



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie Agro Santé

présentée par

Thomas Foucart

Préparée à l'unité de recherche UMR 6553 ECOBIO
Ecosystèmes Biodiversité Evolution
UFR SVE

**L'évolution de
l'oviparité à la
viviparité chez les
Reptiles :**

**Approche éco-
physiologique de
l'équilibre des coûts et
bénéfices chez une espèce
à reproduction bimodale
(*Zootoca vivipara*).**

**Thèse soutenue à Paimpont
le 15 Décembre 2015**
devant le jury composé de :

Jean-François LE GALLIARD
Chargé de recherche
Université Pierre-Marie Curie / *rapporteur*

Pierre JOLY
Professeur
Université Lyon 1 / *rapporteur*

Pierre-André CROCHET
Chargé de recherche
Université de Lyon 1 / *examineur*

Yann VOITURON
Professeur
Université de Lyon 1 / *examineur*

Luc MADEC
Professeur
Université Rennes 1 / *examineur*

Xavier BONNET
Directeur de recherche
CEBC-CNRS / *examineur*

Oliver LOURDAIS
Chargé de recherche
CEBC-CNRS / *co-directeur de thèse*

Benoît HEULIN
Chargé de recherche
Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

Remerciements

Nous voici arrivés en ce jour à une charnière de la vie. Plus tout à fait un étudiant et pas encore réellement un professionnel, la thèse nous permet de grandir et de nous épanouir au sein de la connaissance humaine, oui oui, rien que ça! À la fin de nos études, nous posons nos valises dans un champ de recherche vers lequel nous nous sommes dirigés au fil de nos décisions, de nos goûts, de nos succès et parfois même grâce à nos échecs. Mais nous ne sommes que de passage. À la fin de ces trois années, nous partirons ailleurs, nous partirons sur une nouvelle route. Voici ce qu'est la thèse.

« Le possible est fait, l'impossible en cours,
prévoir un délai pour les miracles »

Ce proverbe n'est jamais plus vrai que pour une thèse. Nous collectons et analysons des données sur un sujet, nous écrivons des articles sur des sujets extrêmement précis et nous concluons nos recherches par de nouveaux questionnements. C'est la dure réalité du monde scientifique qui n'a de limite que celle de l'imagination de ses serviteurs. Autrement dit, il n'y a pas de limite à ce travail dont nous n'exposons que des conclusions qui n'en sont jamais vraiment. Et ce travail nous le faisons, et nous nous soumettons à ses lois. Ces lois qui évoluent dans un monde où la connaissance devient une marchandise que l'on a déjà mondialisée et monnayée. Ici aussi les petits producteurs se retrouvent exploités par les grandes enseignes. Mais ici nous n'avons pas accès à des labels éthique-friendly, faire-trade ou Bio sans traitement à la poudre de Perlinpinpin. C'est aussi ça la science, un marché au sein duquel il faut savoir se faire une place en apprenant à nager dans une mer parfois très

capricieuse. C'est là où le « Nous » prend un nouveau sens. Il n'est plus le généraliste, mais il devient « la désignation d'un ensemble ». Il devient « la résultante de l'interaction moyenne des actions dépendantes, ou indépendantes, de la vie d'un individu, dont la variation d'occurrence, dépendant de ses interactions avec un environnement multivariable » ; comme nous pourrions l'exprimer pompeusement sans que je ne sois vraiment sûr de comprendre moi-même le sens de ce que je dis ! Le « Nous » c'est « Vous » qui avez croisé ma route ! Vous qui m'aurez appris à nager dans ce monde, me permettant de me présenter aujourd'hui en tant que candidat au titre de docteur en Biologie de l'Université de Rennes 1.

Merci à vous tous.

Ordre chronologique, hiérarchique ou de valeur... franchement je vais tout mélanger. Impossible de pouvoir faire une distinction entre vous, car elle n'a pas lieu d'être !

Merci amis, famille, collègues, patrons, relations de relations, connaissances, relecteurs de la thèse, examinateurs et les autres. **Benoit** et **Oli**, merci de m'avoir permis de réaliser cette thèse et de m'avoir accordé votre confiance pour ce travail.

Merci à **Xavier**, **Jérôme**, **Oli**, **Maxime**, **Mr Masset**, **Dave**, **Guillaume** et **Benoit** de m'avoir fait découvrir le monde des reptiles, de m'avoir appris à les connaître, à les comprendre, à les manipuler, à les craindre parfois. Nous n'oublierons pas l'ensemble des copains herpétos avec qui j'aurai trouvé, manipulé ou observé un certain nombre d'animaux : **Stéphane**, **Tony**, **Mathieu** et **Jérem**. Merci à vous tous de m'avoir emmené en RBI à Chizé, sur Golem Grad, dans les tourbières de Bretagne, des Pyrénées ou du Limousin ou encore au contact d'animaux plus

exotiques encore ! Merci à **Marianne** et **Axelle**. Je vous souhaite autant de réussite que possible et vous remercie pour votre aide à la réalisation de cette thèse.

Pour continuer sur le sujet des animaux, je remercie aussi **Hoël** bien sûr, pour m'avoir amené en traque photo! L'approche du chevreuil ou la rencontre avec la biche et son faon pieds nus en forêt sauvage font partie des rencontres que je garderai gravées en mémoire pour longtemps. Si on sort des vertébrés bien sûr comment ne pas citer l'entomologiste le plus qualifié, passionné et méritant de mon entourage ! Plus qu'une admiration c'est une véritable amitié indestructible qu'il existe à ce jour avec **Pilou** ! Merci (enfin je crois) de m'avoir fait découvrir ces animaux, emmener à les collectionner et les élever pour mieux les découvrir. Aujourd'hui je ne souhaite plus les tuer, car je ne suis qu'amateur, mais promis, je ferai un effort pour *Macrodonia cervicornis* si j'en trouve! Au passage un coucou à Meredith alias *Daemon sp.* Je pourrais également ajouter beaucoup de monde à cette liste des personnes m'ayant permis ou qui vont me permettre de découvrir le monde animal sous toutes ses formes et de différentes manières : **mon grand-père** qui m'emmena pêcher en Mer ou en eau douce, **mes parents** qui nous amenaient au Zoo, **Alice** qui m'emmènera bientôt voir ses dauphins et la forêt brésilienne, les différentes sorties naturalistes de mon parcours avec **Mrs LeGentil**, **LeCarret**, **Poinsot**, **Mme Berthet** et tous les autres profs dont je ne pourrais pas me souvenir du nom. Bon oui je dois aussi en parler... mais pas trop longtemps Ok ??? Merci **Pierrick** pour les oiseaux... même si une poule, qu'elle vole ou pas, ça reste une poule! Les animaux peuvent aussi être domestiques et/ou captifs. À ce jour je n'aurai jamais approché de si près les chevaux, les singes, les dauphins, les mygales, les outardes, les anatalantas, toutes ces

espèces de reptiles, dont l'anaconda, les varans malais, les *Caloselasma...*, les *Bitis*, les tortues géantes des Seychelles, les crocodiles du nil, les *Chélidra serpentina*, les pythons réticulés, le Bush master, les serpents à sonnette, les cobras et temps d'autres sans vous **Xavier**, **Hervé**, **Guillaume**, **Mr Masset**, **Céline** dite « Tonton », **Dave**, **Camille**, **Audrey**, **Arnaud**, **Alice**, **Philippe**.

Comment faire l'impasse sur le côté alimentaire de la thèse. Quand vous partagez un repas pendant ou après votre journée de travail le moral et l'énergie reviennent. Impossible de citer tous ceux m'ayant nourri et tous ceux que j'ai nourris. Je pense en premier **aux équipes des cuisines de Chizé et Paimpont** qui eux sont au top. Le plus souvent nous venons aux repas pour découvrir et non pour nous nourrir et malheureusement je risque de ne plus jamais retrouver cela... Sans cuisine professionnelle il y a toujours les moyens du bord d'une cuisine classique. Merci aux quelques **60 stagiaires** que j'ai pu connaître dans mes deux labos, aux quelques **thésards** toujours de plus en plus passionnés par le vin, le pâté, le saucisson et le fromage que par un plat de pâtes ou une séance d'abdos (quoique...). À ce sujet, merci également **aux colocs** qui permettent parfois de tester de nouveaux plats peu communs ou de faire une commande de pizza inattendue à J-5!

Et là le sérieux se dégrade, car nous allons passer aux remerciements des personnes ayant pu me soutenir dans certains moments de mauvaise humeur, c'est à dire aux gens auprès desquels l'humour et la compassion ont plus de valeur que la morosité et les difficultés. C'est ici que la famille doit arrêter sa lecture, ainsi que tout éventuel futur collaborateur! Merci **Pierrick**, celui à qui je pense ressembler beaucoup dans les émotions et la manière de vivre la fin de thèse. Bougon, humour pénible pour les cibles de ses

blagues, restant très sérieux jusqu'aux craquages dont le souvenir doit rester enfoui. Merci **Tonton**. Premièrement, car tout le monde te le dira : tu es gentille ! Eh oui ... un si petit mot pour exprimer beaucoup. Discussion, compréhension, partage, entraide... Et puis aussi merci, car je n'ai pas eu à faire affaire à Dark Cel1 pour le moment. La moitié du pays s'était déplacée pour ta thèse et ce n'est pas lié au hasard, car tu es tout simplement généreuse. Mais ce n'est pas la seule chose que tu mérites... MERCI à **toi** et **Hoël** de m'avoir hébergé lorsque mon appartement a brûlé, à **Alexia** également avec qui vous avez pris soin de mes serpents. Merci **Cécile**, relation ponctuelle sans variation de rythme, soutien morale mutuel, partage d'expériences et compréhension. Rien de plus n'est nécessaire pour pouvoir te remercier d'avoir partagé l'investissement dans la thèse. Merci également à **Camille**, coloc d'un jour et camarade dans les galères perso !

Merci **Muriel** de m'avoir demandé sincèrement « comment ça va ? ». Il est vrai que cette question m'a plus marqué de ta part, car nous ne nous connaissions pas beaucoup, mais tu n'es pas la seule à mériter ces remerciements : **Cécile**, **Alice**, **Kevin**, **Céline**, mais aussi fulgurant que ce fut, **Phillipe** et **Soazic** également : merci. Merci à tous eux qui ont pu m'épauler dans des moments où j'ai pesté, raller voir envisager de tout quitter pour simplement fuir ! Quelle bêtise j'aurai faite ! **Alice** surtout, mais aussi **Charlène** merci! Merci aussi à **Marie** qui a permis de relativiser de décompresser et de continuer le travail. Merci à **Nico** et **Sophie** de m'avoir guidé et donner un vrai goût à la science. Une phrase prononcée comme ça, sans prétention, m'aura pourtant permis de tenir la course jusqu'au bout !

Merci aux amis et aux autres, mais surtout à **Marc**! Merci **Anne-Kristel** de toujours être dispo ! Sans toi certaines choses auraient pu être bien plus complexes ! Merci **Pascaline** pour ton aide répartie tout au long de la thèse. Merci **Annegret** et **Christophe** pour vos partages d'expérience et pour ceux qui arriveront encore ! Merci à **Mathieu**, pour l'idée du pique-nique sur la plage ...! Merci à tous ceux qui ping-pongent après le repas, **Yoann**, **Daniel**, **Kevin**, **Sarah**, **Christophe**, **Maxime** et **Albin** surtout ce fameux 12^{ème} jour du mois d'octobre 2015 où, contre toute attente, je me vis décerné la ceinture du champion de la World Wide Championship de ping-pong Paimpontais ! Merci à la petite équipe de soutiens du dernier moment, ceux qui ont permis de transformer le numérique en matériel : **Alice**, milles merci, **Yoann** et **Daniel**. Et que serait la station sans les petites bêtes qui nous accompagnent ! Merci donc à **Maya** et à **Arkham**, sans oublier **Saucisse** !

Désormais je quitte certain d'entre vous, je m'éloigne d'autres, je poursuis ma route avec d'autres. Nous avons fait tout cela ensemble, vous m'avez permis d'arriver là où je suis !

Bon vent à vous, bon vent à Nous!



Résumé

Dans son *Historia Animalium* en 343 av. J.C., Aristote proposait déjà deux critères qui continuent d'être les bases fondamentales de notre compréhension de la diversité des modes de reproduction : l'origine des nutriments des embryons (lécitotrophie vs. matrotrophie) et le mode de partition (oviparité vs. viviparité). Depuis plusieurs décennies la compréhension de la transition évolutive vers la viviparité a attiré un intérêt scientifique considérable. En effet les analyses phylogénétiques récentes reconnaissent une évolution indépendante de la viviparité dans plus de 150 lignées de vertébrés dont au moins 115 concernent uniquement le taxon des reptiles squamates actuels (lézards, serpents et amphisbènes). Les lignées présentant une transition évolutive de l'oviparité à la viviparité chez les squamates se retrouvent généralement associées aux climats froids, mais pas uniquement. Les explications proposées pour ce patron reposent sur le contrôle comportemental de la température de développement chez les femelles gestantes, offrant ainsi des températures plus favorables que celles des sites de ponte situés sous la surface du sol.

Durant cette thèse doctorale nous avons étudié une espèce à reproduction bimodale (*Zootoca vivipara*) chez qui coexistent des populations ovipares et vivipares disjointes. Ce contexte nous a permis de comparer les modes reproducteurs en minimisant les biais phylogénétiques. Nous avons pu mettre en évidence et quantifier différents coûts « potentiels » de la reproduction (énergétique, contrainte volumique, phénotype des nouveau-nés) et certains bénéfiques (phénologie et performance des nouveau-nés) associés à la régulation maternelle du développement. Nos résultats nous amènent à discuter des différentes pressions de sélection s'exerçant sur la durée de rétention des embryons, dont les directions seraient opposées et/ou dont l'intensité serait variable au cours du développement embryonnaire. Dans ce schéma, la viviparité ne devrait être favorisée que dans des contextes plus contraignants et où les bénéfiques thermiques compensent les coûts de prolongation de la rétention. Ce contexte sélectif aurait abouti chez les squamates à l'existence de deux modalités reproductives avec entre elles une instabilité évolutive des états intermédiaires.

