Page 39 : Photo 13 : © L.J.Vitt 1998.

Page 51 : Photo 1 : © Alexandre Boissinot

Page 52 : Photo du schéma : © Sophie Lorioux

Page 54 : Photo 5 : © Sophie Lorioux

Page 56 : Photo du schéma : © Sophie Lorioux

Page 59 : Photo : © Hervé Lelièvre

Page 66 : Photo : © Emeline Audebeau

Page 71 : Photos 20 et 21 : © Sophie Lorioux

Photo 22 : © Olivier Lourdais

Page 73 : Photo : © Sophie Lorioux

Page 76 : Photo : © Sophie Lorioux

Page 136 : Photo : © Sophie Lorioux

Page 164 : Photo python : © Sophie Lorioux

Photo vipère : © Alexandre Boissinot

Page 215 : Photos 5a et 5b : © Mickael Guillon

Page 238 : Photo 3 : © Michel Aymerich

Photo 4 : © Jon Kendrick

Page 239 : Photo 5a : © S.V. Kudryavtsev

Photo 5b © : Bo Johnsson

Photo 5c : © Ali Kausher

Photo 5d : © 2005-2011-National Geographic



Bibliographie



- Ackerman R.A. and Lott D.B.** 2004. Thermal, hydric and respiratory climate of nests. In Deeming D.C. Reptilian incubation, Nottingham University Press, Pp 15-43.
- Agrawal A.A., Laforsch C. and Tollrian R.** 1999. Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* 401, 60-63.
- Almli L. and Burghardt G.M.** 2006. Environmental enrichment alters the behavioral profile of ratsnakes (Elaphe). *Journal of Applied Animal Welfare Science* 9, 85-109.
- Altwegg R., Dummermuth S., Anholt B.R. and Flatt T.** 2005. Winter weather affects asp viper *Vipera aspis* population dynamics through susceptible juveniles. *Oikos* 110, 55-66.
- Amo L., López P. and Martín J.** 2003. Risk level and thermal costs affect the choice of escape strategy and refuge use in the wall lizard, *Podarcis muralis*. *Copeia* 4, 899-905.
- Amo L., López P. and Martín J.** 2004a. Multiple predators and conflicting refuge use in the wall lizard, *Podarcis muralis*. *Ann. Zool. Fennici* 41, 671-679.
- Amo L., López P. and Martín J.** 2004b. Trade-offs in the choice of refuges by common wall lizards: do thermal costs affect preferences for predator-free refuges? *Canadian Journal of Zoology* 82, 897-901.
- Amo L., López P. and Martín J.** 2007. Pregnant females lizards *Iberolacerta cyreni* adjust refuge use to decrease thermal costs for their body condition and cell-mediated immune response. *Journal of Experimental Zoology* 307A, 106-112.
- Andrews R. M.** 2000. Evolution of viviparity in squamate reptiles (*Sceloporus* spp.): a variant of the cold-climate model. *Journal of Zoology, London* 250, 243-253.
- Andrews R. M.** 2002. Low oxygen: A constraint on the evolution of viviparity in reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology* 75, 145-154.
- Andrew R. M.** 2004. Embryonic development. In: Deeming DC, ed. Reptilian incubation: environment, evolution, and behaviour. Nottingham University Press, 75-102.
- Andrews R.M. and Donoghue S.** 2004. Effects of temperature and moisture on embryonic diapause of the veiled chameleon (*Chamaeleo calypstratus*). *Journal of Experimental Zoology* 301A, 629-635.
- Andrews R.M. and Mathies T.** 2000. Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. *Bioscience* 50, 227-238.
- Andrews R.M., Mendez-de la Cruz F.R.M. and Santa-Cruz M.V.** 1997. Body temperatures of females *Sceloporus grammicus*: thermal stress or impaired mobility? *Copeia* 1997, 108-115.
- Andrews R.M., Qualls C.P. and Rose B.R.** 1997. Effects of low temperatures on embryonic development of *Sceloporus* lizards. *Copeia* 1997, 827-833.
- Angelier F. and Chastel F.** 2009. Stress, prolactin and parental investment in birds: a review. *General and Comparative Endocrinology* 163, 142-148.
- Angilletta M.J.Jr.** 2009. Thermal acclimation. A theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press Inc., New York.
- Angilletta M.J. and Sears M.W.** 2000. The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Functional Ecology* 14, 39-45.
- Angilletta M.J.Jr., Niewiarowski P.H. and Navas C.A.** 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal Biology* 27, 249-268.
- Ar A., Belinsky A., Dmi'el R. and Ackerman R.A.** 2004. Energy provision and utilisation. In: Deeming DC, ed. Reptilian incubation: environment, evolution, and behaviour. Nottingham University Press, 143-185.



- Arthur W.** 2000. The concept of developmental reprogramming and the quest for an inclusive theory of evolutionary mechanisms. *Evolution and Development* 2, 49–57.
- Arthur W.** 2002. The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology. *Nature* 415, 757–64.
- Ashmore G. M. and Janzen F. J.** 2003. Phenotypic variation in smooth softshell turtles (*Apalone mutica*) from eggs incubated in constant versus fluctuating temperatures. *Oecologia* 134, 182–188.
- Aubret F., Bonnet X. and Maumelat S.** 2005a. Tail loss, body condition and swimming performances in tiger snakes, *Notechis ater occidentalis*. *Journal of Experimental Zoology*. 303, 894–903.
- Aubret F., Bonnet X., Shine R. and Maumelat S.** (2003). Clutch size manipulation, hatching success and offspring phenotype in the ball python (*Python regius*, Pythonidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 78, 263–272.
- Aubret F., Bonnet X., Shine R. and Maumelat S.** (2005b). Why do female ball python (*Python regius*) coil so tightly around their eggs? *Evolutionary Ecology Research* 7, 743–758.
- Aubret F., Shine R. and Bonnet X.** 2004. Adaptive developmental plasticity in snakes. *Nature (Lond.)* 431, 261–262.
- Auperin B. and Geslin M.** 2008. Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *General and Comparative Endocrinology* 158, 234–239.
- Avery R., Basker A. and Corti C.** 1993. “Scan” behaviour in *Podarcis muralis*: the use of vantage points by an active foraging lizard. *Amphibia-Reptilia* 14, 247–259.
- Badyaev A.V. and Ghalambor C.K.** 2001. Evolution of life histories along elevational gradients: trade-off between parental and fecundity. *Ecology* 82, 2948–1960.
- Barker D.J.P.** 2009. The origins of coronary heart disease in early life. *In* Henry C.J.K. and Ulijaszek S.J. 2009. Long-term consequences of early environment. Growth, development and the lifespan developmental perspective. Society for the study of human biology, Symposium series: 37. Cambridge University Press, New York.
- Barker D. and Barker T.** 1994. *Pythons of the world*, Volume 1, Australia Advanced Vivarium systems, lakeside, California. 171 pp.
- Bartholomew G. A. and Dawson W. R.** 1979. Thermoregulatory behaviour during incubation in Heermann’s gulls. *Physiological Zoology* 52, 422–437.
- Bateson P., Barker D., Clutton-Brock T., Deb D., D’Udine B., Foley R.A., Gluckman P., Godfrey K., Kirkwood T., Lahr M.M., McNamara J., Metcalfe N.B., Monaghan P., Spencer H.G. and Sultan S.E.** 2004. Developmental plasticity and human health. *Nature* 430, 419–421.
- Bauwens D. and Thoen C.** 1981. Escape tactics and vulnerability to predation associated with reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology* 50, 733–743.
- Bauwens D., Castilla A.M. and Mouton P.L.N.** 1999. Field body temperature, activity levels and opportunities for thermoregulation in an extreme microhabitat specialist, the girdled lizard (*Cordylus macropholis*). *Journal of Zoology* 249, 11–18.
- Bedford G.S. and Christian K.A.** 1998. Standard metabolic rate and preferred body temperatures in some Australian pythons. *Australian Journal of Zoology* 46, 317–328.
- Belinsky A., Ackerman R.A., Dmi’el R. and Ar A.** 2004. Water in reptilian eggs and hatchlings. *In* Deeming D.C. Reptilian incubation, Nottingham University Press, Pp 125–141.
- Bentley P.J.** 2002. Endocrines and osmoregulation: a comparative account in vertebrates, Vol.1. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Bernardo J.** 1996. Maternal effects in animal ecology. *American Zoologist* 36, 83–105.
- Berven K.A. and Gill D.E.** 1983. Interpreting geographic variations in life-history traits. *American Zoologist* 23, 85–97.
- Birchard G.F. and Reiber C.L.** 1995. Growth, metabolism and chorioallantoic vascular density of developing snapping turtles (*Chelydra serpentina*): Influence of temperature. *Physiological Zoology* 68(5), 799–811.



- Birkhead T.R., Fletcher F. and Pellatt J.** 1999. Nestling diet, secondary sexual traits and fitness in the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society London* 266, 385-390.
- Blackburn D.G.** 1995. Saltationist and punctuated equilibrium models for the evolution of viviparity and placentation. *Journal of Theoretical Biology* 174, 199–216.
- Blackburn D.G.** 2000. Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 127, 391–409.
- Blackburn D.G.** 2005. Amniote perspectives on the evolutionary origins of viviparity and placentation. In Grier H. and Uribe M.C. *Viviparous fishes*. New Life Publications, Homestead, Florida. p 301-322.
- Blackburn D.G.** 2006. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs* 20, 131-146.
- Bleu J., Massot M., Haussy C. and Meylan S.** 2011. Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard. *Proceedings of the Royal Society B*, doi: 10.1098/rspb.2011.0966.
- Blouin-Demers G., Kissner K.J. and Weatherhead P.J.** 2000. Plasticity in preferred body temperature of young snakes in response to temperature during development. *Copeia* 3, 841-845.
- Blouin-Demers G., Weatherhead P.J., Row J.R.** 2004. Phenotypic consequences of nest-site selection in black rat snakes (*Elaphe obsoleta*). *Revue canadienne de zoologie*, 82, 449-456
- Blumberg A.S., Lewis S.J. and Sokoloff G.** 2002. Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko, *Paroedura pictus*. *Journal of Experimental Biology* 205, 2777-2784.
- Bonnet X., Bradshaw S.D. and Shine R.** 1998. Capital versus income breeding: an ectothermic perspective. *Oikos* 83, 333-342.
- Bonnet X., Lourdais O., Shine R. and Naulleau G.** 2002. Reproduction in a typical capital breeder : costs, currencies and complications in the asp viper. *Ecology* 83, 2124-2135.
- Bonnet X., Naulleau G., Bradshaw D. and Shine R.** 2001b. Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake *Vipera aspis*. *General and Comparative Endocrinology* 121, 84-94.
- Bonnet X., Naulleau G., Shine R. and Lourdais O.** 1999. What is the appropriate timescale for measuring costs of reproduction in a 'capital breeder' such as the asp viper? *Evolutionary Ecology* 13, 485-497.
- Bonnet X., Naulleau G., Shine R. and Lourdais O.** 2000. Reproductive versus ecological advantages to larger body size in female *Vipera aspis*. *Oikos* 89, 509-518.
- Bonnet X., Naulleau G., Shine R. and Lourdais O.** 2001a. Short-term versus long-term effects of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos* 92, 297-308.
- Bonnet X., Llorioux S., Pearson D., Aubret F., Bradshaw D., Delmas V., Fauvel T.** 2011. Which proximate factor determines sexual size dimorphism in tiger snakes? *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 668-680.
- Boot D.T.** 2004. Artificial incubation in: Deeming DC, ed. *Reptilian incubation: environment, evolution, and behaviour*. Nottingham University Press, 253-263.
- Bordel R. and Haase E.** 2000. Influence of flight on protein catabolism, especially myofibrillar breakdown, in homing pigeons. *Journal of Comparative Physiology B* 170, 51-58.
- Both C. and Marvelde L.T.** 2007. Climate change and timing of avian breeding and migration throughout Europe. *Climate Research* 35, 93-105.
- Bouskila A. and Blumstein D.T.** 1992. Rules of thumb for predation hazard assessment: Predictions from a dynamic model. *American Naturalist* 139, 161-176.
- Bradshaw S.D.** 1997. *Homeostasis in desert reptiles*. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Braña F.** 1993. Shifts in body temperature and escape behavior of female *Podarcis muralis* during pregnancy. *Oikos* 66, 216-222.
- Braña F. and Ji X.** 2000. Influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance and early growth of hatchling wall lizards (*Podarcis muralis*). *Journal of Experimental Zoology* 286, 422-433.