Abstract

In his *Historia Animalium* in 343 B.C., Aristotle proposed two fundamental distinguishing criteria for reproductive diversity: the source of nutrients for embryonic development (lecitotrophy vs. matrotrophy) and parturition mode (oviparity vs. viviparity). Understanding the evolutionary transition to viviparity attracted considerable scientific interest over the past few decades. Phylogenetic analyses indicate that viviparity has originated independently in more than 150 vertebrate lineages, including in a minimum of 115 clades of extant squamate reptiles (lizards, snakes and amphisbaenians). Transitions from oviparity to viviparity in squamate reptiles seem closely related to cold climates, but not exclusively. Explanations for this pattern are based on the fact that pregnant females can behaviourally thermoregulate and thus offer more suitable developmental temperatures than those available in nests under the soil surface.

During this PhD thesis we studied a reproductively bi-modal species (*Zootoca vivipara*) in which non-overlapping oviparous and viviparous populations exist. This context allowed us to compare oviparous and viviparous reproductive modes while minimizing phylogenetic biases. We identified and quantified potential reproductive costs (energy, volume constraints, offspring phenotype) and also benefits (phenology and offspring performances) associated with maternal thermoregulation. Our results provide support for multiple selective pressures on embryo retention, with variable intensities and opposite directions depending on embryonic developmental stage. In this scheme, viviparity should be selected in constraining environments where thermal advantages exceed the costs of increased retention. This context may explain the dichotomy observed in squamate reproductive modes and the evolutionary instability of intermediate stages.

Sommaire de la thèse

- CHAPITRE I - INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART	1
I-1) L'étude de la viviparité : un champ de recherche bien vivant	3
I-1.1) Pourquoi étudier la reproduction	3
I-1.2) Définition et cadre conceptuel	3
I-1.3) Mode de reproduction et approvisionnement nutritif de l'embryon	4
I-1.4) Répartition de la viviparité dans le règne animal	6
I-1.5) La viviparité chez les reptiles	6
I-2) Particularités reproductive des squamates	7
I-2.1) La rétention intra-utérine des embryons.....	7
I-2.2) La thermorégulation comportementale	8
I-3) Pressions sélectives de la viviparité	10
I-3.1) L'hypothèse des climats froids	11
I-3.2) Les bénéfices de la viviparité	11
I-3.3) Les coûts de la viviparité	12
I-3.4) Contraintes morfo-fonctionnelles	13
I-4) Les objectifs de la thèse	15
<hr/>	
- CHAPITRE II - ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR NOTRE MODELE BIOLOGIQUE	17
II-1) Historique de la nomenclature	19
II-2) Une espèce à reproduction bimodale	19
II-3) Description des deux modes reproducteurs	21
II-4) Répartition spatiale et niche écologique	23
II-5) Histoire de l'espèce.....	24
II- 5.1) Un scénario biogéographique général	24
II- 5.2) l'histoire plus complexe de la différenciation de multiples clades	25
<hr/>	
- CHAPITRE III - MATERIEL ET METHODES.....	27
III-1) Maintien des animaux et reproduction en captivité	29
III-1.1) Les adultes.....	29
III-1.2) L'incubation des œufs	30
III-1.3) Cycle de reproduction et suivi échographique	32
III-2) Mesures biométriques par imagerie numérique	33
III-3) Etude du métabolisme par la consommation d'O₂	34
III-3.1) Protocole de mesure pour les adultes	34
III-3.2) Suivi du métabolisme des femelles pendant la reproduction.....	35
III-3.3) Ajustement du protocole aux œufs et nouveau-nés	36
III-3.4) Suivi du métabolisme des œufs depuis la ponte jusqu'à l'éclosion	36

III-4) Manipulation des cycles thermiques	38
III-4.1) Définition des traitements thermiques expérimentaux	38
III-4.2) Design expérimental	41
III-4.3) Phénologie et succès reproducteur	42
III-4.4) Phénotype à la naissance	43
III-4.5) Performances d'endurance.....	43
III-4.6) Performances exploratoires	44
III-4.7) Maintien et suivi en enclos semi-naturels	44
III-5) Contraintes au développement foetal <i>in utero</i>	45
III-5.1) Compromis fécondité/développement.....	45
III-5.2) La flexibilité thoraco-abdominale	45
<hr/>	
- CHAPITRE IV - CHANGEMENTS METABOLIQUE ET COUTS ASSOCIES	47
IV-1) Article 1 – Influence of reproductive mode on metabolic costs of reproduction : insight from a bimodal lizard <i>Zootoca vivipara</i>	48
IV-1.1) traduction française du résumé de l'article 1	48
IV-1.2) Article publié dans « <i>Journal of Experimental Biology</i> ».....	49
IV-2) Article 2 – Determinant of embryonic stages at oviposition and oxygen consumption during incubation in a lizard with prolonged egg retention (<i>Zootoca vivipara</i>)	58
IV-2.1) Traduction française du résumé de l'article 2	58
IV-2.2) Manuscrit de l'article soumis à « <i>Journal of comparative Physiology B</i> »	59
<hr/>	
- CHAPITRE V – MANIPULATION DES CYCLES THERMIQUES	81
V-1) Article 3 – Maternal thermorégulation enhance reproductive phenology and offspring locomotion in an oviparous lizard with extended egg retention (<i>Zootoca vivipara</i>)	82
V-1.1) Traduction française du résumé de l'article 3	82
V-1.2) Manuscrit de l'article 3 en préparation pour « <i>Biological journal of the Linnean Society</i> ».....	83
V-2) Article 4 en préparation - Effet du mode de reproduction et des cycles thermiques de développement sur la phénologie reproductive, le succès reproducteur et les traits des nouveau-nés chez la forme ovipare et la forme vivipare de <i>Zootoca vivipara</i>	111
<hr/>	
- CHAPITRE VI - RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR LES CONTRAINTES VOLUMIQUES D'ENCOMBREMENT	149
VI-1) Contraintes volumiques d'encombrement liées à l'accroissement de poids des œufs au cours du développement embryonnaire : comparaison des formes ovipares et vivipares de <i>Zootoca vivipara</i>	151
<hr/>	
- CHAPITRE VII -DISCUSSION ET CONCLUSION	166
VII-1) La sensibilité thermique du développement	168
VII-2) Les besoins métaboliques des embryons	171
VII-3) Les contraintes volumiques	173
VII-4) La bi-modalité de distribution des stades de développement embryonnaire à la ponte	175
VII-5) Conclusion	179
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE GENERALE	181



- CHAPITRE I - INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART

Sommaire du chapitre

<u>I-1) L'étude de la viviparité : un champ de recherche bien vivant</u>	3
I-1.1) Pourquoi étudier la reproduction	3
I-1.2) Définition et cadre conceptuel	3
I-1.3) Mode de reproduction et approvisionnement nutritif de l'embryon	4
I-1.4) Répartition de la viviparité dans le règne animal	6
I-1.5) La viviparité chez les Reptiles	6
<u>I-2) Particularités reproductive des squamates</u>	7
I-2.1) La rétention intra-utérine des embryons.....	7
I-2.2) La thermorégulation comportementale	8
<u>I-3) Pressions sélectives de la viviparité</u>	10
I-3.1) L'hypothèse des climats froids	11
I-3.2) Les bénéfices de la viviparité	11
I-3.3) Les coûts de la viviparité	12
I-3.4) Contraintes morpho-fonctionnelles	13
<u>I-4) Les objectifs de la thèse</u>	15



L'ÉTUDE DE LA VIVIPARITE : UN CHAMP DE RECHERCHE BIEN VIVANT

Pourquoi étudier la reproduction

La reproduction est, par définition, la fonction biologique centrale de toutes les formes de vie. Elle est le moyen par lequel les organismes persistent au cours du temps en transmettant leurs gènes de génération en génération (Van Dyke *et al.* 2014). Par conséquent, toute modification des caractéristiques de la reproduction est susceptible de faire varier la valeur sélective des organismes (ou *fitness*), dès lors que cette modification entraîne une variation du succès reproducteur. La reproduction apparaît donc à la fois comme un instrument (succès reproducteur) et une cible (caractéristiques de reproduction) de la sélection naturelle.

L'exploration des changements évolutifs et adaptatifs de la reproduction est un vaste champ thématique comportant de nombreuses facettes conceptuelles et méthodologiques (*e.g.* coûts/bénéfices énergétiques, coûts/bénéfices de *fitness* instantanés/life-time, effets maternels, conflit foëto-maternel) et pouvant porter sur des transitions évolutives extrêmement diverses : reproduction sexuée/parthénogénétique, itéroparité/sémelparité, dépendante du milieu aquatique/possible en milieu terrestre, avec fécondation externe/interne, avec / sans soins parentaux aux œufs, avec / sans soins parentaux postnataux par exemple.

Le sujet de cette thèse porte sur la transition évolutive de l'oviparité à la viviparité chez une espèce de reptile squamate. Nous nous focaliserons ainsi, dans les prochains paragraphes de cette introduction, exclusivement sur l'évolution du mode de parité (terme général utilisé pour désigner indifféremment la reproduction avec ponte des femelles ovipares ou celle par gestation suivie de mise bas des femelles vivipares) (Smith 1975, Blackburn 1992, Morafka *et al.* 2000 et Stahlschmidt et DeNardo 2009) en détaillant plus particulièrement le cas des vertébrés Amniotes.

Définition et cadre conceptuel

Littéralement traduisible par « *accoucher d'un être vivant* », la viviparité est un mode de reproduction dans lequel la femelle réalise une gestation et met au monde des jeunes formés (pouvant néanmoins être des stades larvaires dans certains groupes zoologiques). Elle s'oppose à l'oviparité « *accoucher d'un œuf* », où la femelle pond des œufs dans lesquels les embryons

achèvent leur développement au cours d'une période d'incubation externe (avec ou sans soins parentaux), jusqu' à l'éclosion.

D'un point de vue adaptatif, la viviparité est classiquement considérée comme un caractère permettant de soustraire l'embryon à des influences délétères, voire létales, de l'environnement, telles que celles se manifestant dans les sites de pontes des espèces ovipares. L'évolution de la viviparité est néanmoins soumise à la réalisation d'un compromis adaptatif entre les bénéfices immédiats procurés à l'embryon par le développement intra-utérin et les coûts occasionnés à la mère ou aux nouveau-nés qu'ils soient immédiats ou différés dans le temps. Il est par ailleurs utile de replacer la viviparité dans le cadre conceptuel de la manipulation maternelle (revues dans Shine 1995, 2012, 2014) et plus généralement, du concept des effets maternels pendant la gestation (revues dans Mousseau et Fox 1978, Marshall et Uller 2009, Mousseau *et al.* 2009) qui distingue :

- les effets maternels « passifs » (neutres ou non adaptatifs)
- les effets maternels « préadaptatifs » qui vont influencer sur le développement des futurs nouveau-nés pour produire le phénotype le mieux adapté aux conditions locales postnatales
- les effets maternels de « bet-hedging » qui au contraire, en raison de conditions locales instables ou fluctuantes, favorisent la production d'une plus grande variété de phénotypes au sein la portée.
- les effets maternels « égoïstes », intervenant dans le cadre d'un conflit d'intérêts fœto-maternel. Ces effets peuvent conduire à produire des phénotypes de nouveau-nés de moindre valeur sélective au profit d'un avantage sélectif différé pour la mère comme une meilleure valeur reproductive résiduelle (voir aussi à ce sujet le débat entre DeNardo *et al.* 2012, Schawrzkopf et Andrews 2012a, 2012b, Shine 2012).

Mode de reproduction et approvisionnement nutritif de l'embryon.

Il existe parfois dans la littérature sur les vertébrés une confusion entre la notion de mode de reproduction (oviparité vs. viviparité), dont la définition stricte est donnée ci-dessus, et les modalités d'approvisionnement nutritif des embryons en cours de développement. Si l'on exclut les cas particuliers d'oophagie ou de cannibalisme embryonnaire intra-utérin (adelphophagie) connus chez certains poissons et amphibiens vivipares (exemples dans Blackburn 2014), on peut distinguer deux grands types d'approvisionnement nutritif des embryons par leur mère :

- l'approvisionnement lécithotrophique qui est la mise en réserve par la mère d'une importante quantité de vitellus dans l'ovule avant fécondation
- l'approvisionnement matrotrophique, qui est la modalité selon laquelle, en raison de l'absence (ou de l'insuffisance) de mise en réserve de vitellus dans l'ovule, un transfert de nutriment de la mère à l'embryon s'opère directement par d'autres processus durant la rétention des œufs dans les voies génitales femelles (*e.g.* sécrétions utérines absorbées par ingestion ou par histiotrophie, transferts placentaires directs plus ou moins sophistiqués) (revues dans Blackburn 1992, 2000, 2014)

Deux faits importants doivent cependant être soulignés. Premièrement, des modalités d'approvisionnement intermédiaires (partiellement lécithotrophique et partiellement matrotrophique) sont connues chez certains reptiles squamates vivipares (*e.g.* Stewart 1989, Stewart et Thompson 1993, Blackburn 2014). Deuxièmement, il n'y a pas de superposition, mais un croisement entre les modalités d'approvisionnement et les modalités de parité chez les Vertébrés (Tableau 1). Ces deux faits montrent que le terme "ovoviviparité", précédemment utilisé pour décrire les formes de viviparité avec nutrition embryonnaire lécithotrophique, et pour les opposer à des formes de viviparité "vraie" avec nutrition embryonnaire matrotrophique, introduit une catégorisation arbitraire et doit donc désormais être proscrite de la littérature moderne sur la reproduction des vertébrés (Blackburn 1993c, 1994, 2014, Heulin et Guillaume 2010). Compte tenu de ces clarifications, nous considérerons que le modèle biologique (*Zootoca vivipara*) utilisé dans cette thèse et décrit au chapitre II, correspond à une situation où coexistent une forme ovipare et une forme vivipare, toutes deux lécithotrophiques.