- Braña F. and Ji X.** 2007. The selective basis for increased egg retention: early incubation temperature determines hatchling phenotype in wall lizards (*Podarcis muralis*). *Biological Journal of the Linnean Society* 92, 441-447.
- Brodie E.D.** 1989. Behavioral modifications as a means of reducing the cost of reproduction. *The American Naturalist* 134, 225-238.
- Brönmark C., Lakowitz T. and Hollander J.** 2011. Predator-induced morphological plasticity across local populations of a freshwater snail. *Plos one* 6, e21773. doi: 10.1371/journal.pone.0021773.
- Brown G. P. and Shine R.** 2004. Maternal nest-site selection and its consequences for offspring fitness in a tropical snake (*Tropidonophis mairii*, Colubridae). *Ecology* 85, 1627-1634.
- Brown G.P. and Weatherhead P.J.** 2000. Thermal ecology and sexual dimorphism in northern water snakes *Nerodia sipedon*. *Ecological Monographs* 70, 311-330.
- Bull J.J. and Shine R.** 1979. Iteroparous animals that skip opportunities for reproduction. *The American Naturalist* 114, 296-316
- Bull J.J., Gutzke W.H.N. and Bulmer M.G.** 1988. Nest choice in a captive lizard with temperature-dependent sex determination. *Journal of Evolutionary Biology* 2, 177-184.
- Burger J.** 1989. Incubation temperature has long-term effects on behaviour of young pine snakes (*Pituophis melanoleucus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 24, 201-207.
- Burger J.** 1991. Response to prey chemical cues by hatchling pine snakes (*Pituophis melanoleucus*): effects of incubation temperature and experience. *Journal of Chemical Ecology* 17, 1069-1078.
- Burger J.** 1998. Effects of incubation temperature on hatchling pine snakes: implications for survival. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43, 11-18.
- Burger J. and Zappalorti R.T.** 1988. Effects of incubation temperature on sex ratios in pine snakes: differential vulnerability of males and females. *American Naturalist* 132: 492-505.
- Burger J., Zappalorti R.T. and Gochfeld M.** 1987. Developmental effects of incubation temperature on hatchling pine snakes, *Pituophis melanoleucus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87 A, 727-732.
- Burger J., Zappalorti R.T. and Gochfeld M.** 1987. Developmental effects of incubation temperature on hatchling pine snakes *Pituophis melanoleucus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87A, 727-732.
- Burgess S.C. and Marshall D.J.** 2011. Temperature-induced maternal effects and environmental predictability. *Journal of Experimental Biology* 214, 2329-2336.
- Burghardt G. M.** 1977. Learning processes in reptiles. In C.Gans and D.W Tinkle (Eds), *The biology of the Reptilia* (Vol. 7, pp 555-681). London: Academic.
- Byrne M., Ho M., Selvakumaraswamy P., Nguyen H.D., Dworjanyn S.A. and Davis A.R.** 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proceedings of the Royal Society B* 276, 1883-1888.
- Cai Q. and Chinappa C.C.** 1999. Cytosine méthylation levels in the genome of *Stellaria longipes*. *Journal of Biosciences* 24, 27-33.
- Canals M., Figueroa D.P., Miranda J.P. and Sabat P.** 2009. Effect of gestational and postnatal environmental temperature on metabolic rate in the atricial rodent, *Phyllotis darwini*. *Journal of Thermal Biology* 34, 310-314.
- Challet E., Lemaho Y., Robin J.P., Malan A. and Cherel Y.** 1995. Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 50, 405-412.
- Chan S. W. C., Ziegel S., and Callard I. P.** 1973. Plasma progesterone in snakes. *Comparative Biochemical Zoology A* 44, 631-637.
- Charland M.B. and Gregory P.T.** 1990. The influence of female reproductive status on thermoregulation in a viviparous snake, *Crotalus viridis*. *Copeia* 1990, 1089-1098.
- Chasnoff I.J., Burns K.A. and Burns W.J.** 1987. Cocaine use in pregnancy: perinatal morbidity and mortality. *Neurotoxicology and teratology* 9, 291-293.



- Chastel O., Lacroix A., Weimerskirch H. and Gabrielsen G.W.** 2005. Modulation of prolactin but not corticosterone responses to stress in relation to parental effort in a long-lived bird. *Hormones and Behavior* 47, 459-466.
- Cherel Y. and Groscolas R.** 1999. Relationship between nutrient storage and nutrient utilization in long-term fasting birds and mammals. In 22nd Int. Ornithol. Cong. Durban (ed. N. J. Adams and R. H. Slotow), pp. 17–34. Johannesburg: BirdLife South Africa
- Cherel Y., Robin J.P., Heitz A., Calgari C. and Le Maho Y.** 1992. Relationships between lipid availability and protein utilisation during prolonged fasting. *Journal of Comparative Physiology B* 162, 305-313.
- Cherel Y., Robin J.-P., Walch O., Karmann H., Netchitailo P. and Le Maho, Y.** 1988. Fasting in king penguin. I. Hormonal and metabolic changes during breeding. *American Journal of Physiology Reg. Int. Comp. Physiol.* 254, R170–R177.
- Choi W., Park Y.K., Park Y.S., Ryoo M. and Lee H.P.** 2011. Changes in voltinism in a pine moth *Dendrolimus spectabilis* (Lepidoptera: Lasiocampidae) population: implications of climate change. *Applied Entomology and Zoology* 46, 319-325.
- Clark M. M. and Galf B. G.** 1995. Prenatal influences on reproductive life history strategies. *Trends in Ecology and Evolution* 10, 151-153.
- Clobert J., Le Galliard J.F., Cote J., Meylan S. and Massot M.** 2009. Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations. *Ecology letters* 12, 197-209.
- Clutton-Brock T.H.** 1991. The evolution of parental care. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Cohet Y. and David J.** 1977. Control of adult reproductive potential by preimaginal thermal conditions: a study in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia* 36, 295-306.
- Cooper W.** 1998. Risk factors and emergence from refuge in the lizard *Eumeces laticeps*. *Behaviour* 135, 1065-1076.
- Cooper W.E.** 2009a. Fleeing and hiding under simultaneous risks and costs. *Behavioural Ecology* 20, 665-671.
- Cooper W.E.** 2009b. Theory successfully predicts hiding time: new data for the lizard *Sceloporus virgatus* and a review. *Behavioural Ecology* 20, 585-592.
- Cooper W.E. Jr and Fredericks W.G.** 2007. Optimal time to emerge from refuge. *Biological Journal of the Linnean Society* 91, 375-382.
- Cooper W.E. Jr. and Wilson D.S.** 2008. Thermal costs of refuge use affects refuge entry and hiding time by striped plateau lizards *Sceloporus virgatus*. *Herpetologica* 64, 406-412.
- Cooper W.E., Wyk J.H. and Mouton P.L.N.** 1999. Incompletely protective refuges: selection and associated defences by a lizard, *Cordylus cordylus* (Squamata: Cordylidae). *Ethology* 105, 687-700.
- Cote J. and Clobert J.** 2007. Social personalities influence natal dispersal in a lizard. *Proceedings of the Royal Society* 274, 383-390.
- Cree A., Tyrell C.L., Preest M.R., Thorburn D. and Guillelte L.J.Jr.** 2003. Protecting embryos from stress: corticosterone effects and the corticosterone response to capture and confinement during pregnancy in a live-bearing (*Hoplodactylus maculatus*). *General and Comparative Endocrinology* 134, 316-329.
- Crespi B. and Semeniuk C.** 2004. Parent-offspring conflict in the evolution of reproductive mode. *American Naturalist* 163, 635-653.
- Crespi E.J. and Denver R.J.** 2005. Ancient origins of human developmental plasticity. *American Journal of Human Biology* 17, 44-54.
- Crews D., Gore A.C., Hsu T.S., Dangleben N.L., Spinetta M., Schallert T., Anway M.D. and Skinner M.K.** 2007. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5942-5946.



- Crocker D.E., Webb P.M., Costa D.P. and Le Boeuf B.J.** 1998. Protein catabolism and renal function in lactating northern elephant seals. *Physiological Zoology* 71, 485–491.
- Crocker D.E., Williams J.D., Costa D.P. and Le Boeuf B.J.** 2001. Maternal traits and reproductive effort in northern elephant seals. *Ecology* 82, 3541-3555.
- Crossin G.T., Hinch S.G., Cooke S.J., Cooperman M.S., Patterson D.A., Welch D.W., Hanson K.C., Kyle C., Olsson I., English K.K. and Farrell A.P.** 2009. Mechanisms influencing the timing and success of reproductive migration in a capital breeding semelparous fish species, the Sockeye salmon. *Physiological and Biochemical Zoology* 82, 635-652.
- Cundall D.** 1987. Functional morphology. In: *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, pp 210-252 (Seigel RA, Collins JT and Novak SS, eds), Macmillan, New York.
- Curno O., Behnke J.M., McElligott A.G., Reader T. and Barnard C.J.** 2009. Mothers produce less aggressive sons with altered immunity when there is a threat of disease during pregnancy. *Proceeding of the Royal Society B* 276, 1047-1054.
- Dauphin-Villemant C. and Xavier F.** 1986. Adrenal activity in the female *Lacerta vivipara* Jacquin : Possible involment in the success of gestation. In *Assenmacher and Boissin. Endocrine regulation as adaptive mechanism to environments*, Editions du CNRS, Paris, Pp 241-250.
- Davis J.R. and Denardo D.F.** 2007. The urinary bladder as a physiological reservoir that moderates dehydration in a large desert lizard, the Gila monster *Heloderma suspectum*. *Journal of Experimental Biology* 210, 1472-1480.
- De Fraipont M., Clobert J., John-Alder H. and Meylan S.** 2000. Increased pre-natal maternal corticosterone promotes philopatry of offspring in common lizards *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology* 69, 404-413.
- De Heij M.E., Van den Hout P.J. and Tinbergen J.M.** 2006. Fitness cost of incubation in great tits (*Parus major*) is related to clutch size. *Proceedings of the Royal Society B* 273, 2353-2361.
- Deeming D.C.** 2004. Reptilian incubation: environment, evolution, and behaviour. Nottingham University Press.
- Deeming D.C. and Ferguson M.W.J.** 1991. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds, pp. 147-171. In *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*, Cambridge University Press.
- Deeming D.C. and Ferguson M. W. J.** 1991. Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles. Cambridge University Press.
- Demarco V. and Guillelte L.J.** 1992. Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovi*). *Journal of Experimental Zoology* 262, 383-390.
- Denver R. J.** 2009. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology* 164, 20-31.
- Descamps S., Boutin S., Berteaux D., McAdam A.G. and Gaillard J.M.** 2008. Cohort effects in red squirrels: the influence of density, food abundance and temperature on future survival and reproductive success. *Journal of Animal Ecology* 77, 305-314.
- Desvages G., Girondot M. and Pieau C.** 1993. Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *General and Comparative Endocrinology* 92, 54-61.
- Dolinoy D. C., Weidman J. R. and Jirtle R. L.** 2007. Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. *Reproductive Toxicology* 23, 297–307.
- Downes S.** 2001. Trading heat and food for safety: costs of predator avoidance in a lizard. *Ecology* 82, 2870-2881.
- Downes S. J. and Shine R.** 1999. Do incubation-induced changes in a lizard's phenotype influence its vulnerability to predators? *Oecologia* 120, 9-18.
- Downes S.J. and Bauwens D.** 2002. Does reproductive state affect lizard's behavior toward chemical cues? *Behavioural Ecology and Sociobiology* 52, 444-450.
- Drent R.H. and Daan S.** 1980. The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. *Ardea* 68, 225-252.



- Du W. G. and Shine R.** 2008. The influence of hydric environments during egg incubation on embryonic heart rates and offspring phenotypes in a scincid lizard (*Lampropholis guichenoti*). *Comparative Biochemistry and Physiology A- Molecular and Integrative Physiology* 151, 102-107.
- Du W. G. and Shine R.** 2010. Why do the eggs of lizards (*Bassinia duperreyi*: Scincidae) hatch sooner if incubated at fluctuating rather than constant temperatures? *Biological Journal of the Linnean Society* 101, 642-650.
- Du W.G., Zhao B. and Shine R.** 2010. Embryos in the fast-lane: High-temperature heart rates of turtles decline after hatching. *Plos One* 5(3), e9557.
- Dumortier O., Blondeau B., Duvill   B., Reusens B., Br  ant B. and Remacle C.** 2007. Different mechanisms operating during different critical time-window reduce fetal beta cell mass due to maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologica* 50, 2495-2503.
- DuRant S. E., Hepp G. R., Moore I. T., Hopkins B. C. and Hopkins W. A.** 2010. Slight differences in incubation temperature affect early growth and stress endocrinology of wood duck (*Aix sponsa*) ducklings. *Journal of Experimental Biology* 213, 45-51.
- Edwards A. and Jones S.M.** 2001. Changes in plasma progesterone, estrogen and testosterone concentrations throughout the reproductive cycle in female viviparous blue -tongued Skinks, *Tiliqua nigrolutea* (Scincidae), in Tasmania. *General and Comparative Endocrinology* 122, 260-269.
- Eiby Y. A. and Booth D. T.** 2009. The effects of incubation temperature on the morphology and composition of Australian Brush-turkey (*Alectura lathamii*) chicks. *Journal of Comparative Physiology B* 179, 875-882.
- Eiby Y. A., Worthington Wilmer J. and Booth D. T.** 2008. Temperature-dependent sex-biased embryo mortality in a bird. *Proceedings of the Royal Society B* 275, 2703-2706.
- Eising C.M. and Groothuis T.G.G.** 2003. Yolk androgens and begging behaviour in black-headed gull chicks: an experimental field study. *Animal Behaviour* 66, 1027-1034.
- Elphick M. J. and Shine R.** 1998. Longterm effects of incubation temperatures on the morphology and locomotor performance of hatchling lizards (*Bassiana duperreyi*, Scincidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 63, 429-447.
- Ewert M.A.** 1991. Cold torpor, delayed hatching and aestivation in reptiles and birds. In: *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Deeming D.C. and Ferguson M.W.J. (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp 173-192.
- Ewert M. A., Jackson D. R. and Nelson C. E.** 1994. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *Journal of Experimental Zoology* 270, 3-15.
- Falconer D.S.** 1981. *Introduction to quantitative genetics*, 2nd ed. London, Longman.
- Farmer C. G.** 2000. Parental care: The key to understanding endothermy and other convergent features in birds and mammals. *The American Naturalist* 55, 326-334.
- Farmer C. G.** 2003. Reproduction: The adaptive significance of endothermy. *The American Naturalist* 162, 826-840.
- Fish E.W., Shahrokhi D., Bagot R., Caldji C., Bredy T., Szyf M. and Meaney M.J.** 2004. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Annales of N.Y. Academy of Science* 1036, 167-180.
- Forsman A.** 1996. An experimental test for food effects on head size allometry in juvenile snakes. *Evolution* 50, 2536-2542.
- Forsman A. and Lindell L. E.** 1993. The advantage of a big head: swallowing performance in adders, *Vipera berus*. *Functional Ecology* 7, 183-189.
- Forsman A. and Shine R.** 1997. Rejection of non-adaptive hypotheses for intraspecific variation in trophic morphology in gape-limited predators. *Biological Journal of the Linnean Society* 62, 209-223.
- Forsman A., Merila J. and Lindell L.E.** 1994. Do scale anomalies cause differential survival in *Vipera berus*? *Journal of Herpetology* 28, 435-440.



- Fox C.W., Thakar M.S. and Mousseau T.A.** 1997. Egg size plasticity in a seed beetle: an adaptive maternal effect. *The American Naturalist* 149, 149-163.
- Gagliano M. and McCormick M.I.** 2009. Hormonally mediated maternal effects shape offspring survival potential in stressful environments. *Oecologia* 160, 657-665.
- Gaillard J.-M., Boutin J.-M., Delorme D., Van Laere G., Duncan P. and Lebreton J.D.** 1997. Early survival in roe deer: causes and consequences of cohort variation in two contrasted populations. *Oecologia* 112, 502–513.
- Garamszegi L.Z., Biard C., Eens M., Moller A.P. and Saino N.** 2007. Interspecific variation in egg testosterone levels: implications for the evolution of bird song. *Journal of Evolutionary Biology* 20, 950-964.
- Gardner D. S., Ozanne S. E. and Sinclair K. D.** 2009. Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 364, 3419-3427.
- Gilbert S. F.** 2000. "Developmental Biology," 6th ed. Sinauer,
- Gilbert S.F.** 2001. Ecological developmental Biology: Developmental biology meets the real world. *Developmental Biology* 233, 1-12.
- Gilbert S.F., Opitz J. and Raff R.A.** 1996. 'Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Developmental Biology* 173, 357–372.
- Gillooly J.F., Charnov E.L., West G.B., Savage V.M and Brown J.H.** 2002. Effects of size and temperature on developmental time. *Nature* 417, 70-73.
- Gillooly J.F. and Dodson S.I.** 2000. The relationship of neonate mass and incubation temperature to embryonic development time in a range of animal taxa. *Journal of Zoology, London* 251, 369-375.
- Gluckman P., Hanson M.A. and Beedle A.S.** 2007. Early life events and their consequences for later diseases: A life history and evolutionary perspective. *American Journal of Human Biology* 19, 1-19.
- Goldsbrough C.L., Hochuli D.F. and Shine R.** 2004. Fitness benefits of retreat site selection: spiders, rocks and thermal cues. *Ecology* 85, 1635-1641.
- Goode J. and Russell J.** 1968. Incubation of eggs of three species of Chelid tortoises, and notes on their embryological development. *Australian Journal of Zoology* 16, 749 - 761.
- Gorman H. E. and Nager R. G.** 2004. Prenatal developmental conditions have long-term effects on offspring fecundity. *Proceedings of the Royal Society B* 271, 1923-1928.
- Grant G.S.** 1982. Egg temperature, nest humidity and behavioural thermoregulation in a hot environment. *Ornithological Monographs* 30, 1-75.
- Grassman M. and Crews D.** 1990. Ovarian and adrenal function in the parthenogenetic whiptail lizard *Cnemidophorus uniparens* in the field and laboratory. *General and Comparative Endocrinology* 76, 444–450.
- Greer A. E.** (2004). Encyclopedia of Australian reptiles. Australian museum online.
- Gregory P.T., Crampton L.H. and Skebo K.M.** 1999. Conflicts and interactions among reproduction, thermoregulation and feeding in viviparous reptiles: are gravid snakes anorexic. *Journal of Zoology* 248, 231-241.
- Gregory P.T., Isaac L.A. and Griffiths R.A.** 2007. Death feigning by Grass Snakes (*Natrix natrix*) in response to handling by human "predators". *Journal of Comparative Psychology* 121, 123-129.
- Groothuis T.G.G., Eising C.M., Dijkstra C., and Müller W.** 2005. Balancing between costs and benefits of maternal hormones deposition in avian eggs. *Proceeding of the Royal Society of London* 1, 78-81.
- Gross M.R.** 2005. The evolution of parental care. *The Quarterly Review of Biology* 80, 37-46.
- Guillette Jr. L.J., Crain L.J.D.A., Rooney A.A. and Woodward A.R.,** 1997. Effect of acute stress on plasma concentrations of sex and stress hormones in juvenile alligators living in control and contaminated lakes. *Journal of Herpetology* 31, 347–353.
- Guillette L.** 1991. The evolution of viviparity in amniote vertebrates: new insights, new questions. *Journal of Zoology* 223, 521–526.