Tableau 1 : Répartition des patterns de reproduction au sein des Vertébrés d'après Blackburn (2014).

	Oviparité	Viviparité
Lécitotrophie	Tous les Oiseaux, Crocodiliens, Tortues, la majorité des squamates, Amphibiens et Poissons.	Certains Poissons, de nombreux squamates, quelques Anoures et Urodèles.
Matrotrophie*	Tous les Monotrèmes (ornithorynque et échidnés)	La majorité des Mammifères, Cécilies et quelques squamates et Poissons

* Ici le terme Matrotrophie désigne uniquement la nutrition de l'embryon dans les voies génitales. Par la suite il existe des soins alimentaires post-nataux apportés par les parents chez l'ensemble des oiseaux et mammifères et quelques anoures

Répartition de la viviparité dans le règne animal

La viviparité est un mode de reproduction qui est apparu à de nombreuses reprises au sein du règne animal. On connaît par exemple des espèces vivipares d'arthropodes (Hagan, 1950), de mollusques (Köhler *et al.* 2004), d'échinodermes, de tuniciers (Brewin 1956) et de vertébrés. Chez les vertébrés la viviparité est apparue indépendamment, c'est-à-dire dans des lignées phylogénétiques distinctes, à de nombreuses reprises : 9 fois chez les poissons cartilagineux (représentant aujourd'hui 55% des espèces), 13 fois chez les poissons osseux (3% des espèces), 8 fois chez les amphibiens (1% des espèces), 115 fois chez les reptiles (20% des espèces) et seulement 1, ou peut-être 2 fois chez les mammifères (> 99% des espèces) qui sont majoritairement vivipares à l'exception du groupe des monotrèmes (ornithorynque et échidnés revue de Blackburn 2014).

La viviparité chez les Reptiles

La viviparité est donc apparue plus fréquemment chez les Reptiles que chez tous les autres vertébrés regroupés. Parmi les 146 origines indépendantes de la viviparité identifiées chez les vertébrés actuels, 115 concernent le groupe des reptiles, et uniquement dans le phylum des squamates (Blackburn 2014). Ce phylum (lézards, serpents, amphibènes) se caractérise ainsi aujourd'hui par la coexistence d'espèces ovipares (80%) et d'espèces vivipares (20%), alors que tous les autres ordres de reptiles actuels sont exclusivement représentés par des espèces ovipares qu'ils soient aviens (oiseaux) ou non (chéloniens, crocodiliens, rhyncocéphales). Malgré la multitude d'origines de la viviparité chez les squamates, la situation de transition, c'est-à-dire le moment où une espèce présente encore simultanément des populations ovipares et des populations vivipares, n'a que rarement été mis en évidence. La bimodalité de reproduction n'a été, à l'heure actuelle, précisément documentée que pour trois espèces de lézards : les scincidés australiens *Lerista bougainvillii* et *Saiphos equalis* (Qualls *et al.* 1995, Qualls 1996, Smith et Shine 1997) et le lacertidé eurasiatique *Zootoca vivipara* qui fait l'objet de nos recherches.

PARTICULARITES REPRODUCTIVE DES SQUAMATES

La coexistence des deux modes de reproduction ovipare et vivipare, parfois au sein d'une même espèce, et les origines multiples de la viviparité chez les squamates, soulignent l'intérêt particulier de ce phylum pour les études comparatives de l'évolution et de la signification adaptative des modes de reproduction. Cependant ce type d'analyse nécessite de prendre en considération deux des particularités biologiques essentielles de ce groupe zoologique : la rétention intra-utérine des embryons et la thermorégulation maternelle.

La rétention intra-utérine des embryons

Dans la grande majorité des espèces ovipares de reptiles (chéloniens, crocodiliens et oiseaux) la ponte intervient après une courte période de rétention des œufs, au tout début du développement embryonnaire, c'est à dire avant ou peu après le stade embryonnaire de gastrula.

Chez les squamates (lézards, serpents, amphisbènes) il existe en revanche une variabilité importante de la période de développement intra-utérine. Le stade embryonnaire à la ponte couvre ainsi quasiment tout le spectre de développement possible, depuis la gastrula (stade 8) jusqu'à l'achèvement du développement (stade 40). L'histogramme des fréquences de ces stades chez les espèces de squamates se caractérise par une distribution clairement bimodale (Blackburn 1995). Le premier mode correspond à des espèces ovipares pondant autour du stade 30. Le second mode correspond aux espèces vivipares mettant bas à la fin du développement fœtal (Figure 1). Les états intermédiaires (stades 35-39) sont très rares et suscitent pour cette raison un certain nombre d'interrogations sur les modèles théoriques d'évolution liés à la viviparité (gradualisme ou saltationisme/équilibres ponctués ; voir le débat entre Blackburn 1995 et Qualls *et al.* 1997) et sur l'éventualité d'un caractère instable des étapes intermédiaires de la transition oviparité-viviparité chez les reptiles (Smith et Shine 1997).

Les approches adaptatives et comparatives de l'étude de la transition évolutive de l'oviparité à la viviparité qui peuvent être envisagées chez les squamates portent donc sur des formes ovipares réalisant une « gestation partielle » (premiers 30 à 50 % du développement) et sur des formes vivipares réalisant une gestation complète (tout le développement). On peut ainsi considérer, *a priori*, que les nombreuses espèces ovipares de squamates qui réalisent une gestation partielle doivent, vraisemblablement, exprimer le même type d'adaptation et subir

le même type de pressions sélectives que celles intervenant chez les espèces vivipares.

Il est enfin intéressant de noter qu'une grande majorité des squamates ovipares pondent leurs œufs entre les stades 25 et 33 (Figure 1) et que ceci correspond précisément à la période charnière entre la phase embryonnaire, principalement dévolue à des processus de différenciation et d'organogénèse, et la phase fœtale, durant laquelle intervient une accélération considérable des processus de croissance (Xavier et Gavaud 1986, Figure 2). Ceci laisse supposer qu'il pourrait exister un changement notable de l'équilibre adaptatif des coûts-bénéfices de la rétention intra-utérine des œufs entre la phase initiale (organogénèse embryonnaire) et la phase terminale (croissance fœtale) du développement. Cette éventualité, qui pourrait expliquer l'instabilité des étapes intermédiaires de la transition oviparité-viviparité sera discutée à la lumière de certains résultats obtenus au cours de la thèse.

La thermorégulation comportementale

La seconde particularité fondamentale des squamates est leur ectothermie. Bien que thermophiles pour une grande partie de leurs activités et fonctions biologiques (25 à 40°C selon les espèces), ils ne disposent pas de processus métaboliques d'élévation de leur température corporelle et leur production de chaleur endogène est négligeable (Bartholomew 1982). C'est donc essentiellement par des processus comportementaux (*e.g.* choix de substrat, choix d'exposition au rayonnement solaire, modification de leur forme corporelle) qu'ils parviennent à adapter leur température à leurs activités et à un niveau dont la valeur optimale (*i.e.* le *thermopreferendum*) peut varier entre espèces et selon la fonction biologique considérée (Huey 1982).

Cette thermorégulation comportementale est évidemment susceptible de jouer un rôle important durant la période de reproduction et notamment pendant la période de développement intra-utérin des œufs fécondés, durant laquelle les embryons peuvent bénéficier de la thermorégulation comportementale de la mère alors qu'après la ponte, ils poursuivent leur développement en milieu naturel sans contrôle thermique maternel direct (sauf chez quelques rares espèces – *e.g.* certains pythons- assurant une "couvaison" maternelle). Le facteur thermique pourrait donc clairement faire l'objet, pendant la rétention, d'effets (ou manipulations) maternels susceptibles d'affecter différemment les performances (durée et qualité de développement, qualité et probabilité de survie des phénotypes de nouveau-nés produits) des formes ovipares et vivipares de squamates.

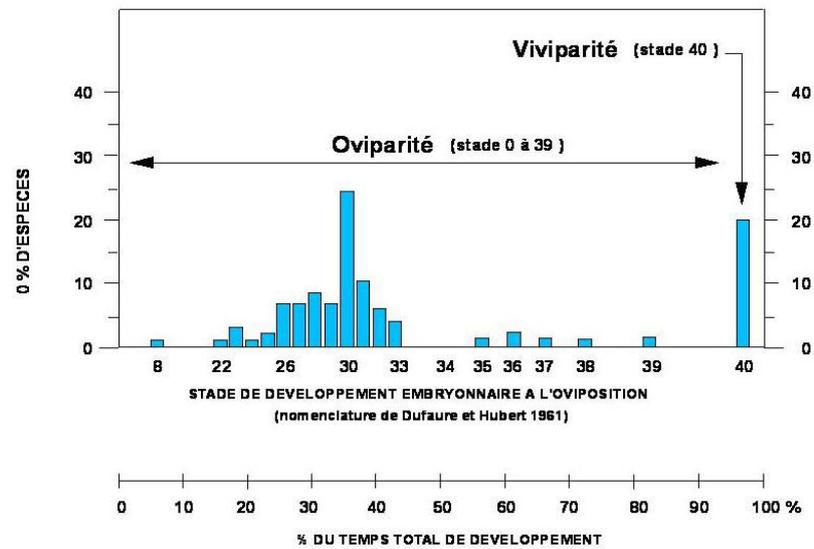


Figure 1 : Stades de développement embryonnaire à l'oviposition chez les squamates (modifié d'après Blackburn 1995)

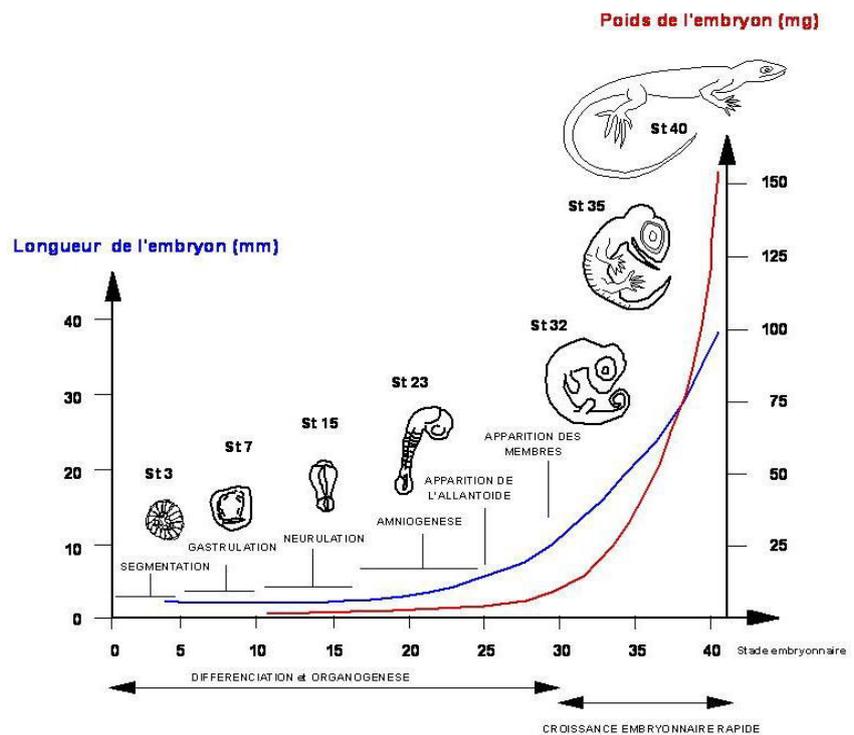


Figure 2 : Evolution de la taille et du poids lors du développement embryonnaire et fœtal de *Zootoca vivipara* (modifié d'après Xavier et Gavaud 1986). Les stades de développement embryonnaires indiqués en abscisse correspondent à la nomenclature de Dufaure et Hubert (1960).

PRESSIONS SELECTIVES DE LA VIVIPARITE

Compte-tenu de l'ectothermie des squamates, il y a lieu de s'interroger sur la possibilité d'un lien adaptatif entre la durée de rétention intra-utérine des œufs (modérée chez ovipares vs. complète chez vivipares), les contraintes environnementales climatiques (températures, durée de la saison d'activité) et les caractéristiques de répartition géographique des espèces (latitude, altitude). Il est raisonnable de considérer que la viviparité pourrait être fortement sélectionnée lorsque des circonstances environnementales particulières induisent une réduction importante du succès d'incubation des œufs et/ou de la qualité et survie des nouveau-nés des espèces ovipares, à condition cependant

- 1) que les facteurs induisant la réduction du succès et de la qualité du développement embryonnaire dans les sites de pontes, n'existent pas ou se manifestent avec une moindre intensité dans l'utérus maternel
- 2) que, chez les espèces itéropares, la gestation n'entraîne pas une réduction trop importante de la probabilité de survie et de reproduction future de la mère.

De nombreuses hypothèses, relatives à la nature des pressions sélectives et des facteurs prédisposant impliqués dans la transition évolutive de l'oviparité à la viviparité chez les squamates ont été proposées au cours du siècle dernier : l'influence sélective des climats froids, des pressions de prédation s'exerçant sur les œufs et sur les adultes, de la prévisibilité environnementale, de l'aridité ou humidité des biotopes, l'existence de prédispositions ou de contraintes spécifiques liées au mode de vie (arboricole, aquatique, terrestre ou fouisseur), au mode de thermorégulation (héliothermique/thigmothémique), à l'aptitude à la défense, au comportement de soins aux œufs (revues dans Sergeev 1940, Neil 1964, Fitch 1970, Packard *et al.* 1977, Tinkle et Gibbons 1977, Pilorge et Barbault 1981, Shine 1985, 2014). S'il est possible que chacun des facteurs sélectifs (ou pré-disposants) évoqués ci-dessus puisse ponctuellement rendre compte de telle ou telle origine de la viviparité dans telle ou telle lignée de squamates, il apparaît cependant que, statistiquement, l'hypothèse des "climats froids" est la seule qui permet d'expliquer un grand nombre d'origines distinctes de la viviparité dans ce groupe zoologique (revue dans Shine 1985).

L'hypothèse des climats froids

L'hypothèse des climats froids repose sur la constatation que, dans de nombreuses régions du globe, la proportion d'espèces vivipares dans les communautés de squamates tend nettement à s'accroître avec la latitude et l'altitude (*e.g.* Weekes 1933, Sergeev 1940, Tinkle et Gibbons 1977, revue de Shine 2014). La restriction de l'analyse aux espèces dont la viviparité est d'origine récente (c'est-à-dire supposées encore vivre à proximité de leur habitat climatique d'origine) a aussi montré qu'une très forte proportion de ces espèces étaient effectivement établies dans des climats froids (Shine et Bull 1979, Blackburn 1982, Shine 1985). De même, la restriction des analyses à des ensembles phylogénétiques correspondant à une origine précise de la viviparité, a mis en évidence la forte probabilité d'observer une espèce vivipare sous des climats plus contraignants (hautes latitudes ou haute altitude) que ceux fréquentés par les espèces ovipares les plus apparentées (Guillette *et al.* 1980, Shine 1985, Capula *et al.* 1995). Enfin, quelques analyses suggèrent que ce lien entre modes de reproduction et caractéristiques climatiques pourrait être généralisable à l'ensemble du continuum oviparité-viviparité connu chez les squamates : les espèces ovipares présentant une rétention prolongée des œufs tendent à fréquenter des régions situées à plus haute altitude et/ou hautes latitudes que les espèces ovipares présentant une rétention intra-utérine des œufs plus courte (Shine et Bull 1979, Brana *et al.* 1991, Demarco 1992). L'histoire évolutive de *Z. vivipara*, développée dans le chapitre II, semble elle-même pouvoir être interprétée dans le cadre de cette hypothèse des climats froids. Cependant, s'il existe bien un lien statistique fort entre la viviparité des squamates et les climats froids, il faut reconnaître que cette hypothèse ne permet pas de rendre compte de toutes les origines de la viviparité chez les squamates, et notamment de celles ayant eu lieu en climat plus chaud (Shine 2014). On tend donc désormais à relativiser cette interprétation adaptative des « climats froids » en la considérant simplement comme un cas particulier de « manipulation maternelle » (Shine 2012, 2014).

Les bénéfices de la viviparité

On suppose que la gestation peut, dans certaines circonstances, contribuer à accroître sensiblement le succès reproducteur des espèces vivipares par rapport à leurs homologues ovipares. Parce qu'elle permet éventuellement d'éliminer certaines causes de mortalité des œufs existant dans les sites de pontes (facteurs abiotiques extrêmes : températures létales, dessiccation, inondation; et facteurs biotiques : attaque fongique, prédation), mais surtout parce que la thermorégulation comportementale

maternelle est susceptible d'optimiser le développement embryofœtal et la probabilité de survie de la descendance. Cette hypothèse repose sur le fait que la température d'incubation peut à la fois affecter le succès d'éclosion des œufs, la durée du développement embryonnaire et la qualité phénotypique (taille, performances locomotrices, caractéristiques morphologiques, viabilité) des nouveau-nés (Beuchat 1988, Burger 1990, Deemming et Ferguson 1991, Van Damme *et al.* 1992, Shine et Harlow 1993, Qualls et Andrews 1999a, Shine 1995, 2012, 2014).

L'accroissement de la vitesse de développement embryonnaire, résultant de l'élévation de la température d'incubation *in utero* (par rapport aux sites de pontes), pourrait notamment constituer une adaptation au raccourcissement des saisons d'activité imposé par les climats froids : elle répondrait à la nécessité d'achever l'embryogenèse avant les premiers froids automnaux et, grâce à l'allongement de la période préhivernale de croissance (accumulation des réserves) et de familiarisation à l'environnement (*e.g* connaissance des abris), contribuerait ainsi à accroître les chances de survie des juvéniles durant leur première hibernation (Packard *et al.* 1977, Tinkle et Gibbons 1977, Shine et Bull 1979, Shine 1983, Wapstra *et al.* 2010, LeHenanff *et al.* 2013).

Les coûts de la viviparité

En contrepartie des avantages sélectifs qu'elle pourrait présenter, notamment sous les climats de hautes latitudes et/ou de haute altitude, la viviparité génère cependant un ensemble de contraintes. Par exemple la modification du budget-temps annuel résultant de l'allongement du temps consacré à la rétention des œufs, la modification du budget-temps journalier consacré aux activités de thermorégulation (Shine 1980, Schwarzkopf et Shine 1991, Lecomte et Massot 1993, Bleu *et al.* 2012a), l'encombrement physique des femelles pendant la gestation induisant une diminution de des capacités locomotrices et un changement de stratégie anti-prédateurs (Bauwens et Thoen 1981, Cooper *et al.* 1990, Van Damme *et al.* 1990, Schwarzkopf et Shine 1992), l'accroissement des dépenses énergétiques de maintenance (Birchard *et al.* 1984, Beuchat et Vleck 1990, Demarco et Guillette 1992) et la difficulté à s'alimenter et à accumuler de nouvelles réserves (revue in Shine 1980) .

La production d'une seule portée par an et parfois moins (reproduction biennale, triennale) qui caractérise la majorité des espèces vivipares de squamates (Fitch 1970, Tinkle *et al.* 1970, Pilorge et Barbault 1981) pourrait être l'une des conséquences de la modification du budget énergétique et du budget temps des femelles gestantes. Le plus grand intervalle de temps séparant deux reproductions successives pourrait donc constituer l'un des

coûts majeurs de la viviparité par rapport à l'oviparité qui, elle, permet généralement une fréquence de ponte plus élevée. Ainsi suppose-t-on que la viviparité a pu être sélectionnée dans des circonstances environnementales minimisant ce coût, c'est-à-dire dans des régions où la saison favorable à la reproduction est trop courte pour permettre aux espèces ovipares de réaliser plusieurs pontes successives (Tinkle et Gibbons 1977, Pilorge et Barbault 1981).

La viviparité semble donc susceptible d'induire de nombreux coûts à l'échelle de la mère (énergétiques et écologiques), de l'épisode de reproduction (phénologie, fécondité, fréquence de la reproduction), et de la descendance. En outre, le prolongement du développement intra-utérin chez les espèces vivipares expose très vraisemblablement les fœtus à des contraintes différentes de celles rencontrées dans les sites de ponte ovipares. Premièrement, la nature aqueuse (*i.e.* le liquide intra-utérin) de l'environnement du fœtus ralentit nécessairement considérablement la vitesse de diffusion de l'oxygène (10 800 fois plus lente dans l'eau à 20°C qu'en milieu atmosphérique, Bird *et al.* 1960) et peut de ce fait contribuer à imposer des conditions de développement relativement hypoxiques (Parker 2004). Deuxièmement, les limites de la plasticité anatomique maternelle (*i.e.* volume abdominal) peuvent contribuer à réduire l'absorption d'eau qui accompagne toujours la croissance fœtale (Shine et Thompson 2006, Qualls et Andrews 1999b). Ces contraintes hydriques et gazeuses de la vie intra-utérine semblent donc susceptibles d'affecter le développement fœtal et, par conséquent, le phénotype et les performances des nouveau-nés.

Contraintes morpho-fonctionnelles du développement in utero

Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler d'un coût, il est utile d'achever cette revue bibliographique en évoquant la possibilité de contraintes et corrélats morpho-anatomiques associés à la rétention intra-utérine des œufs (Vitt et Congdon 1978, Shine 1992, Qualls et Shine 1995, Brana 1996, Qualls et Andrews 1999b, Olsson *et al.* 2002, Kratochvil *et al.* 2003).

Mis à part quelques lignées particulières (deux sous-familles de *Geckonnidae*) présentant des œufs enveloppés d'une coquille rigide (et donc un volume constant de l'œuf), les œufs de la majorité des squamates sont enveloppés d'une coquille souple et extensible (coquille parcheminée chez les espèces ovipares, membrane coquillière résiduelle chez les espèces vivipares), qui autorise un accroissement important du volume de l'œuf au cours du développement embryonnaire. Cet accroissement volumique des œufs est plus particulièrement marqué en fin de

développement en raison de la croissance fœtale exponentielle et de l'absorption considérable d'eau se produisant durant la phase fœtale du développement (Xavier et Gavaud 1986, Vleck 1991, Qualls et Andrews 1999b). On peut donc considérer que pour un même investissement initial, le changement volumique des œufs en cours de développement est susceptible d'occasionner une contrainte d'encombrement beaucoup plus marquée chez les espèces vivipares (rétention jusqu'à la fin du développement) que chez les espèces ovipares (rétention intra-utérine plus courte). Cette contrainte d'encombrement, outre les coûts potentiels directs qu'elle peut occasionner (capacité de locomotion réduite, compression des organes, potentielles modifications du développement des fœtus), est également susceptible de nécessiter des rééquilibrages évolutifs affectant la morphologie et/ou différents paramètres de la reproduction tels que : la taille corporelle générale, la taille relative de la partie abdominale de la femelle et/ou sa fécondité brute, ou encore la taille des juvéniles chez les espèces vivipares. Les comparaisons d'espèces ovipares et vivipares, probablement en partie obscurcies par des différences phylogénétiques, n'ont pas permis de donner un rôle prédominant à l'un ou l'autre de ces facteurs possibles de rééquilibrage (Sun *et al.* 2012, Cabrera *et al.* 2013, Scharf et Meiri 2013). Néanmoins, l'étude comparative de Qualls et Shine (1995), portant sur une espèce à bimodalité de reproduction (limitant donc au minimum le risque de biais phylogénétique) suggère plutôt un rééquilibrage ayant principalement affecté la taille et la morphologie maternelle (proportions), sans changement de la fécondité totale ni du poids individuel des nouveau-nés, chez *Lerista bougainvillii*.

Les caractéristiques morpho-anatomiques, outre le fait qu'elles peuvent faire l'objet d'une sélection, présentent aussi une certaine plasticité qui, elle-même, pourrait intervenir dans la gestion (ou être la conséquence) de la contrainte d'encombrement de la cavité abdominale, imposée par les œufs retenus *in-utero* (avant ponte ou parturition). C'est notamment le cas d'un mécanisme plastique, mettant vraisemblablement en jeu une souplesse de certaines structures squelettiques (*e.g.* augmentation des espaces intervertébraux, écartement d'os de la ceinture pelvienne), et contribuant à un allongement flexible (suivi ultérieurement d'une rétraction) de partie thoraco-abdominale du corps durant la période de rétention intra-utérine des œufs (Bulakhova 2013, Lourdais *et al.* données non publiées).

OBJECTIFS DE LA THESE

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous présenterons et discuterons des données relatives au coût métabolique de maintenance de la rétention intra-utérine des œufs chez les femelles de chaque mode reproducteur de notre espèce modèle (Chapitre IV). Nous explorerons également les possibles influences du développement *in utero* sur le phénotype et les performances des nouveau-nés (Chapitre V) et discuterons des contraintes volumiques et hydriques de la vie *in utero* (chapitre VI).

L'étude bibliographique présentée dans cette introduction donne une idée de la complexité de la problématique globale de l'évolution de la viviparité chez les squamates et de la multiplicité de ses facettes: corrélats morpho-anatomiques, adaptations et pressions sélectives, manipulation maternelle, coûts et bénéfices énergétiques, compromis de valeur sélective entre mère et embryons. Dans cette thèse nous utiliserons un modèle comparatif particulièrement pertinent (les formes ovipares et vivipares du lézard *Zootoca vivipara*) pour tenter d'éclairer un certain nombre de points de cette problématique.

Dans le chapitre IV, nous examinerons par des mesures métaboliques le coût d'investissement préovulatoire et le coût métabolique de maintenance de la gestation susceptible de différer entre les formes ovipare et vivipare de notre espèce en raison des différences de structure des coquilles (respectivement coquille parcheminée épaisse et fine membrane coquillière résiduelle) et du temps de rétention des embryons (respectivement moitié et totalité du développement). Ces recherches nous auront permis de quantifier les différences de coûts métaboliques entre les deux modes de parité. Elles nous ont donné également la possibilité de discuter de l'hypothèse d'un changement de l'équilibre des coûts et bénéfices de la rétention entre les périodes embryonnaires et fœtales du développement, ce qui pourrait contribuer à expliquer la structuration du continuum évolutif de rétention intra-utérine des œufs chez les squamates.