- Guillette L.** 1993. The evolution of viviparity in lizards. *Bioscience* 43, 742–751.
- Guillette L. J., Spielvogel S., and Moore F.** 1981. Luteal development, placentation, and plasma progesterone concentration in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *General and Comparative Endocrinology* 43, 20–29.
- Guillette L.J.Jr., Cree A. and Rooney A.A.** 1995. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism, in: Warwick, C., Frye, F.L., Murphy, J.B. (Eds.), *Health and Welfare of Captive Reptiles*, Chapman and Hall, London, pp. 32–81.
- Gutzke W.H.N. and Crews D.** 1988. Embryonic temperature determines adult sexuality in a reptile. *Nature* 332, 832–834.
- Gvoždik L.** 2005. Does reproduction influence temperature preferences in newts? *Canadian Journal of Zoology* 83, 1038–1044.
- Gvozdik L. and Castilla A.M.** 2001. A comparative study of preferred body temperatures and critical thermal tolerance limits among populations of *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) along an altitudinal gradient. *Journal of Herpetology* 35, 486–492.
- Haig D.** 1993. Genetic conflicts in human pregnancy. *Quarterly Review of Biology* 68, 495–532.
- Hales C.N. and Barker D.J.P.** 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin* 60, 5–20.
- Hales C.N. and Barker D.J.P.** 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601.
- Harding A.M.A., Kitaysky A.S., Hall M.E., Welcker J., Karnovsky N.J., Talbot S.L., Hamer K.C. and Grémillet D.** 2009. Flexibility in the parental effort of an Arctic-breeding seabird. *Functional Ecology* 23, 348–358.
- Hare K.M., Pledger S., Thompson M.B., Miller J.H. and Daugherty C.H.** 2010. Nocturnal lizards from a cool-temperate environment have high metabolic rate at low temperatures. *Journal of Comparative Physiology B* 180, 1173–1181.
- Harlow P. and Grigg G.** 1984. Shivering thermogenesis in a brooding diamond python, *Python spilotes spilotes*. *Copeia* 1984, 959–965.
- Harvey S., Klandorf H., Radke W.J. and Few J.D.** 1984. Thyroid and adrenal responses of ducks (*Anas platyrhynchos*) during saline adaptation. *General and Comparative Endocrinology* 55, 46–53.
- Hasegawa M.** 1985. Effect of brooding on egg mortality in the lizard *Eumeces okadae* on Mijake-Jima, Izu Islands, Japan. *Copeia* 1985, 497–500.
- Hasselquist D. and Nilsson J.A.** 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364, 51–60.
- Hébert P.N.** 2002. Ecological factors affecting initiation of incubation behaviour. In: *Avian incubation: Behaviour, Environment and Evolution*, Deeming, D.C. (eds), Oxford University Press, Oxford, pp. 270–279.
- Henen B.T.** 2002. Reproductive effort and reproductive nutrition of female desert tortoises: Essential field methods. *Integrative and Comparative Biology* 42, 43–50.
- Henry C.J.K. and Ulijaszek S.J.** 2009. Long-term consequences of early environment. Growth, development and the lifespan developmental perspective. *Society for the study of human biology*, Symposium series: 37. Cambridge University Press, New York.
- Hertz P.E., Huer R.B. and Nevo E.** 1982. Fight versus flight: body temperature influences defensive responses of lizards. *Animal Behaviour* 30, 676–679.
- Hertz P.E., Huey R.B. and Stevenson R.D.** 1993. Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of inappropriate question. *The American Naturalist* 142, 796–818.
- Hertzog H.A., Bowers B.B. and Burghardt G.M.** 1992. Development of antipredator responses in snakes: V. Species differences in ontogenetic trajectories. *Developmental Psychobiology* 25, 199–211.
- Herzog H.A. and Burghardt G.M.** 1986. Development of antipredator responses in snakes: I. defensive and open-field behaviors in newborns and adults of the three species of garter



- snakes (*Thamnophis melanogaster*, *T. sirtalis*, *T. butleri*). *Journal of Comparative Psychology* 100, 372-379.
- Heulin B., Ghielmi S., Vogrin N., Surget-Groba Y. and Guillaume C.P.** 2002. Variation in eggshell characteristics and in intrauterine egg retention between two oviparous clades of the lizard *Lacerta vivipara*: insight into the oviparity-viviparity continuum in squamates. *Journal of Morphology* 252, 255-262.
- Heulin B., Osenegg K. and D. Michel D.** 1994. Egg survival and incubation in two oviparous populations of *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia* 15, 199-219.
- Hinton H.E.** 1981. *Biology of insect eggs*. Pergamon Press, Oxford.
- Ho S. M., Danko D. and Callard I. P.** 1981. Effect of exogenous oestradiol 17-b on plasma vitellogenin levels in male and female *Chrysemys picta* and its modulation by testosterone and progesterone. *General and Comparative Endocrinology* 43, 413-421.
- Holland P.W. and Hogan B.L.** 1988. Expression of homeo box genes during mouse development: a review. *Genes and Development* 2, 773-782.
- Holmes K.M. and Cree A.** 2006. Annual reproduction in females of a viviparous skink (*Oligosoma maccani*) in a subalpine environment. *Journal of Herpetology* 40, 141-151.
- Holtzman D.A., Harris T.W., Aranguren G. and Bostock E.** 1999. Spatial learning of an escape task by young corn snakes, *Elaphe guttata guttata*. *Animal Behaviour* 57, 51-60.
- Hubert J. and Dufaure J.P.** 1968. Table de développement de la vipère aspic: *Vipera aspis* L. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 93, 135-148.
- Huey R. B. and Slatkin M.** 1976. Costs and Benefits of lizard thermoregulation. *Quarterly Review of Biology* 51, 363-384.
- Huey R. B., and Stevenson R.D.** 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. *American Zoologist* 19:357-366.
- Huey R.B. and Kingsolver J.G.** 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends in Ecology and Evolution* 4, 131-135.
- Huey R.B. and Kingsolver J.G.** 1993. Evolution of resistance to high temperature in ectotherms. *The American Naturalist* 142, S21-S46.
- Huey R.B., Berrigan D., Gilchrist G. W. and Herron J.C.** 1999. Testing the adaptive significance of acclimation: a strong inference approach. *American Zoologist* 39, 323-336.
- Huey R.B., Wakefield T., Crill T. and Gilchrist G.W.** 1995. effects of parental, developmental and laying temperature on the early fecundity of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 74, 216-223.
- Hutchinson V.H., Dowling H.G. and Vinegar A.** 1966. Thermoregulation in a brooding female Indian python *molurus bivittatus*. *Science* 151, 694-696.
- Jablonka E. and Lamb M.J.** 2005. *Evolution in four dimensions. Genetic, epigenetic, behavioral and symbolic variation in the history of life*. MIT Press, Cambridge.
- Jaenish R. and Bird A.** 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33, 245-254.
- Jessop T.S.** 2001. Modulation of the adrenocortical stress response in marine turtles (Cheloniidae): evidence for a hormonal tactic maximizing reproductive investment. *Journal of Zoology* 254, 57-65.
- Ji X. and Braña F.** 1999. The influence of thermal and hydric environments on embryonic use of energy and nutrients, and hatchling traits, in the wall lizards (*Podarcis muralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 124, 205-213.
- Ji X., Lin C.X., Lin L.H., Qiu Q.B. and Du Y.** 2007. Evolution of viviparity in warm-climate lizards: an experimental test of the maternal manipulation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology* 20, 1037-1045.
- Jirtle R.L. and Skinner M.K** 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews* 8, 253-262.
- Johnson N.A. and Porter A.H.** 2001. Toward a new synthesis: population genetics and evolutionary developmental biology. *Genetica* 112/113, 45-59.



- Johnston I.A. and Bennett A.F.** 1996. Animals and Temperature. Phenotypic and evolutionary adaptations. Cambridge University Press, UK, pp 419.
- Jönsson K.I.** 1997. Capital and income breeding as alternative tactics of resource use in reproduction. *Oikos* 78, 57-66.
- Kaati G., Bygren L.O. and Edvinsson S.** 2002. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European Journal of Human Genetics* 10, 682-688.
- Kennett L. and Jones. M.D.** 1986. Fetal alcohol syndrome. *Pediatrics in Review* 8, 122-126.
- Kiefer J.** 2007. Epigenetics in development. *Developmental Dynamics* 236, 1144-1156.
- Kim S. Y. and Monaghan P.** 2006. Effects of early incubation constancy on embryonic development: An experimental study in the herring gull *Larus argentatus*. *Journal of Thermal Biology* 31, 146-421.
- Kohman R.A., Tarr A.J., day C.E., McLinden K.A. and Boehm G.W.** 2008. Influence of prenatal stress on behavioral, endocrine and cytokine responses to adulthood bacterial endotoxin exposure. *Behavioural Brain Research* 193, 257-268.
- Koteja P.** 2000. Energy assimilation, parental care and the evolution of endothermy. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267, 479-484.
- Krumlauf R.** 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- Kunes J. and Zicha J.** 2006. Developmental window and environment as important factors in the expression of genetic information: a cardiovascular physiologist's view. *Clinical Science*, 295-305.
- Laburn H. P., Faurie A., Goelst K. and Mitchell D.** 2002. Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat, cold, and exercise. *Journal of Applied Physiology* 92, 802-808.
- Ladyman M., Bonnet X., Lourdais O., Bradshaw D. and Naulleau G.** 2003. Gestation, thermoregulation and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: evidence for fecundity-independent costs. *Physiological and Biochemical Zoology* 76, 497-510.
- Lamb R.J., Mackay P.A. and Gerber G.H.** 1987. Are development and growth of pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, in North America adapted to local temperature? *Oecologia* 72, 170-177.
- Landys M.M., Ramenofsky M. and Wingfield J.C.** 2006. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *General and Comparative Endocrinology* 148, 132-149.
- Lang J. W. and Andrews H. V.** 1994. Temperature-dependent sex determination in crocodilians. *Journal of Experimental Zoology* 270, 28-44.
- Lasiewski R. C., Acosta A. L. and Bernstein M. L.** 1966. Evaporative water loss in birds. I. Characteristics of the open flow method of determination and their relation to estimates of thermoregulatory ability. *Comparative Biochemistry and Physiology* 19, 445-457.
- Latzel V., Klimesova J., Hajek T., Gomez S. and Smilauer P.** 2010. Maternal effects alter progeny's responses to disturbance and nutrients in *Plantago* species. *Oikos* 119, 1700-1710.
- Laugen A.T., Laurila A., Rasanen K. and Merila J.** 2003. Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates-evidence for local adaptations. *Journal of Evolutionary Biology* 19, 996-1005.
- Lawrence P.A. and Morata G.** 1994. Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 78, 181-189.
- Le Galliard J.F., Ferrière R and Clobert J.** 2003b. Mother-offspring interactions affect natal dispersal in a lizard. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 1163-1169.
- Le Galliard J.F., Ferrière R and Clobert J.** 2005. Juvenile growth and survival under dietary restriction: are males and females equal? *Oikos*, 111, 368-376.
- Le Galliard J.F., Le Bris M. and Clobert J.** 2003a. Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology* 17, 877-885.
- Le Galliard J.F., Marquis O. and Massot M.** 2010. Cohort variation, climate effects and population dynamics in a short-lived lizard. *Journal of Animal Ecology* 79, 1296-1307.