Dans le chapitre V, nous réaliserons une expérimentation de manipulation contrôlée des cycles thermiques auxquels les femelles et les œufs seront exposés. Cette expérimentation est destinée à évaluer dans quelle mesure les conditions thermiques mimant la thermorégulation des femelles ou la température dans des sites de pontes seraient susceptibles d'occasionner des changements de la phénologie de la reproduction, du phénotype des nouveau-nés et de leurs performances. Il s'agira i) d'évaluer les bénéfices induits par l'augmentation de la durée de la



thermorégulation maternelle en considérant la possibilité d'une variation de ce bénéfice entre les phases embryonnaire et fœtale du développement et ii) de dégager d'éventuelles différences de coûts de la rétention plus ou moins prolongée entre les formes ovipare et vivipare.

Enfin, les résultats d'expériences complémentaires présentées au chapitre VI permettront de discuter de la notion de contrainte volumique pendant la rétention intra-utérine et des notions d'adaptation et/ou de plasticité anatomo-morphologique.

- CHAPITRE II – ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR NOTRE MODELE BIOLOGIQUE

Sommaire du chapitre

<u>II-1) Historique de la nomenclature</u>	19
<u>II-2) Une espèce à reproduction bimodale</u>	19
<u>II-3) Description des deux modes reproducteurs</u>	21
<u>II-4) Répartition spatiale et niche écologique</u>	23
<u>II-5) Histoire de l'espèce</u>	24
II- 5.1) Un scénario biogéographique général	24
II- 5.2) L'histoire plus complexe de la différenciation de multiples clades	25



HISTORIQUE DE LA NOMENCLATURE

Le lézard *Lacerta vivipara* fut décrit par le botaniste Nikolaus Joseph von Jacquin en 1787. C'est lors d'une sortie botanique estivale en famille dans les Alpes qu'il captura une femelle gestante. Il la conserva jusqu'à parturition et décrivit avec beaucoup de détails la reproduction vivipare de l'espèce (*Societas Physico-Medica Basiliensis. and Basiliensis, 1787*). Il s'agit de la seule espèce de *Lacertidae* européen qui soit vivipare et Jacquin la nomma donc naturellement *Lacerta vivipara*. L'espèce fut ensuite déplacée dans le genre *Zootoca* par Wagler en 1830, mais la majorité des auteurs continua cependant à utiliser l'ancienne dénomination de genre *Lacerta*, jusqu'à récemment. Ce n'est qu'à la lumière de nouvelles études phylogénétiques (Arnold *et al.* 2007, Pyron *et al.* 2013) que le genre monospécifique *Zootoca* fut récemment réinstauré. On notera néanmoins que, compte tenu de la (re)découverte récente de populations à reproduction ovipare au sein de l'aire de répartition (voir ci-dessous), le nom vernaculaire français « Lézard vivipare » et les noms latin d'espèce - « *vivipara* » - et grecque de genre -« *Zootoca* »- (signifiant aussi vivipare !) peuvent très fortement prêter à confusion.

UNE ESPECE A REPRODUCTION BIMODALE

Zootoca vivipara est un lézard présentant des populations ovipares et vivipares allopatriques (figure 3). Il est vivipare dans la majeure partie son aire de répartition, dans les zones tempérées et froides de l'Eurasie, jusqu'au-delà du cercle arctique, mais présente cependant des populations ovipares localisées en marge méridionale de son aire de répartition. L'existence de populations ovipares chez cette espèce, signalée de manière anecdotique dès le début du siècle sur le piémont pyrénéen à Bagnères de Bigorre (Lantz, 1927), fut par la suite définitivement confirmée pour l'ensemble de la région Aquitaine – Pays Basque – Pyrénées-Cantabrie (Brana et Bea 1987 ; Heulin 1988a ; Heulin et Guillaume 1989). Un deuxième ensemble ovipare s'étendant du nord de l'Italie et du sud de l'Autriche à la Slovénie et au nord-ouest de la Croatie, a plus récemment été identifié (Heulin *et al.* 2000, Mayer *et al.* 2000, Surget-Groba *et al.* 2002, Ghielmi *et al.* 2001).

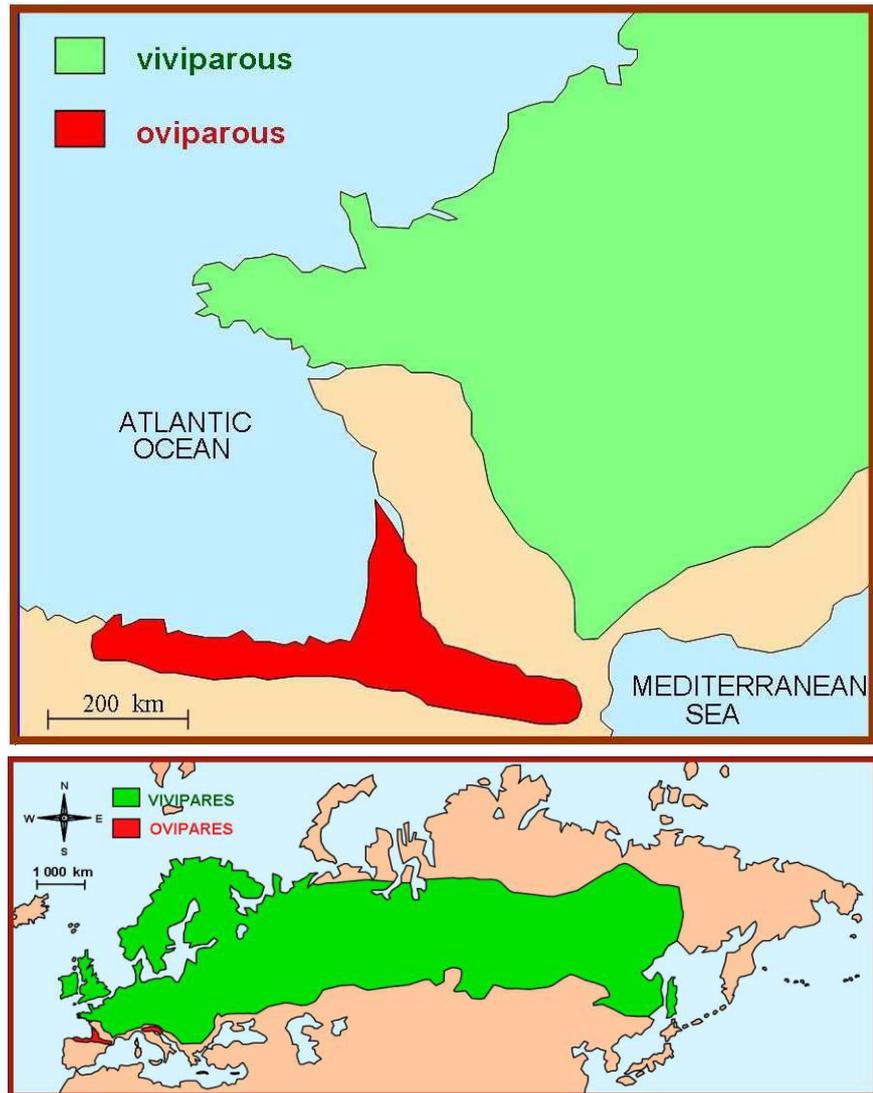


Figure 3 : Cartes de répartition des deux formes de *Zootoca vivipara* en France et dans le monde.

Le statut particulier d'espèce à reproduction bimodale donné à *Zootoca vivipara* a été conforté d'une part par la démonstration expérimentale en élevage de la persistance de possibilité d'hybridation avec production d'hybrides fertiles (Heulin *et al.* 1989, 1992, Arrayago *et al.* 1996) et d'autre part par de nombreuses études comparatives révélant la très faible différenciation (morphologique, anatomique, embryologique, physiologique, génétique, écologique) entre les formes ovipares et vivipares de cette espèce (*e.g.* Heulin et Guillaume 1989, Bea *et al.* 1990, Heulin *et al.* 1999, 2008, Stewart *et al.* 2004, Paulesu *et al.* 2005, Guillaume *et al.* 2006, Gabirot *et al.* 2008 Surget-Groba *et al.* 2001).

DESCRIPTION DES DEUX MODES DE REPRODUCTION

Dans la forme ovipare, les embryons sont protégés dans l'œuf par une coquille protéique épaisse (40 μm) et calcifiée en surface (Heulin 1990). Ils sont pondus dans le milieu naturel (à faible profondeur dans la litière : Heulin *et al.* 1994) lorsque les embryons ont atteint les stades 31-33 (nomenclature de Dufaure et Hubert 1961), c'est à dire après une rétention intra-utérine représentant environ 50% du temps total de développement (Shine 1983, Brana *et al.* 1991, Blackburn 1995). L'essentiel du développement embryonnaire (dans l'utérus, puis dans le site de ponte) s'effectue par assimilation progressive de la grande quantité de vitellus contenu dans l'ovule.

Dans la forme vivipare, l'embryon se développe aussi dans un « œuf », protégé par une fine membrane coquillière protéique (9 μm) non calcifiée qui reste interposée entre les tissus maternels et fœtaux au cours de la gestation (Panigel 1956, Heulin 1990). La totalité du développement embryonnaire (jusqu'au stade 40) s'effectue dans l'utérus. Ici aussi l'essentiel du développement embryonnaire s'effectue par assimilation du vitellus contenu dans l'ovule et les échanges fœtaux-maternels directs sont essentiellement hydriques et respiratoires. Ils s'opèrent par l'intermédiaire de l'épithélium utérin non différencié et de la membrane chorio-allantoïque du fœtus (Panigel 1956) à travers la coquille protéique résiduelle. Les approches expérimentales de Panigel (1956), réitérées par Bleu (2011) et Stewart (comm. Pers.) ont montré que le développement embryonnaire de la forme vivipare pouvait être réalisé *ex utero*, sans apport autre que certains ions minéraux.

Ainsi apparaît-il que, mis à part le cas particulier du calcium (détaillé ci-dessous), la nutrition embryonnaire est quasi exclusivement lécithotrophique (à partir du vitellus) chez les deux formes ovipare et vivipare de *Zootoca vivipara* qui, en outre, ne diffèrent pas non plus dans l'investissement unitaire initial (quantité de vitellus par ovule) (Stewart *et al.* 2009), ni dans la relation entre taille corporelle (ou poids) et la fécondité de la mère (Bleu al 2012, Roitberg *et al.* 2013) Il apparaît cependant que le calcium nécessaire au développement embryonnaire est présent en quantité insuffisante (*i.e.* 20%) dans le vitellus et que le complément (80%) est apporté soit après la ponte, par la coquille, chez la forme ovipare, soit pendant la gestation, par transfert materno-fœtal direct, chez la forme vivipare (Stewart *et al.* 2009, 2011, Stewart 2013). Du point de vue anatomo-fonctionnel les formes ovipare et vivipare ne présentent pas de différences de structure de leur interface d'échanges foeto-maternel : durant la

phase de rétention des œufs, l'utérus est en contact avec la coquille dont la surface interne est tapissée par les tissus extraembryonnaires (chorio-allantoïde, sac vitellin). La différence entre les deux formes réside dans l'épaisseur de la coquille (ovipare 40µm / vivipare 9µm) s'interposant entre les tissus maternels et fœtaux (Panigel 1956, Heulin 1990, Stewart *et al.* 2004). Les composants protéiques de la future coquille sont synthétisés et s'accumulent (en grande quantité chez ovipare/ moindre quantité chez vivipares) dans des glandes utérines durant la période vitellogénique pré-ovulatoire, et leur sécrétion (*i.e.* la formation de la coquille) intervient immédiatement après l'ovulation (Heulin *et al.* 2005)

La comparaison des données sur les populations naturelles (Heulin *et al.* 1991,1994) révèle que les phénologies reproductives des femelles ovipares et vivipares sont relativement similaires en ce qui concerne 1) la sortie d'hibernation intervenant entre début avril (plaine) et fin mai (haute altitude) ; 2) les accouplements se produisant entre mi-avril (plaine) et début juin (haute altitude), et 3) les dates de naissance des nouveau-nés comprises entre fin juin (plaine, année chaude ensoleillée) et début septembre (haute altitude – année froide ou pluvieuse).

Enfin, un point essentiel différenciant les deux formes reproductrices est que, lorsque les circonstances le permettent (principalement en plaine, conditions climatiques favorables), les femelles ovipares ont la faculté de réaliser 2 pontes successives (à environ 1 mois d'intervalle) au cours de la même année, alors que les femelles vivipares ne réalisent qu'une seule gestation annuelle (Heulin *et al.* 1991, 1997). La première ponte des femelles ovipares intervient entre fin mai (plaine, année chaude) et fin juillet (en montagne, année froide) et évidemment plus précoce que la parturition des femelles vivipares (naissances : fin juin à début septembre, selon l'altitude et les conditions climatiques) (Heulin *et al.* 1991, 1994).

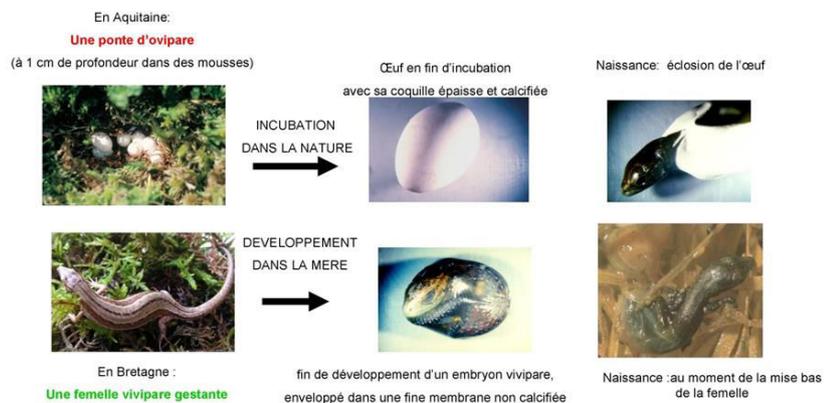


Figure 4 : Illustration des différences des caractéristiques reproductives entre les formes ovipares et vivipares de l'espèce *Zootoca vivipara*

REPARTITION SPATIALE ET NICHE ECOLOGIQUE

Le lézard *Zootoca vivipara* se rencontre depuis le littoral jusqu'à 2200 m d'altitude dans les Pyrénées pour la forme ovipare et jusqu'à 2500 mètres dans les Alpes pour la forme vivipare. La limite septentrionale de répartition atteint la latitude 70°N. L'espèce est donc clairement tolérante aux contraintes climatiques de montagne ou de hautes latitudes (imposant une saison d'activité courte) et l'on sait par ailleurs que ses formes ovipare et vivipare présentent toutes deux une résistance prononcée à la congélation (Voituron *et al.* 2004).

La limite méridionale de l'aire de répartition de *Zootoca vivipara* correspond à la limite Nord de climats relativement secs, de types méditerranéens ou steppiques. Cette limite écoclimatique est vraisemblablement en partie déterminée par les préférences hydriques de l'espèce. En effet, les deux formes (ovipare et vivipare) de cette espèce affectionnent particulièrement les tourbières et les prairies/landes humides. L'inféodation de l'espèce à ces biotopes humides est particulièrement marquée au sud de l'aire de répartition et à basse altitude (Dely 1957, Arnold *et al.* 1978, Glandt 1979, Parent 1979, Heulin 1985, Heulin et Guillaume 1989). Cette préférence pour les biotopes humides est corrélée à un certain nombre de caractéristiques écophysiologiques et biodémographiques. Ainsi sait-on que les pertes hydriques par évaporation et respiration sont plus importantes chez *Zootoca vivipara* que chez d'autres Lacertidés (Reichling 1957). On sait aussi que la fécondité annuelle et le poids de portée des femelles vivipares sont positivement corrélés à la pluviométrie durant la période vitellogénique préovulatoire (Bleu 2011). De même a-t-on constaté qu'une restriction hydrique pendant la période de gestation entraîne une modification de l'état hormonal des femelles (taux de corticoïdes) et une diminution sensible du poids et de la survie des nouveau-nés de la souche vivipare de *Zootoca vivipara* (Dauphin-Villemant et Xavier 1986, Dauphin-Villemant 1987) ainsi qu'une diminution d'activité et un ralentissement de croissance chez les subadultes de la forme vivipare (Lorenzon *et al.* 1999). Enfin la présence fréquente de pontes à l'intérieur des bombements de sphaignes exposés au soleil, suggèrent que les caractéristiques microclimatiques - à la fois humides et relativement chaudes- de ces structures végétales typiques des tourbières sont vraisemblablement très favorables à l'incubation des œufs et donc au succès reproducteur de la forme ovipare de *Zootoca vivipara* (Heulin *et al.* 1994).

HISTOIRE DE L'ESPECE

Un scénario biogéographique général

La répartition géographique très particulière des populations ovipares (en marge méridionale de l'aire de répartition des vivipares) et les données biologiques (faibles divergences génétiques, morphologiques, etc) ont conduit à proposer un scénario biogéographique, admettant une évolution récente de la viviparité chez *Zootoca vivipara* (Heulin *et al.*1993) (Figure 5).

Au cours du Pléistocène, les avancées successives des glaciers vers le Sud ont pu entraîner une fragmentation de l'aire initiale de répartition de l'espèce (présumée ovipare à ce moment). D'une part, des populations ovipares se seraient retranchées dans deux refuges méridionaux distincts (refuge ibérique et refuge italien) tandis que, d'autre part, dans un refuge vraisemblablement plus oriental (entre les Balkans et l'Oural), se serait individualisé un autre ensemble de populations dans lequel la viviparité serait apparue puis se serait propagée. Une meilleure adaptation aux climats froids a pu favoriser la sélection et l'expansion rapide des populations vivipares durant et après les périodes glaciaires, tandis qu'une moins bonne adaptation à ces climats a pu accentuer le confinement des populations ovipares au sud de l'aire de répartition. Il se peut par ailleurs que le processus de réchauffement postglaciaire ait localement contribué à la mise en place de barrières écologiques d'isolement (*e.g.* absence des tourbières favorables à l'espèce entre le Massif central et les Pyrénées) et ait donc localement empêché la remise en contact des populations ovipares et vivipares (Heulin *et al.* 1993).

Ce scénario biogéographique, ainsi que certaines données démographiques (Heulin *et al.* 1997), s'accordent bien à la « théorie des climats froids », stipulant que, chez les squamates, la viviparité est un mode de reproduction susceptible d'être fortement sélectionné sous les climats froids imposants des saisons d'activité courtes, tandis que l'oviparité est susceptible de présenter certains avantages adaptatifs dans les circonstances climatiques opposés (références et revue dans l'introduction de la thèse).

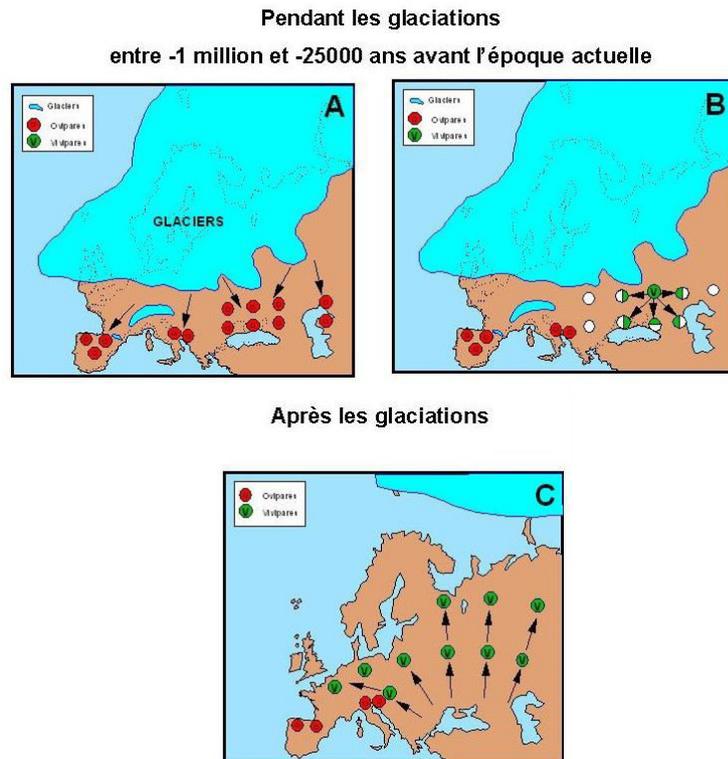


Figure 5 : Scénario biogéographique proposé par Heulin et al. (1993)

L'histoire plus complexe de la différenciation de multiples clades

Les analyses (séquençage d'ADN mitochondrial), entreprises pour reconstituer l'histoire phylogéographique de la mise en place de la diversité génétique et reproductive de *Zootoca vivipara*, ont permis dans une très large mesure de conforter le scénario biogéographique général (ci-dessus) impliquant une évolution allopatrique intervenue au cours de phases de contraction (et fragmentation) puis de réexpansion d'aires géographiques au cours du Pléistocène (Surget-Groba 2002, Surget-Groba et al. 2001, 2006). Néanmoins ces études phylogéographiques ont aussi révélé l'existence de multiples clades (2 clades ovipares A et B et 4 clades vivipares C, D, E, F ; Figure 6) reflétant une histoire plus complexe (Surget-Groba 2002, Surget-Groba et al. 2006). Notamment le positionnement phylogénétique des petits clades vivipares C et F (tous deux à répartition géographique très restreinte en Europe Centrale) a conduit à envisager plusieurs alternatives (Figure 7).

- 1) la viviparité aurait évolué en trois occasions distinctes.
- 2) la viviparité serait apparue une seule fois, mais aurait ultérieurement subi une réversion évolutive (de la viviparité vers l'oviparité) à l'origine du clade ovipare occidental (clade B).

- 3) la viviparité serait apparue une seule fois (Clade D+E) puis, à la faveur de contacts intervenus au cours des déplacements d'aires de répartition, aurait secondairement été transférée (hybridations-introgessions anciennes) à certains clades mitochondriaux (C et F) initialement ovipares.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de privilégier l'une ou l'autre de ces possibilités. Seule l'utilisation de marqueurs nucléaires informatifs (idéalement les gènes codant pour le mode reproducteur) pourrait permettre de départager ces hypothèses.

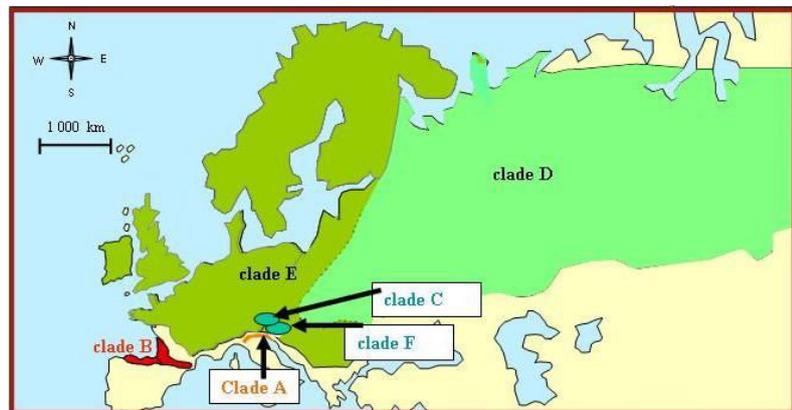


Figure 6 : Répartition géographique des groupes phylogénétiques définis par Surget-Groba (2002) et Surget-Groba et al. (2006) à partir de gènes d'ADN mitochondrial. Les clades A et B (nuances de rouge) sont les clades ovipares de l'espèce tandis que les clades C,D,E et F (nuances de vert) sont les clades vivipares.

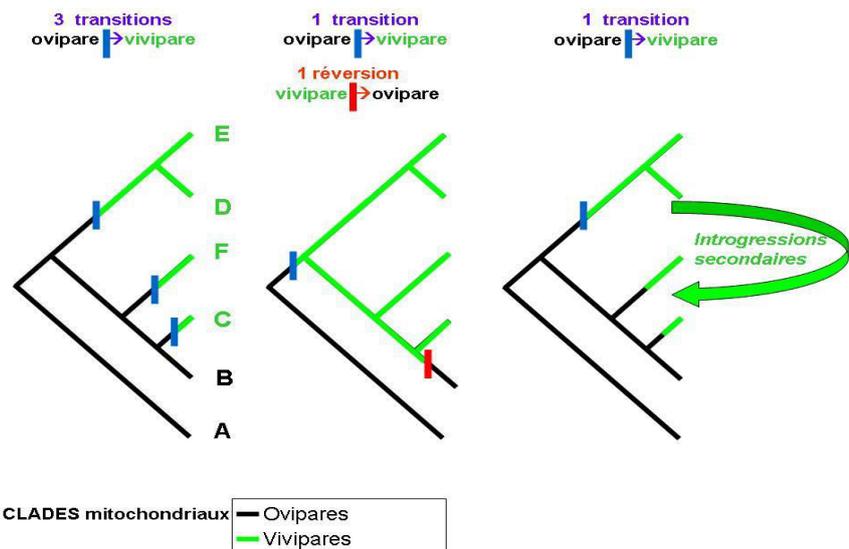


Figure 7 : Arbres phylogénétiques (clades mitochondriaux A,B,C,D) et scénarios possibles des transitions évolutives reproductives chez *Zootoca vivipara*

- CHAPITRE III - MATERIEL ET METHODES

Sommaire du chapitre

<u>III-1) Maintien des animaux et reproduction en captivité</u>	29
III-1.1) Les adultes.....	29
III-1.2) L'incubation des œufs	30
III-1.3) Cycle de reproduction et suivi échographique	32
 <u>III-2) Mesures biométriques par imagerie numérique</u>	 33
 <u>III-3) Etude du métabolisme par la consommation d'O₂</u>	 34
III-3.1) Protocole de mesure pour les adultes	34
III-3.2) Suivi du métabolisme des femelles pendant la reproduction	35
III-3.3) Ajustement du protocole aux œufs et nouveau-nés	36
III-3.4) Suivi du métabolisme des œufs depuis la ponte jusqu'à l'éclosion	36
 <u>III-4) Manipulation des cycles thermiques</u>	 38
III-4.1) Définition des traitements thermiques expérimentaux	38
III-4.2) Design expérimental	41
III-4.3) Phénologie et succès reproducteur	42
III-4.4) Phénotype à la naissance	43
III-4.5) Performances d'endurance.....	43
III-4.6) Performances exploratoires	44
III-4.7) Maintien et suivi en enclos semi-naturels.....	44
 <u>III-5) Contraintes au développement foetal <i>in utero</i></u>	 45
III-5.1) Compromis fécondité/développement	45
III-5.2) La flexibilité thoraco-abdominale	45



MAINTIEN DES ANIMAUX ET REPRODUCTION EN CAPTIVITE

Les adultes

Les animaux destinés à nos expérimentations ont été capturés fin août 2012, 2013 et 2014, en Bretagne (population vivipare de Paimpont, Lat 48° 01' N, Long 2° 10' W, système géodésique WGS 84, Altitude 155 m) et en vallée d'Ossau dans les Pyrénées (population ovipare de Louvie, Lat 43° 06' N, Long 0° 23' W, système géodésique WGS 84, Altitude 370 m). Ces animaux ont été maintenus en élevage au laboratoire dans des terrariums individuels (dimensions 30 x 20 x 20cm, Figure 8), chacun contenant un abreuvoir, une coupelle de nourriture (vers de farine *Tenebrio molitor ad libitum*, saupoudrés de suppléments vitaminiques pour reptiles) et un abri en plastique contenant du raphia. Une serviette éponge, réhumidifiée régulièrement, est disposée sous l'abri. Chaque terrarium est surmonté (au-dessus de l'abri) d'une lampe chauffante 40W, allumée 6 heures par jour, et permettant ainsi aux lézards de thermoréguler. Les animaux sont soumis à la photopériode naturelle, la salle d'élevage comportant une large fenêtre.