- Lecomte J., Clobert J. and Massot M.** 1993. Shift in behaviour related to pregnancy in *Lacerta vivipara*. *Revue d'Ecologie (Terre et vie)* 48, 99-107.
- Leimar O., Hammerstein P. and van Dooren T.J.M.** 2006. A new perspective on developmental plasticity and the principles of adaptive morph determination. *The American Naturalist* 167, 367-376.
- Lelièvre H., Le Hénanff M., Blouin-Demers G., Naulleau G. and Lourdaïs O.** 2010. Thermal strategies in two sympatric colubrid snakes with contrasted exposure. *Journal of Comparative Physiology B* 180, 415-425.
- Lendvai A.Z., Giraudeau M. and Chastel O.** 2007. Reproduction and modulation of the stress response: an experimental test in the house sparrow. *Proceedings of the Royal Society B* 274, 391-397.
- Lepetz V., Massot M., Chaine A. and Clobert J.** 2009. Climate warming and evolution of morphotypes in a reptile. *Global Change Biology* 15, 454-466.
- Lima S.L. and Dill L.M.** 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68, 619-640.
- Lindstrom J.** 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology and Evolution* 14, 343-348.
- Lorenzon P., Clobert J. and Massot M.** 2001. The contribution of phenotypic plasticity to adaptation in *Lacerta vivipara*. *Evolution* 55, 392-404.
- Lormée H., Jouventin P., Trouve C. and Chastel O.** 2003. Sex-specific patterns in baseline corticosterone and body condition changes in breeding Red-footed Boobies *Sula sula*. *Ibis* 145, 212-219.
- Lourdaïs O., Bonnet X. and Doughty P.** 2002a. Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal of Experimental Zoology* 292, 487-493.
- Lourdaïs O., Brischoux F. and Barantin L.** 2005. How to assess musculature and performance in a constricting snake? A case study in the Colombian rainbow boa (*Epicrates cenchria maurus*). *Journal of Zoology* 265, 43-51.
- Lourdaïs O., Heulin B. and DeNardo D.** 2008. Thermoregulation during gravidity in the Children's python (*Antaresia childreni*): a test of the pre-adaptation hypothesis for maternal thermophily in snakes. *Biological Journal of the Linnean Society* 93, 499-508.
- Lourdaïs O., Hoffman T. and DeNardo D.** 2007. Maternal brooding in the Children's python (*Antaresia childreni*) promotes egg water balance. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology* 177, 569-577.
- Lourdaïs O., Brischoux F., Denardo D. and Shine R.** 2004a. Protein catabolism in pregnant snakes (*Epicrates cenchria maurus* Boidae) compromises musculature and performance after reproduction. *Journal of Comparative Physiology* 174, 383-391.
- Lourdaïs O., Shine R., Bonnet X., Guillon M. and Naulleau G.** 2004b. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos* 104, 551-560.
- Lourdaïs O., Bonnet X., Shine R., DeNardo D., Naulleau G. and Guillon, M.** 2002b. Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of viviparous snake. *Journal of Animal Ecology* 71, 470-479.
- Love O.P. and Williams T.D.** 2008. The adaptive value of stress-induced phenotypes: effects of maternally derived corticosterone on sex-biased investment, cost of reproduction and maternal fitness. *The American Naturalist* 172, E135-E149.
- Lowell B.B. and Goodman M.N.** 1987. Protein sparing in skeletal-muscle during prolonged starvation-Dependence on lipid fuel availability. *Diabetes* 36, 14-19.
- Lowell B.B., Ruderman N.B. and Goodman M.N.** 1986. Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism* 35, 1121-1127.
- Löwenborg K., Shine R. and Hagman M.** 2010. Fitness disadvantages to disrupted embryogenesis impose selection against suboptimal nest-choice by female grass snakes, *Natrix natrix* (Colubridae). *Journal of Evolutionary Biology* 24, 177-183.



- Lugo J.N., Marini M.D., Cronise K. and Kelly S.J.** 2003. Effects of alcohol exposure during development on social behavior in rats. *Physiology and Behavior* 78, 185-194.
- Lummaa V.** 2003. early developmental conditions and reproductive success in humans: downstream effects of prenatal famine, birthweight and timing of birth. *American Journal of Human Biology* 15, 370-379.
- Lummaa V. and Clutton-Brock T.** 2002. Early development, survival and reproduction in humans. *Trends in Ecology and Evolution* 17, 141-147.
- Lynch V.J.** 2009. Live-birth in vipers (Viperidae) is a key innovation and adaptation to global cooling during the cenozoic. *Evolution* 63, 2457-2465.
- Mac Gowan P.O., Meaney M.J. and Szyf M.** 2008. Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. *Brain Research* 1237, 12-24.
- MacDiarmid R. W.** 1978. Evolution of parental care in frogs. Pp 127-147, *In* Burghardt G. M. and Bekoff M. eds, *The development of behavior: comparative and evolutionary aspects*. Garland STPM Press, New York.
- MacGough S. E., Schwanz L. E., Bowden R. M., Gonzales J. E. and Janzen F. J.** 2009. Inheritance of nesting behaviour across natural environmental variation in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Proceedings of the Royal Society of London B* 277, 1219-1226.
- Machado G. and Raimundo R. L. G.** 2001. Parental investment and the evolution of subsocial behaviour in harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Ethology, Ecology and Evolution* 13, 133-150.
- Madsen T. and Shine R.** 1994. Costs of reproduction influence the evolution of sexual size dimorphism in snakes. *Evolution* 48, 1389-1397.
- Madsen T. and Shine R.** 1999a. The adjustment of reproductive threshold to prey abundance in a capital breeder. *Journal of Animal Ecology* 68, 571-580.
- Madsen T. and Shine R.** 1999b. Life history consequences of nest-site variation in tropical pythons (*Liasis fuscus*). *Ecology* 80, 989-997.
- Maritz M.F. and Douglas R.M.** 1994. Shape quantization and the estimation of volume and surface area of reptile eggs. *Journal of Herpetology* 28, 281-291.
- Markel R. G.** 1990. *Kingsnakes and milk snakes*. Neptune City, NJ: TFH Publication.
- Marshall D. J. et al.** 2006. Offspring size effects mediate competitive interactions in a colonial marine invertebrate. *Ecology* 87, 214-225.
- Marshall D.J. and Uller T.** 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116, 1957-1963.
- Martín J.** 2001. When hiding from predators is costly: Optimization of refuge use in lizards. *Etologia* 9, 9-13.
- Martín J. and López P.** 1999. When to come out from a refuge is costly: risk-sensitive and state-dependent decisions in an alpine lizard. *Behavioural Ecology* 10, 487-492.
- Martín J. and López P.** 2001. Repeated predatory attacks and multiple decisions to come out from a refuge in an alpine lizard. *Behavioural Ecology* 12, 386-389.
- Martín J. and López P.** 2005. Wall lizards modulate refuge use through continuous assessment of predation risk level. *Ethology* 111, 207-219.
- Martín J., López P. and Cooper W.E.Jr.** 2003. When to come out from a refuge: Balancing predation risk and foraging opportunities in an alpine lizard. *Ethology* 109, 77-87.
- Massot M. and Clobert J.** 2000. Processes at the origin of similarities in dispersal behaviour among siblings. *Journal of Evolutionary Biology* 13, 707-719.
- Massot M., Clobert J., Chambon A. and Michalakakis Y.** 1994. Vertebrate natal dispersal: the problem of non-independence of siblings. *Oikos* 70, 172-176.
- Massot M., Clobert J., Lorenzon P. and Rossi J.M.** 2002. Condition-dependent dispersal and ontogeny of the dispersal behaviour: an experimental approach. *Journal of Animal Ecology* 71, 253-261.
- Mathies T. and Andrews R.** 1996. Extended egg retention and its influence on embryonic development and egg water balance: implications for the evolution of viviparity. *Physiological Zoology* 69, 1021-1035.



- Mautz W.J.** 1980. Factors influencing water loss in lizards. *Comparative Biochemistry and Physiology* 67A, 429-438.
- Mautz W.J.** 1982. Correlation of both respiratory and cutaneous water losses of lizards with habitat aridity. *Journal of comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 149, 25-30.
- Meijer T. and Drent R.** 1999. Re-examination of the capital and income dichotomy in breeding birds. *Ibis* 141, 399-414.
- Metcalfe N.B. and Monaghan P.** 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology and Evolution* 16, 254-260.
- Meyers L.A. and Bull J.J.** 2002. Fighting change with change: adaptive variation in uncertain world. *Trends in Ecology and Evolution* 17, 551-557.
- Meylan S. and Clobert J.** 2005. Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. *Hormones and Behavior* 48, 44-52.
- Meylan S., J. Clobert and B. Sinervo** 2007. Adaptive significance of maternal induction of density-dependent phenotypes. *Oikos* 116, 650-661.
- Miaud C., Oromí N., Navarro S. and Sanuy D.** 2011. Intra-specific variation in nitrate tolerance in tadpoles of the Natterjack toad. *Ecotoxicology* 20, 1176-1183.
- Mihaila C., Schramm J., Strathmann F.G., Lee D.L., Gelein R.M., Luebke A.E. and Mayer-Pröschel M.** 2011. Identifying a window of vulnerability during fetal development in a maternal iron restriction model. *Plos One* 6, e17483. doi:10.1371/journal.pone.0017483.
- Miles D.B., Sinervo B. and Frankino W.A.** 2000. Reproductive burden, locomotor performance, and the cost of reproduction in free ranging lizards. *Evolution* 54, 1386-1395.
- Mock D. W. and G. A. Parker.** 1997. *The evolution of sibling rivalry.* Oxford University Press, Oxford.
- Monaghan P.** 2008. Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363, 1635-1645.
- Moon B.R.** 2000. The mechanics and muscular control of constriction in gopher snakes (*Pituophis melanoleucus*) and a king snake (*Lampropeltis getula*). *Journal of Zoology* 252, 83-98.
- Moore I.T. and Jessop T.S.** 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behaviour* 43, 39-47.
- Moore I.T., Greene M.J. and Mason, R.T.** 2001. Environmental and seasonal adaptation of the adrenocortical and gonadal responses to capture stress in two population of the male garter snake, *Thamnophis sirtalis*. *Journal of Experimental Zoology* 289, 99-108.
- Mori A. and Burghardt G.M.** 2001. Temperature effects on anti-predator behaviour in *Rhabdophis tigrinus*, a snake with toxic nuchal glands. *Ethology* 107, 795-811.
- Mousseau T. A., Uller T., Wapstra E. and Badyaev A.V.** 2009. Evolution of maternal effects: past and present. *Philosophical transactions of the Royal Society B* 364, 1035-1038.
- Mousseau T.A. and Fox C.W.** 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 403-407.
- Moyes K., Nussey D.H., Clements M.N., Guinness F. E., Morris A., Morris S., Pemberton J.M., Kruuk L. and Clutton-Brock T.H.** 2011. Advancing in breeding phenology in response to environmental change in a wild red deer population. *Global Change Biology* 17, 2455-2469.
- Mueller B. R. and Bale T. L.** 2006. Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. *Physiology and Behaviour* 88, 605-614.
- Mugabo M., Marquis O., Perret S. and Le Galliard J.F.** 2010. Immediate and delayed effects caused by food deprivation early in life in a short-lived lizard. *Journal of Evolutionary Biology* 23, 1886-1898.
- Müller W., Lessels K.M., Korsten P. and Von Engelhardt N.** 2007. Manipulative signals in family conflict? On the function of maternal yolk hormones in birds. *The American Naturalist* 169, E84-E96.
- Mullins M. A. and Janzen F. J.** 2006. Phenotypic effects of thermal means and variances on smooth softshell turtle (*Apalone mutica*) embryos and hatchlings. *Herpetologica* 62, 27-36.