Les individus ont été mis en hibernation selon un protocole standard (Gavaud 1983, Heulin *et al.* 2005) d'octobre à mi-janvier pour les mâles, ou d'octobre à début février pour les femelles. Les boîtes d'hibernation sont des containers plastiques (1 litre) à couvercle perforé (aération), contenant une couche de 3 cm de sable maintenue à saturation d'eau (réhumidification chaque semaine) surmontée de sphaignes humides. Les boîtes d'hibernation sont installées, à l'obscurité, dans des armoires thermorégulées. La température, abaissée progressivement de 15 à 5°C pendant la première semaine, est ensuite maintenue constante à 5°C pendant le reste de l'hibernation. La sortie d'hibernation plus précoce (*i.e.* 1 mois plus tôt) pour mâles que pour les femelles est conforme à la phénologie naturelle de l'espèce (Van Nuland et Strijbosch 1981) et le régime thermique (5°C pendant plus de 4 mois) permet la réalisation d'une reproduction normale des femelles en élevage (Gavaud 1983).

L'incubation des œufs

Au moment de la période de ponte (environ 2 mois après la sortie d'hibernation), les femelles de la forme ovipare pondent leurs œufs sur l'éponge humide sous l'abri. Deux contrôles journaliers (respectivement avant et après extinction des lampes) permettent de transférer les pontes rapidement dans des boîtes d'incubation. Les boîtes d'incubation (diamètre x hauteur : 40 x 25mm, Figure 8), ont un couvercle perforé et sont remplies à moitié d'une couche de 12mm de sable maintenu à saturation d'eau (réhumidification quotidienne) laquelle est surmontée d'un papier filtre lui aussi maintenu à saturation d'eau (Heulin 1988a, Heulin *et al.* 2000, 2002). Les régimes thermiques d'incubation utilisés pendant la thèse (30°C constant en 2013, et cycles thermiques naturels pour l'expérimentation 2014 : voir plus bas) sont dans la gamme des températures compatibles avec un développement embryonnaire normal chez l'espèce (*e.g.* Rodriguez-Diaz *et al.* 2010).



Figure 8 : Conditions de maintien en captivité: en haut à gauche une rampe de terrariums ; en haut à droite les pontes dans leurs boîtes d'incubation ; en bas la découverte d'une ponte récente sous l'abri du terrarium.

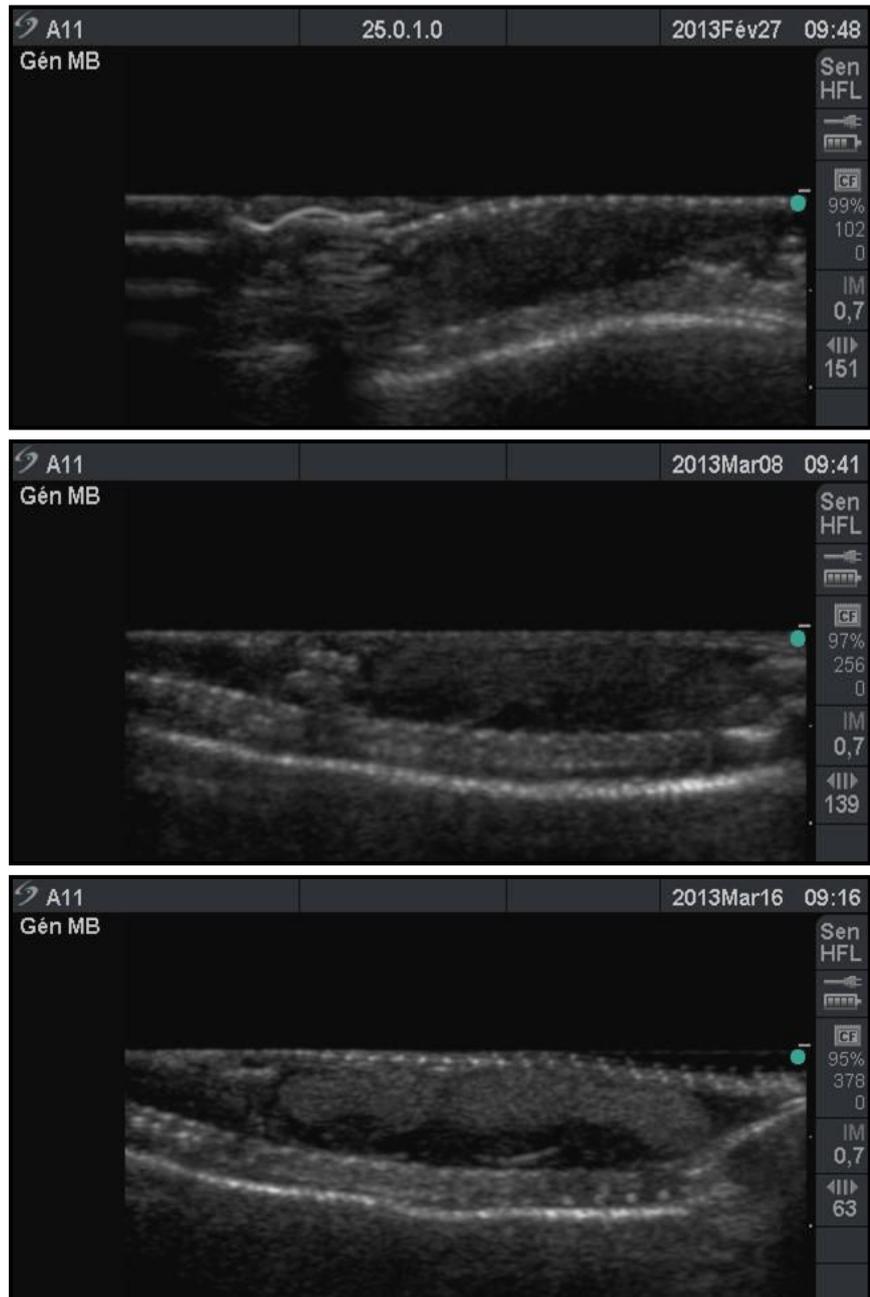


Figure 9 : Images échographiques d'une femelle vivipare reproductrice. Imagerie ventrale en coupe longitudinale de la partie thoraco-abdominale, vue ventrale. La gauche correspond à l'avant et le bas de l'image correspond au dos de l'animal (colonne vertébrale et tégument très échogène).

En haut, femelle n'ayant pas ovulée présentant de petits follicules sphériques peu échogènes (gris) visibles dans les ovaires.

Au milieu, femelle ayant ovulé présentant de gros œufs faiblement échogène visibles (gris et noir).

En bas, femelle avant parturition présentant de gros œufs avec un vitellus très échogène (gris clair), une partie embryonnaire non échogène (noir) et une coquille (arc de cercle blanc).

Le protocole standard d'hibernation décrit ci-dessus permet l'achèvement de la maturation spermatogénétique des mâles avant la sortie d'hibernation des femelles (Courty et Dufaure, 1979a, 1979b, 1980, Joly et Saint-Girons 1981, Van Nuland et Strijbosch 1981), et l'entrée en vitellogenèse (puis accouplement et ovulation) des femelles dans le mois qui suit leur sortie d'hibernation (Gavaud 1983, Heulin *et al.* 2005). Ce protocole d'hibernation en élevage, qui induit un net avancement phénologique de la reproduction (environ 30 à 40 jours par rapport aux populations naturelles de plaine les plus précoces) présente l'avantage (pour les approches expérimentales comparatives) de permettre la synchronisation de la reproduction d'individus provenant d'origines géographiques, et de modes reproducteurs différents (Heulin *et al.* 2005).

Dans ces conditions il est possible d'obtenir des accouplements en élevage à partir de la troisième semaine suivant la fin d'hibernation des femelles. Durant cette période (coïncidant avec la vitellogenèse) nous avons régulièrement exposé les femelles à différents mâles, jusqu'à l'observation de copulations effectives (femelle « consentante » et copulation durant de 15 à plus de 60 minutes).

Pour suivre la phénologie de la reproduction et notamment déterminer la date d'ovulation, nous avons réalisé régulièrement des échographies haute résolution (Micromaxx, Sonosite, Inc. USA, Figure 9). L'échographie permet, de manière non invasive, de détecter la présence de follicules vitellogéniques dans les ovaires et, après ovulation, d'œufs dans l'utérus (Gilman et Wolf 2007). Chez *Zootoca vivipara*, les follicules ovariens apparaissent sphériques, groupés et faiblement échogènes tandis que les œufs dans le tractus génital apparaissent allongés et alignés, avec un vitellus moyennement échogène (apparaissant en gris) et un disque embryonnaire non échogène (apparaissant en noir) autour desquels on peut souvent discerner la coquille en formation très échogène (apparaissant en blanc).

MESURES BIOMETRIQUES PAR IMAGERIE NUMERIQUE

Nous avons utilisé l'imagerie numérique à une résolution de 600 Dpi (scan de la face ventrale des lézards, CanoScan 8800F, Canon et Epson Perfection 1260, Epson) et le logiciel libre Ink pour caractériser la biométrie de tous nos lézards adultes (2013, 2014, 2015) ainsi que celle des nouveau-nés obtenus dans l'expérimentation réalisée en 2014. Cette technique d'imagerie permet une grande précision des mesures (jusqu'à 0.01 mm) et une réduction de la durée et des contraintes de contention de l'animal. On évite ainsi de possibles biais de contention (*e.g.* étirement plus ou moins prononcé) pouvant se traduire par une variation des mesures de taille (jusqu'à 5 à 6 %), dépendante de l'opérateur et pouvant même, dans une moindre mesure, varier au cours du temps pour un même opérateur (Roitberg *et al.* 2011). Dans chaque expérimentation nous avons réalisé une mesure de la longueur des parties :

- céphalo-cervicales (depuis le museau jusqu'au collier)
- thoracico-abdominale (du collier à la plaque anale)
- caudale (de la plaque anale au bout de la queue)

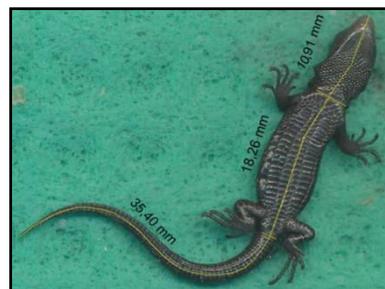


Figure 10 : Illustration des mesures biométriques réalisées. En haut femelle *Z. vivipara* forme vivipare en fin de gestation et en bas un nouveau-né ovipare.

ÉTUDE DU METABOLISME PAR LA CONSOMMATION D'O₂

Protocole de mesure pour les adultes

Le taux de consommation d'oxygène a été mesuré en système respirométrique fermé. Toutes les mesures ont été réalisées sur des animaux préalablement mis à jeûner pendant 48 heures. Pour obtenir une valeur à l'état de repos, la mesure est effectuée de nuit entre 19h et 08h, l'obscurité entraînant un ralentissement de l'activité de *Zootoca vivipara* (Cragg 1978). Toutes les mesures ont été effectuées à une température de 30±0.5 °C qui correspond à la température corporelle préférée des femelles reproductives (e.g. Le Galliard *et al.* 2003 ; Rodriguez-Diaz *et al.* 2010). Une période d'acclimatation d'une heure dans le bocal de test (volume : 1 litre) précède le prélèvement initial d'air. Ce prélèvement (2x140ml) permet d'établir la composition initiale de l'air (qui servira de témoin) et est réalisé avant la fermeture hermétique du bocal. Un deuxième prélèvement de même volume permet d'établir la composition finale de l'air après expérimentation. La mesure du pourcentage d'oxygène dans les deux échantillons est effectuée à l'aide d'un système respirométrique portable (Fox Box, Sable Systems, Las Vegas, USA), connecté à une pompe insufflant l'air à flux constant (60ml/mn) au travers d'une colonne asséchante de drierite.



Figure 11 : Illustration du protocole de mesure du $\dot{V}O_2$ en circuit fermé.

La consommation d'oxygène de l'animal $\dot{V}O_2$ ($\text{ml}\cdot\text{mn}^{-1}$) est calculée selon la formule suivante avec V le volume du bocal expérimental en millilitres et t le temps d'expérimentation en minutes :

$$\dot{V}O_2 = \frac{(\%O_2\text{final} - \%O_2\text{initial}) \times V}{t}$$

L'intervalle de temps de 14 ± 1.13 heures séparant nos mesures initiales et finales a été choisie après que des tests préliminaires aient montré que l'on obtenait pour un lézard adulte, un taux de suppression de l'oxygène compatible avec la sensibilité de détection de l'appareil de mesure.

Suivi du métabolisme des femelles pendant la reproduction

Ce suivi individuel a consisté en des mesures de $\dot{V}O_2$ depuis la sortie d'hibernation (PR=état pré-reproducteur) jusqu'à l'achèvement du cycle reproducteur des femelles (PP=post-parition). Entre ces deux extrémités du cycle, nous avons pu pour toutes les femelles (ovipares et vivipares) faire des mesures pré-ovulatoire en fin de vitellogenèse (VIT), récemment après ovulation (OV) et en début de rétention intra-utérine des œufs (ER1). Le stade ER1 prend place juste avant la ponte des femelles ovipares. La poursuite de la gestation chez les femelles vivipares a nécessité de considérer deux stades successifs supplémentaires (rétention ER2 et ER3).