- Murtha M.T., Leckman J.F. and Ruddle F.H.** 1991. Detection of homeobox genes in development and evolution. *Proceedings of the National American Society* 88, 10711-10715.
- Naulleau G.** 1979. Etude biotéléométrique de la thermorégulation chez *Vipera aspis* (L.) élevée en conditions artificielles. *Journal of Herpetology* 13, 203-208.
- Naulleau G.** 1981. Détermination des périodes d'ovulation chez *Vipera aspis* et *Vipera berus* dans l'ouest de la France, étudiée par radiographie. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de l'Ouest de la France*, 3, 151-153.
- Naulleau G.** 1986. Effect of temperature on gestation in *Vipera aspic* and *V. berus* (Reptilia: Serpentes). *Studies in herpetology*, Roček Z. Prague: 489-494.
- Naulleau G.** 1997. La vipère aspic. *Eveil Nature*, Saint Yrieix.
- Naulleau G. and Bonnet X.** 1996. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. *Oecologia* 107, 301-306.
- Naulleau G. and Fleury F.** 1990. Changes in plasma progesterone in female *Vipera aspis* L. (Reptilia, viperidae) during the sexual cycle in pregnant and nonpregnant females. *General and Comparative Endocrinology* 78, 433-443.
- Naulleau G., Bonnet X. and Duret S.** 1996. Déplacements et domaines vitaux des femelles reproductrices de vipères aspic *Vipera aspis* (Reptilia viperidae) dans le centre ouest de la France. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* 78, 5-18.
- Nicieza A.G. and Metcalfe N.B.** 1997. Growth compensation in juvenile Atlantic salmon : responses to depressed temperature and food availability. *Ecology* 78, 2385-2400.
- Noble R.C.** 1991. Comparative composition and utilisation of yolk lipid by embryonic birds and reptiles, pp 17-28 In: Deeming D.C. and Fergusson M. W. J (eds) 1991. *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge University Press.
- O'loan J., Eyles D.W., Kesby J., Ko P., McGrath J. and Burne T.H.J.** 2007. Vitamine D deficiency during various stages of pregnancy in the rat; its impact on development and behaviour in adult offspring. *Psychoneuroendocrinology* 32: 227-234.
- O'Steen S.** 1998. Embryonic temperature influences juvenile temperature choice and growth rate in snapping turtles *Chelydra serpentina*. *Journal of Experimental Biology* 201, 439-449.
- O'Steen S. and Janzen F. J.** 1999. Embryonic temperature affects metabolic compensation and thyroid hormones in hatchling snapping turtles. *Physiological and Biochemical Zoology* 72: 520-533.
- Oftedal O.T.** 1993. The adaptation of milk secretion to the constraints of fasting in bears, seals, and baleen whales. *Journal of Dairy Science* 76:3234-3246390.
- Ojanguren A.F. and Braña F.** 2003. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. *Journal of Fish Biology* 62, 580-590.
- Okuliarova M., Groothuis T.G.G., Škrobánek P. and Zeman M.** 2011. Experimental evidence for genetic heritability of maternal hormone transfer to offspring. *The American Naturalist* 177, 824-834.
- Olsson M. and Shine R.** 1998a. Timing of parturition as a maternal care tactic in an alpine lizard species. *Evolution* 52, 1861-1864.
- Olsson M. and Shine R.** 1998b. The seasonal timing of oviposition in sand lizards (*Lacerta agilis*): why early clutches are better. *Journal of Evolutionary Biology* 10, 369-381.
- Olsson M. and Shine R.** 1997a. The limits to reproductive outputs: Offspring size versus number in the sand lizard (*Lacerta agilis*). *American Naturalist* 149, 179-188.
- Olsson M. and Shine R.** 1997b. The seasonal timing of oviposition in sand lizards (*Lacerta agilis*): why early clutches are better. *Journal of Evolutionary Biology* 10, 369-381.
- Osgood D.W.** 1978. Effects of temperature on the development of meristic characters in *Natrix fasciata*. *Copeia* 1978, 33-47.
- Ott J.A., Mendonça M.T., Guyer C. and Michener W. K.** 2000. Seasonal changes in sex and adrenal steroid hormones of gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*). *General and Comparative Endocrinology* 117, 299-312.



- Oxendine S. L., Cowden J., Hinton D. and Padilla S.** 2006. Vulnerable windows for developmental ethanol toxicity in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 80, 396-404.
- Packard G.C.** 1991. The physiological and ecological importance of water to embryos of oviparous reptiles. In *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*, Cambridge University Press.
- Packard G.C. and Packard M.J.** 1988. Water relation of embryonic snapping turtle (*Chelydra serpentina*) exposed to wet or dry environments at different times of incubation. *Physiological Zoology* 61, 95-106.
- Packard G.C., Tracy C. and Roth J.J.** 1977. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos and the evolution of viviparity within the class reptilia. *Biological Review* 52, 71-105.
- Parker S.L. and Andrews R.M.** 2006. Incubation temperature and phenotypic traits of *Sceloporus undulatus*: implications for the northern limits of distribution. *Oecologia* DOI 10.1007/s00442-006-0583-0.
- Patterson J.W. and Davies P.M.C.** 1978. Preferred body temperature: seasonal and sexual differences in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Thermal Biology* 3, 39-41.
- Pearson D., Shine R. and Williams A.** 2003. Thermal biology of large snakes in cool climates: a radio-telemetric study of carpet pythons (*Morelia spilota imbricata*) in south-western Australia. *Journal of Thermal Biology* 28, 117-131.
- Peaston A.E. and Whitelaw E.** 2006. Epigenetics and phenotypic variation in mammals. *Mammalian Genome* 17, 365-374.
- Perez L. E. and Callard I. P.** 1989. Evidence for progesterone inhibition of vitellogenesis in the skate, *Raja erinacea*. *American Zoologist* 29, 357A.
- Peronne M. and Zaret T.M.** 1979. Parental care patterns of fishes. *The American Naturalist* 113, 351-361.
- Pianka E.R. and Pianka H.D.** 1970. Ecology of *Moloch horridus* (Lacertilia Agamidae) in western Australia. *Copeia* 1970, 90-103.
- Pieau C., Dorizzi M. and Richard-Mercier N.** 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 887-900.
- Piersma T. and Drent J.** 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 228-233.
- Piersma T. and van Gils J.A.** 2011. *The flexible phenotype*. Oxford University Press Inc., New York. Pp 238.
- Pigliucci M.** 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 9, 481-486.
- Podrabsky J.E., Garrett I.D.F. and Kohl Z.F.** 2010. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology* 213, 3280-3288.
- Pulido F.** 2007. Phenotypic changes in spring arrival: evolution, phenotypic plasticity, effects of weather and condition. *Climate Research* 35, 5-23.
- Qualls C.P. and Andrews R.M.** 1999. Cold climates and the evolution of viviparity in reptiles: cold incubation temperatures produce poor-quality offspring in the lizard, *Sceloporus virgatus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 67, 353-376.
- Reed T.E., Waples R.S., Schinder D.E., Hard J.J. and Kinnison M.T.** 2010. Phenotypic plasticity and population viability: the importance of environmental predictability. *Proceedings of the Royal Society of America B* 277, 3391-3400.
- Reid J.M., Bignal E.M., Bignal S., McCracken D.I. and Monaghan P.** 2003. Environmental variability, life-history covariation and cohort effects in the red-billed chough *Pyrrhocorax pyrrhocorax*. *Journal of Animal Ecology* 72, 36-46.
- Reynolds J.D., Goodwin N.B. and Freckleton R.P.** 2002. Evolutionary transitions in parental care and live bearing in vertebrates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 357, 269-281.
- Richardson M.K., Allen S.P., Wright G.M., Raynaud A. and Hanken J.** 1998. Somite number and vertebrate evolution. *Development* 125, 151-160.



- Ricklefs R.E. and Wikelski M.**, 2002. The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology and Evolution* 17,462-468.
- Riley D., Heisermann G. T., Mac Pherson R., and Callard I. P.** 1987. Hepatic estrogen receptors, seasonal changes and pituitary dependence of cytosolic and nuclear forms. *Journal of Steroid and Biochemistry* 26, 41-47.
- Rivas J.A.** 1999. Life history of the green anaconda (*Eunectes murinus*) with emphasis on its reproductive biology. Ph.D. thesis, University of Tennessee, Knoxville.
- Robert K.A. and Thompson M.B.** 2007. Is basking opportunities in the viviparous lizard, *Eulamprus tympanum*, compromised by the presence of a predator scent? *Journal of Herpetology* 41, 287-293.
- Robert K.A., Thompson M.B. and Seebacher F.** 2006. Thermal biology of a viviparous lizard with temperature-dependant sex determination. *Journal of Thermal Biology* 31, 292-301.
- Robin J.P., Fayolle C., Decrock F., Thil M.A., Cote S.D., Bernard S. and Groscolas R.** 2001. Restoration of body mass in King Penguins after egg abandonment at a critical energy depletion stage: early vs late breeders. *Journal of Avian Biology* 32, 303-310.
- Rodríguez-Díaz and Braña** 2011. Shift in thermal preferences of female oviparous common lizards during egg retention: Insights into the evolution of reptilian viviparity. *Evolutionary Biology*, DOI: 10.1007/s11692-011-9122-y.
- Rodríguez-Díaz, Gonzáles F., Ji X. and Braña F.** 2010. Effects of incubation temperature on hatchling phenotypes in an oviparous lizard with prolonged egg retention: are the two main hypotheses on the evolution of viviparity compatible? *Zoology* 113, 33-38.
- Romanoff A.L.** 1960. The avian embryo. New York: Mac Millan.
- Romero L.M. and Reed J.M.** 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology A* 140, 73-79.
- Ross R. A. and Marzec G.** 1990. The reproductive husbandry of pythons and boas. Stanford, CA: Institute for Herpetological Research.
- Saint Girons H.** 1952. Ecologie et éthologie des vipères de France. *Annales des Sciences Naturelles Zool.* 14, 263-343.
- Saint Girons H.** 1957. Le cycle sexuel chez *Vipera aspis* (L) dans l'ouest de la France. *Bulletin Biologique de France et de Belgique* 91, 284-350.
- Saint Girons H.** 1975. Coexistence de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* en Loire Atlantique: Un problème de compétition interspécifique. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 29, 590-613.
- Saint Girons H.** 1980. Biogéographie et évolution des vipères européennes. *Compte Rendu des Scéances de la Société de biogéographie* 496, 146-172.
- Saint Girons H., Naulleau G. and Célérier M.L.** 1985. Le métabolisme aérobie de *Vipera aspis* et de *Vipera Berus* (Reptilia : Viperidae) acclimatées à des conditions naturelles. Influence de la température et comparaison des deux espèces. *Amphibia-Reptilia* 6, 71-81.
- Sakata J.T. and Crews D.** 2003. Embryonic temperature shapes behavioural change following social experience in male leopard geckos, *Eublepharis macularis*. *Animal Behaviour* 66, 839-846.
- Santos X., Arenas C. and Llorente G.A.** 2007. Exploring the origin of egg protein in an oviparous water snake (*Natrix maura*) *Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular and integrative Physiology* 147, 165-172.
- Sapolsky R.M.** 1992. Neuroendocrinology of the stress response, in: Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D. (Eds.), *Behavioral Endocrinology*, MIT Press, Cambridge, MA and London, pp. 287-324.
- Sarkar P., Bergman K., Fisk N.M., O'Connor T.G. and Glover V.** 2007. Ontogeny of foetal exposure to maternal cortisol using midtrimester amniotic fluid as a biomarker. *Clinical Endocrinology* 66, 636-640.
- Schultz T. J., Webb J. K. and Christian K. A.** 2008. The physiological cost of pregnancy in a tropical viviparous snake. *Copeia* 2008, 637-642.
- Schwarzkopf L.** 1996. Decreased food intake in reproducing lizards: a fecundity-dependent cost of reproduction? *Australian Journal of Ecology* 21, 355-362.



- Schwarzkopf L. and Shine R.** 1991. Thermal biology of reproduction in viviparous skinks, *Eulamprus tympanum*: Why do gravid females bask more? *Oecologia* 88, 562-569.
- Schwarzkopf L. and Shine R.** 1992. Costs of reproduction in lizards. Escape tactics and susceptibility to predation. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 31, 17-25.
- Schwilch R., Grattarola A., Spina F. and Jenni L.** 2002. Protein loss during long-distance migratory flight in passerine birds: adaptation and constraint. *Journal of Experimental Biology* 205, 687–695.
- Scribner S.J. and Wynne Edwards K.E.** 1994. Thermal constraints on maternal behaviour during reproduction in dwarf hamsters (*Phodopus*). *Physiological Behaviour* 55, 897-903.
- Seebacher F., Murray S.A. and Else P.L.** 2009. Thermal acclimation and regulation of metabolism in a reptile (*Crocodylus porosus*): the importance of transcriptional mechanisms and membrane composition. *Physiological and Biochemical Zoology* 82, 766-775.
- Seigel R.A. and Ford N.B.** 1987. Reproductive ecology. *Snakes: Ecology and evolutionary biology* (eds R.A. Seigel, J. T. Collins and S. S. Novak), pp 210-252. Macmillan, New York.
- Seigel R.A., Huggins M.M. and Ford N.B.** 1987. Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in snakes. *Oecologia* 73, 481-485.
- Senechal E., Bety J, Gilchrist H.G., Hobson K.A. and Jamieson S.E.** 2011. Do purely capital layers exist among flying birds? Evidence of exogenous contribution to arctic-nesting common eider eggs. *Oecologia* 165, 593-604.
- Sheridan M.A.** 1994. Regulation of lipid-metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 107, 495-508.
- Sheriff M.J., Kenagy G.J., Richter M., lee T., Tøien Ø., Kohl F., Buck C.L. and Barnes B.M.** 2011. Phenological variation in annual timing of hibernation and breeding in nearby populations of Arctic ground squirrels, *Proceedings of the Royal Society B* 278, 2369-2375.
- Shine R.** 1980. Costs of reproduction in reptiles. *Oecologia* 46, 92-100.
- Shine R.** 1983a. Reptilian reproductive modes: the oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica* 39, 1-8.
- Shine R.** 1983b. Reptilian viviparity in cold climates: testing the assumptions of an evolutionary hypothesis. *Oecologia* 57, 397-405.
- Shine R.** 1985. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. Pp 605–694 *In*: C. Gans and F. Billett, eds. *Biology of the Reptilia*. Vol. 15. Wiley, New York.
- Shine R.** 1988. Parental care in reptiles. *In*: *Biology of the Reptilia*, volume 16, Ecology. Gans C. and Huey R.B. (eds), Alan R. Liss, New York pp 275-330.
- Shine R.** 1989. Ecological influences on the evolution of vertebrate viviparity. Pp 263–278 *in*: D. B. Wake and G. Roth, eds. *Complex organismal functions: integration and evolution in vertebrates*. Wiley, Chichester.
- Shine R.** 1995. A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *The American Naturalist* 145, 809-823.
- Shine R.** 1999. Why is sex determined by nest temperature in many reptiles? *Trends in Ecology and Evolution* 14, 186-189.
- Shine R.** 2003. Locomotor speeds of gravid lizards: placing “costs of reproduction” within an ecological context. *Functional Ecology* 17, 526-533.
- Shine R.** 2004a. Adaptive consequences of developmental plasticity. *In*: Deeming DC, ed. *Reptilian incubation: environment, evolution, and behaviour*. Nottingham University Press, 187-210.
- Shine R.** 2004b. Incubation regimes of cold-climate reptiles: the thermal consequences of nest-site choice, viviparity and maternal basking. *Biological Journal of the Linnean Society* 83, 145-155.
- Shine R.** 2004c. Seasonal shifts in nest temperature can modify the phenotypes of hatchling lizards, regardless of overall mean incubation temperature. *Functional Ecology* 18, 43-49.
- Shine R.** 2006. Is increased maternal basking an adaptation or a pre-adaptation to viviparity in lizards? *Journal of Experimental zoology A- Comparative Experimental Zoology* 305A, 524-535.



- Shine R. and Brown G.P.** 2002. Effects of seasonally varying hydric conditions on hatchlings phenotypes of keelback snakes (*Tropidonophis mairii*, Colubridae) from Australia wet-dry tropics? *Biological Journal of the Linnean Society* 76, 339-347.
- Shine R. and Bull J.J.** 1979. The evolution of live-bearing in lizards and snakes. *The American Naturalist* 113, 905-923.
- Shine R. and Elphick M.** 2001. The effect of short-term weather fluctuations on temperatures inside lizards nest, and on the phenotypic traits of hatchling lizards. *Biological Journal of the Linnean Society* 72, 555-565.
- Shine R. and Guillelte L.** 1988. The evolution of viviparity in reptiles: A physiological model and its evolutionary consequences. *Journal of Theoretical Biology* 132, 43-50.
- Shine R. and Harlow P.** 1993. Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia* 96, 122-127.
- Shine R. and Harlow P.S.** 1996. Maternal manipulation of offspring phenotypes via nest-site selection in an oviparous reptile. *Ecology* 77, 1808-1817.
- Shine R. and Madsen T.** 1996. Is thermoregulation unimportant for most reptiles? An example using water pythons (*Liasis fuscus*) in tropical Australia. *Physiological Zoology* 69, 252-269.
- Shine R. and Olsson M.** 2003. When to be born? Prolonged pregnancy or incubation enhances locomotor performance in neonatal lizards (Scincidae). *Journal of Evolutionary Biology* 16, 823-832.
- Shine R. and Slip D.J.** 1990. Biological aspects of the adaptive radiation of Australasian snakes. *Copeia* 1994, 851-867.
- Shine R., Elphick M. and Barrott E.G.** 2003. Sunny side up: lethally high, not low, temperatures may prevent oviparous reptiles from reproducing at high elevations. *Biological Journal of the Linnean Society* 78, 325-334.
- Shine R., Elphick M. and Harlow P. S.** 1997a. The influence of natural incubation environments on the phenotypic traits of hatchling lizards. *Ecology* 78, 2559-2568.
- Shine R., Langkilde T., Wall M. and Mason R.T.** 2005. The fitness correlates of scalation asymmetry in garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*. *Functional Ecology* 19, 306-314.
- Shine R., Madsen T., Elphick M. and Harlow P. S.** 1997b. The influence of nest temperatures and maternal brooding on hatchling phenotypes of water pythons. *Ecology* 78, 1713-1721.
- Sih A.** 1980. Optimal behaviour: can foragers balance two conflicting demands. *Science* 210, 1041-1043.
- Sih A.** 1997. To hide or not to hide? Refuge use in a fluctuating environment. *Trends in Ecology and Evolution* 12, 375-376.
- Sinervo B. and Licht P.** 1991. Hormonal and Physiological control of clutch size, egg size and egg shape in side-blotched lizards (*Uta stansburiana*): constraints on the evolution of lizards life histories. *Journal of Experimental Zoology* 257, 252-264.
- Sinervo B. and Svensson E.** 1998. Mechanistic and selective causes of life-history trade-off and plasticity. *Oikos* 83(3), 432-442.
- Sinervo B., Doughy P., Huey R.B. and Zmudio K.** 1992. Allometric engineering: a causal analysis of natural selection on offspring size. *Science* 258, 1927-1930.
- Slip D.J. and Shine R.** 1988. Reptilian endothermy: a field study of thermoregulation by brooding diamond pythons. *Journal of Zoology* 216, 367-378.
- Smith C. C. and Fretwell S. D.** 1974. The optimal balance between size and number of offspring. *The American Naturalist* 108, 499-506.
- Solick D.I. and Barclay R.M.R.** 2006. Thermoregulation and roosting behaviour of reproductive and nonreproductive female western long-eared bats (*Myotis evotis*) in the Rocky Mountains of Alberta. *Canadian Journal of Zoology* 84, 589-599.
- Somm E., Schwitzgebel V.M., Vauthay D.M., Camm E.J., Chen C.Y., Giacobino J.P. Sizonenko S.V., Aubert M.L. and Hüppi P.S.** 2008. Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences on the control of body weight and glucose metabolism later in life. *Endocrinology* 149, 6289-6299.



- Somma L.A.** 1990. A categorization and bibliographic survey of parental behavior in lepidosaurian reptiles. *Smithsonian Herpetological Information Service* 81, 1-53.
- Somma L.A.** 2003. Parental behavior in lepidosaurian and testudinian reptiles. Krieger publishing Co., Florida.
- Sorci G. and Clobert J.** 1999. Natural selection on hatchling body size and mass in two environments in the common lizard (*Lacerta vivipara*) *Evolutionary Ecology Research* 1, 303-316.
- Speake B.K. and Thompson M.B.** 2000. Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 127, 453-467.
- Speake B.K., Thompson M.B., Thacker F.E. and Bedford G.S.** 2003. Distribution of lipids from the yolk to the tissues during development of the water python (*Liasis fuscus*). *Journal of Comparative Physiology B –Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 173, 541-547.
- Spee M., Beaulieu M., Dervaux A., Chastel O., Le Maho Y. and Raclet T.** 2010. Should I stay or should I go? Hormonal control of nest abandonment in a long-lived bird, the Adelie penguin. *Hormone and Behavior* 58, 762-768.
- Stahlschmidt Z. and DeNardo D. F.** 2008a. Alternating egg-brooding behaviors create and modulate a hypoxic developmental micro-environment in Children's pythons (*Antaresia childreni*). *Journal of Experimental Biology* 211, 1535-1540.
- Stahlschmidt Z. R. and DeNardo D. F.** 2009a. Obligate costs of parental care to offspring: egg brooding-induced hypoxia creates smaller, slower and weaker python offspring. *Biological Journal of the Linnean Society* 98, 414-421.
- Stahlschmidt Z., Brashears J. and DeNardo D. F.** 2011. The role of temperature and humidity in python nest site selection. *Animal Behaviour* 81, 1077-1081.
- Stahlschmidt Z., Hoffman T. and DeNardo D. F.** 2008b. Postural shifts during egg-brooding and their impact on egg water balance in Children's pythons (*Antaresia childreni*). *Ethology* 114, 1113-1121.
- Stahlschmidt Z.R. and DeNardo D.F.** 2009b. Effect of nest temperature on egg-brooding dynamics in Children's pythons. *Physiology and Behavior* 98, 302-306.
- Stapley J. and Keogh J.S.** 2004. Exploratory and antipredator behaviours differ between territorial and nonterritorial male lizards. *Animal Behaviour* 68, 841-846.
- Stewart J.R. and Thompson M.B.** 2000. Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 127, 411-431.
- Sulik K.K., Johnston M.C. and Webb M.A.** 1981. Fetal Alcohol syndrome: Embryogenesis in a mouse model. *Science* 214, 936-938.
- Tallamy D.W. and Wood T.K.** 1986. Convergence patterns in subsocial insects. *Annual Review of Entomology* 31, 369-390.
- Taylor E.N., Denardo D.F. and Malawy M.A.** 2004. A comparison between point-and semi-continuous sampling for assessing body temperature in a free-ranging ectotherm. *Journal of Thermal Biology* 29, 91-96.
- Telemeco R.S. and Baird T.A.** 2011. Capital energy drives production of multiple clutches whereas income energy fuels growth in female collared lizards *Crotaphytus collaris* *Oikos* 120, 915-921.
- Thompson J.** 1977. Embryo-maternal relationships in a viviparous skink *Sphenomorphus quoyii* (Lacertilia; Scincidae). In *Reproduction and Evolution*, J.H. Calaby and C.H. Tyndale-Biscoe, Ed. Australian Academy of Science.
- Thompson J.** 1981. A study of sources of nutrients for embryonic development in a viviparous lizard, *Sphenomorphus quoyii*. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology* 70, 509-518.
- Tinkle D.W. and Gibbons J.W.** 1979. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous Publications, Museum of zoology, University of Michigan*.
- Tokarz R.R., McMann S., Seitz L. and John-Alder H.** 1998. Plasma corticosterone and testosterone levels during the annual reproductive cycle of male brown anoles (*Anolis sagrei*). *Physiological Zoology* 71, 139-146.



- Trivers R.L.** 1974. Parent-offspring conflict. *American Zoologist* 14, 249-264.
- Tschirren B., Fitze P.S. and Richner H.** 2007. Maternal modulation of natal dispersal in a passerine bird: An adaptive strategy to cope with parasitism. *American Naturalist* 169, 87-93.
- Tyrell C.L. and Cree A.** 1998. Relationships between corticosterone concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (tuatara, *Sphenodon punctatus*). *General and Comparative Endocrinology* 110, 97-108.
- Ujvari B., Shine R., Luiselli L. and Madsen T.** 2011. Climate-induced reaction norms for life-history traits in pythons. *Ecology* 92, 1858-1864.
- Uller T.** 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology and Evolution* 23, 432-438.
- Uller T. and Olsson M.** 2003. Prenatal exposure to testosterone increase ectoparasite susceptibility in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Proceedings of the Royal Society B* 270, 1867-1870.
- Uller T. and Olsson M.** 2010. Offspring size and timing of hatching determine survival and reproductive output in a lizard. *Oecologia* 162, 663-671.
- Uller T., Hollander J., Astheimer L. and Olsson M.** 2009. Sex-specific developmental plasticity in response to yolk corticosterone in an oviparous lizard. *Journal of Experimental Biology* 212, 1087-1091.
- Vacher J.P. and Geniez M.** 2010. Les reptiles de France, Belgique, Luxembourg et Suisse. Biotopt, Mèze (Collection Parthénope) ; Museum d'histoire naturelle, Paris 544 p.
- Valenzuela N.** 2004. Temperature-dependent sex determination. *In*: Deeming DC, ed. Reptilian incubation: environment, evolution, and behaviour. Nottingham University Press, 211-227.
- Valenzuela N. and Lance V. A.** 2004. Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Washington DC: Smithsonian Books.
- Valkonen J., Niskanen M., Björklund M. and Mappes J.** 2011. Disruption or aposematism? Significance of dorsal zigzag pattern of European vipers. *Evolutionary Ecology* DOI 10.1007/s10682-011-9463-0.
- Van Berkum F. H.** 1986. Evolutionary pattern of the thermal sensitivity of sprint speed in *Anolis* lizards. *Evolution* 40, 594-604.
- Van de Have T..M.** 2002. A proximate model for thermal tolerance in ectotherms. *Oikos* 98, 141-155.
- Varpe O., Jorgensen C., Tarling G.A. and Fiksen O.** 2009. The adaptive value of energy storage and capital breeding in seasonal environments. *Oikos* 118, 363-370.
- Vercken E., De Fraipont M., Dufty A.M. and Clobert J.** 2006. Mother's timing and duration of corticosterone exposure modulate offspring size and natal dispersal in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Hormones and Behaviour* 51, 379-386.
- Vervust B. and Van Damme R.** 2009. Marking lizards by heat branding. *Herpetological Review* 40, 173-174.
- Vinegar A.** 1973. The effects of temperature on the growth and development of embryos of the Indian python *Python molurus* (Reptilia: Serpentes: Boidae). *Copeia* 1973, 171-173.
- Vinegar A.** 1974. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development in snake embryos. *Herpetologica* 30, 73-74.
- Vinegar A., Hutchinson V. H. and Dowling H. G.** 1970. Metabolism, energetics and thermoregulation during brooding of snakes of the genus *Python* (Reptilia, Boidae). *Zoologica* 55, 19-45.
- Virkkala R. and Rajasarkka A.** 2011. Climate change affects populations of northern birds in boreal protected areas. *Biology Letters* 7, 395-398.
- Wapstra E.** 2000. Maternal basking opportunity affects juvenile phenotype in a viviparous lizard. *Functional Ecology* 14, 345-352.
- Wapstra E., Uller T., While G.M., Olsson M. and Shine R.** 2010. Giving offspring a head start in life: field and experimental evidence for selection on maternal basking behaviour in lizards. *Journal of Evolutionary Biology* 23, 651-657.
- Warner D.A. and Andrews R.M.** 2002. Nest-site selection in relation to temperature and moisture by the lizard *Sceloporus undulatus*. *Herpetologica* 58, 399-407.



- Warner D.A. and Andrews R.M.** 2003. Consequences of extended egg retention in the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Journal of Herpetology* 37, 309-314.
- Warner D.A. and Shine R.** 2007. Fitness of juvenile lizards depends on seasonal timing of hatching, not offspring body size. *Oecologia* 154, 65-73
- Warner D.A. and Shine R.** 2008. Determinants of dispersal distance in free-ranging juvenile lizards. *Ethology* 114, 361-368.
- Warner D.A., Bonnet X., Hobson K.A. and Shine R.** 2008. Lizards combine stored energy and recently acquired nutrients flexibly to fuel reproduction. *Journal of Animal Ecology* 77, 1242-1249.
- Warton D.I. and Hui F.K.C.** 2011. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology* 92, 3-10.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M. and Meaney M.J.** 2004. Epigenetic programming by maternal behaviour. *Nature Neurosciences* 7, 847-854.
- Webb J., Brown G. P. and Shine R.** 2001. Body size, locomotor speed and antipredator behaviour in a tropical snake (*Tropidonophis mairii*, Colubridae): the influence of incubation environments and genetic factors. *Functional Ecology* 15, 561-568.
- Webb J.K. and Whiting M.J.** 2005. Why don't small snakes bask? Juvenile broad-headed snakes trade thermal benefits for safety. *Oikos* 110, 515-522.
- Webb J.K., Shine R. and Christian K.A.** 2006. The adaptive significance of reptilian viviparity in the tropics: Testing the maternal manipulation hypothesis. *Evolution* 60, 115-122.
- Wells J.C.K.** 2003. The thrifty phenotype hypothesis: thrifty offspring or thrifty mother? *Journal of Theoretical Biology* 221, 143-161.
- West-Eberhard M.J.** 2003. Developmental plasticity. Oxford University Press. 794 pp.
- Wheatley K.E., Bradshaw C.J.A., Harcourt R.G. and Hindel M.A.** 2008. Feast or famine: evidence for mixed capital-income breeding strategies in Weddell seals. *Oecologia* 155, 11-20.
- Whitaker P.B., Ellis K. and Shine R.** 2000. The defensive strike of the Eastern Brownsnake, *Pseudonaja textilis* (Elapidae). *Functional Ecology* 14, 25-31.
- White H.B.** 1991. Maternal diet, maternal proteins and egg quality. *In: Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*, pp 1-15 (Deeming DC and Ferguson MW J, eds), Cambridge University Press, Cambridge.
- Williams E.L. and Casanova M.F.** 2010. Potential teratogenic effects of ultrasound on corticogenesis: Implications for autism. *Medical Hypotheses* 75, 53-58.
- Wilson S, Swan G.** 2003. A complete guide to reptiles of Australia. Frenchs Forest, Australia: New Holland Publishers.
- Wilson B.S. and Wingfield J.C.** 1992. Correlation between female reproductive condition and plasma corticosterone in the lizard *Uta stansburiana*. *Copeia* 3, 691-697.
- Wilson R.S. and Franklin C.E.** 2002. Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*. 17, 66-70.
- Wingfield J.C. and Sapolsky R.M.,** 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how? *Journal of Neuroendocrinology* 15, 711-724.
- Wingfield J.C., Maney D.L., Breuner C.W., Jacobs J.D., Lynn S., Ramenofsky M., Richardson R.D.** 1998. Ecological bases of hormone-behavior interactions: the "emergency life history stage." *American Zoologist* 38, 191-206.
- Wootton S.A. and Jackson A.A.** 2009. Influence of under-nutrition in early life on growth, body composition and metabolic competence. *In* Henry C.J.K. and Ulijaszek S.J. 2009. Long-term consequences of early environment. Growth, development and the lifespan developmental perspective. Society for the study of human biology, Symposium series: 37. Cambridge University Press, New York.
- Wourm** 1993. Maximization of evolutionary trends for placental viviparity in the spadenose shark, *Scoliodon laticaudus*. *Environmental Biology of Fishes* 38, 269-294.
- Wu G.Y., Bazer F.W., Cudd T.A., Meininger C.J. and Spencer T.E.** 2004. Maternal nutrition and fetal development. *Journal of Nutrition* 134, 2169-2172.



- Wüster W., Allum C.S.E., Bjargardóttir B.I., Bailey K.L., Dawson K.J., Guenioui J., Lewis J., McGurk J., Moore A.G., Niskanen M. and Pollard C.P.** 2004. Do aposematism and Batesian mimicry require bright colours? A test, using European viper markings. *Proceedings of the Royal Society of London* 271: 2495-2499.
- Ydenberg R.C. and Dill L.M.** 1986. The economics of fleeing from predators. *Advances in the Study of Behaviour* 16, 229-149.
- Zaidan F.** 2003. Variation in cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus leucostoma*) resting metabolic rates. *Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular and integrative Physiology* 134, 511-523.
- Zambrano E., Martinez-Samaoya P. M., Bautisca C. J., Deás M., Guillén L., Rodríguez-González G. L., Guzmán C., Larrea F. and Nathanielsz P. W.** 2006. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *Journal of Physiology* 566, 225-236.