Nous avons calculé un indice global d'accroissement de la consommation d'oxygène en faisant une intégration au cours du temps de la surface entre les courbes d'évolution du $\dot{V}O_2$ et du $\dot{V}O_2$ basal (droite reliant les $\dot{V}O_2$ PR et PP). Cet indice TIOC (Total Increase in Oxygen Consumption, en $\text{ml d}'O_2$) peut être calculé sur toute la période de reproduction ou en distinguant certaines sous-périodes. Nous avons ainsi distingué le TIOC pré-ovulatoire et le TIOC post-ovulatoire, parce qu'ils résultent de processus bioénergétiques différents. Le TIOC pré-ovulatoire est essentiellement associé à la synthèse maternelle des composants reproducteurs (vitellus incorporé aux ovules, composants des futures coquilles synthétisées dans les glandes utérines) sans aucune composante embryonnaire, tandis qu'au contraire le TIOC post-ovulatoire comporte une forte composante embryonnaire autonome (respiration de l'embryon assimilant son vitellus) additionnée du coût de maintien de la gestation.

S'il est vrai que, par définition, chez une espèce lécithotrophe il n'y a pas de synthèse maternelle pour l'embryon durant la phase de rétention intra-utérine, il n'en reste pas moins que durant cette phase il peut exister un surcoût significatif de maintenance de la

gestation par la femelle (plus de détails sur la nature de ce surcoût au chapitre IV). Ce coût métabolique de maintenance de la gestation (MCP : Metabolic Cost of Pregnancy) se traduit par un accroissement de la consommation d'oxygène par l'organisme maternel, venant s'ajouter à l'accroissement distinct dû à la respiration des embryons en cours de développement. Nous avons utilisé dans ce travail une méthode statistique permettant de quantifier ce MCP. Cette méthode consiste à calculer la brusque décroissance de consommation d'oxygène intervenant au moment de la parition d'une femelle ($\Delta\dot{V}O_2$), et à la corrélérer à la quantité (nombre ou poids) d'embryons (ovipares) ou de nouveau-nés (vivipares) produits. Le MCP est alors estimé comme étant l'ordonnée à l'origine de la droite de régression, c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommé pendant la gestation non attribuable aux embryons ou fœtus (*e.g.* Beuchat et Vleck 1990, Schultz *et al.* 2008, Van Dyke et Beaupre 2011, Yue *et al.* 2012, Dupoué et Lourdaï 2014).

Ajustement du protocole aux œufs et nouveau-nés

L'application du protocole de mesure de VO_2 décrit ci-dessus à des œufs en cours d'incubation (ovipare) et à des nouveau-nés (ovipares et vivipares) a nécessité de procéder à des ajustements permettant de conserver un taux de suppression de l'oxygène détectable par l'analyseur. Ces ajustements ont consisté à faire des mesures groupées (plusieurs œufs ou juvéniles dans le même bocal) et à moduler l'intervalle de temps (initial/ final) en fonction de la quantité de « matière respirante » disponible (selon le stade embryonnaire des œufs en incubation, et selon le nombre de juvéniles disponibles) (Tableau 2). Concernant les juvéniles, les mesures ont toujours été effectuées le lendemain de la naissance. Concernant les œufs, la boîte d'incubation à couvercle perforé contenant toute la ponte est installée dans le bocal test pendant toute la durée de la mesure de VO_2 . Le protocole du suivi de VO_2 des pontes pendant l'incubation est détaillé ci-dessous.

Suivi du métabolisme des œufs depuis la ponte jusqu'à l'éclosion

Les pontes de femelles ovipares obtenues en élevage (n=21) ont fait l'objet d'un suivi métabolique du VO_2 au cours de leur incubation à 30°C : le jour même de la ponte, le 7^{ième} jour supposé correspondre à la mi-incubation, et le 13^{ième} jour supposé correspondre à la fin d'incubation. Ces pronostics des dates de mi et fin d'incubation étaient basés sur des durées d'incubation à 30°C précédemment publiées (Rodriguez Dial *et al.* 2010). Une mesure du VO_2 des nouveau-nés a aussi été réalisée, le lendemain de leur l'éclosion.

Après chaque mesure de $\dot{V}O_2$ de pontes, nous avons caractérisé l'état embryonnaire (poids et stade de développement) en disséquant un œuf de chaque ponte, et en admettant que le développement embryonnaire soit relativement homogène au sein d'une même ponte (Andrews 2004). Un séchage (étuve, 60°C pendant 72 heures) des différents composants de l'œuf (coquille/embryon/vitellus) a permis de déterminer leurs poids secs respectifs. Compte tenu de ces dissections (entraînant la disparition d'un œuf de la ponte après chaque mesure de $\dot{V}O_2$) il n'a pas été possible de faire les 4 mesures de $\dot{V}O_2$ pour les plus petites pontes, c'est-à-dire pour les pontes de 3 œufs (pas de mesure de $\dot{V}O_2$ sur nouveau-nés) et pour les pontes de 2 œufs (pas de mesure de $\dot{V}O_2$ au 7^{ième} jour d'incubation, ni sur nouveau-nés)

Tableau 2 : Durée de la mesure de consommation d'oxygène pour les pontes (forme ovipare, ponte entière) en fonction du stade d'incubation, et pour les nouveau-nés (ovipare et vivipare) en fonction de leurs nombres juvéniles.

Nature de l'échantillon	Durée (fin-début) de la mesure de consommation d'oxygène
Œufs en début d'incubation	24 heures
Œufs en milieu d'incubation	10 heures
Œufs en fin d'incubation	7 heures
1 nouveau-né	15 heures
2 nouveau-nés	8 heures
3 nouveau-nés	5 heures
4 à 6 nouveau-nés	4 heures

MANIPULATION DES CYCLES THERMIQUES

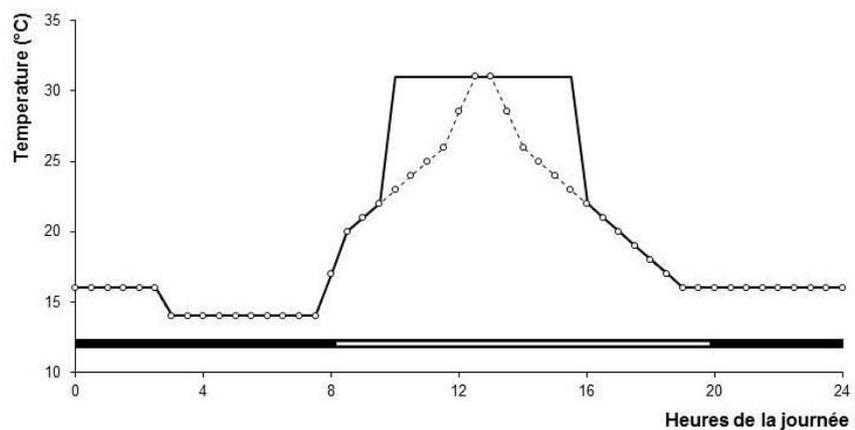
Définition des traitements thermiques expérimentaux

Notre expérimentation de 2014 a consisté à manipuler les cycles thermiques au cours du développement embryonnaire, en installant les terrariums individuels des femelles (et leurs pontes pour les ovipares) dans des enceintes thermorégulées. Les conditions d'élevage sont identiques à celles utilisées en routine (voir plus haut), sauf qu'il n'y a pas de lampe chauffante, et donc pas de possibilité de thermorégulation comportementale par exposition à un rayonnement. La température des femelles est donc égale à la température de réglage de l'air de l'enceinte. Un tube fluorescent fixé sur l'extérieur de la porte vitrée de chaque enceinte a permis l'éclairage (sans chauffage) des terrariums avec une photopériode de 12 heures nuit/12 heures jour. La température de l'air ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) dans les enceintes a été programmée heure par heure pour constituer l'un ou l'autre des traitements thermiques (régime « M » pour Mère et régime « N » pour Nid) décrits ci-dessous.

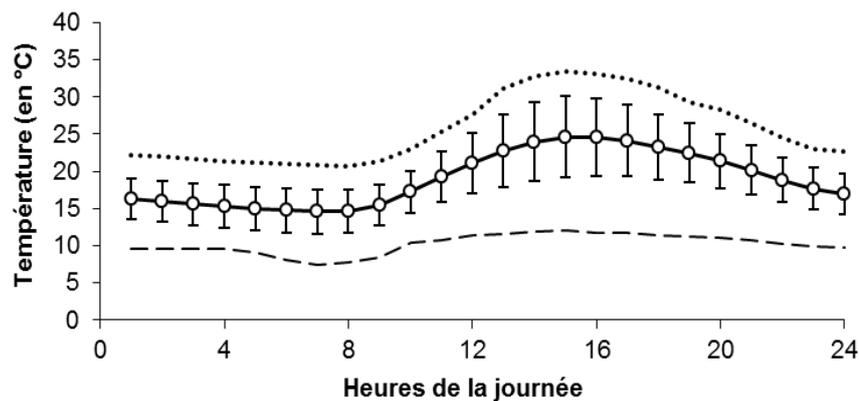
Les cycles journaliers du régime « M » (moyenne \pm SD : $20.1 \pm 6.6^\circ\text{C}$) et du régime « N » ($18.9 \pm 4.9^\circ\text{C}$) qui comportent une très large portion commune (incluant les 12 heures de la phase nocturne, ainsi que les 2 premières heures et les 4 dernières heures de la phase d'éclairage) diffèrent essentiellement par la durée d'accès à la zone de *thermopréfendum* des femelles (31°C) qui est atteinte dans la partie médiane du cycle pendant 6 heures pour le régime « M » et pendant seulement 1 heure pour le régime « N » (Figure 12). Ces deux cycles ne présentent pas de différence significative de leur température moyenne (t.test, $t=0.98222$, $df=90.277$, $P=0.33$). Nous avons réglé la zone de *thermopréfendum* à 31°C , d'une part parce que ceci s'approche de ce qui est rapporté dans la littérature pour la phase de rétention intra-utérine des femelles ovipares et des femelles vivipares (Le Galliard *et al.* 2003, Rodriguez-Diaz *et al.* 2010) et d'autre part, parce que cette température permet aussi un développement rapide et de qualité des embryons ovipares durant leur phase d'incubation externe (Rodriguez-Diaz *et al.* 2010).

D'un point de vue biologique, le régime « M » a été conçu pour mimer un cycle de température corporelle de femelles en phase de rétention intra-utérine des œufs (femelle ovipare avant ponte, femelle vivipare en gestation) durant une journée bien ensoleillée permettant une thermorégulation comportementale optimale et prolongée. Le traitement thermique « N » tend, quant à lui, à s'approcher d'une situation réaliste d'incubation des œufs dans un

site naturel de ponte. Pour établir ce traitement thermique « N » nous nous sommes inspirés d'un enregistrement précédemment réalisé pendant 86 jours (thermistance à 1 mesure/ heure du 20 juin au 4 septembre 1992) dans la population ovipare de Louvie, à 2cm de profondeur dans un bombement de sphaignes exposé au sud (Figure 13). Cette période estivale d'enregistrement correspond à celle où l'on peut effectivement observer des pontes en cours d'incubation (1^{ère} ou 2^{ème} ponte annuelle), et le positionnement du capteur correspond à une localisation typique des sites de pontes dans cette population (Heulin *et al.* 1994). L'ajustement de notre traitement thermique expérimental au régime naturel a cependant été contraint par l'absence de variation thermique intrahoraire dans notre expérimentation (une classe horaire à toujours strictement la même température) alors que cette variation existe dans la nature (la température d'une classe horaire change d'un jour à l'autre). Pour cette raison le cycle journalier de notre traitement thermique expérimental « N » ne suit pas parfaitement le cycle journalier moyen en milieu naturel, mais reste cependant dans l'enveloppe (mini-maxi) de ce cycle (Figure 12 et 13). Nos ajustements ont néanmoins permis que la moyenne journalière de notre traitement thermique expérimental « N » ($18.9 \pm 4.9^\circ\text{C}$) soit identique à la moyenne des 24 moyennes horaires ($18.9 \pm 3.6^\circ\text{C}$) mesurées en milieu naturel et, aussi, que les fréquences journalières moyennes des différentes classes de 5°C de températures (Tableau 3) soient très similaires dans les deux régimes (expérimental vs. mesures en site de ponte naturel).



Figures 12 : Diagramme des traitements thermiques expérimentaux utilisés. En trait continu le traitement « M » et en pointillé et cercles ouverts le traitement « N ». Les rectangles noir et blanc définissent la photopériode procurée par un éclairage artificiel.



Figures 13 : Traitement thermique naturel d'incubation observé dans la population ovipare de Louvie. Enregistrement du 10 Juin au 4 septembre 1992 dans une localisation typique de site de ponte (2cm sous sphaignes). Courbes de moyennes horaires (\pm écart type) et courbes des minima (tirets) et maxima (pointillés)

TABLEAU 3: Fréquences des différentes classes de températures dans l'enregistrement effectué en milieu naturel et dans le traitement thermique expérimental « N ». *Fréquence dans le milieu naturel calculée par rapport au total des enregistrements ($n=2064$ heures) sur toute la période de 86 jours.

Classe T° (°C)	LOUVIE 1992 (10 juin- 4sept)		REGIME EXP « N »	
	Fréquence*	Durée (en h-mn/jour)	Fréquence	Durée (en h-mn/jour)
n<15	0.22	5 h 12	0.21	5 h 00
15 à <20	0.42	10 h 00	0.42	10 h 00
20 à <25	0.24	5 h 42	0.25	6 h 00
25 à <30	0.09	2 h 12	0.08	2 h 00
30 à 35	0.04	0 h 54	0.04	1 h 00

Les femelles utilisées dans cette expérimentation ($n=28$ ovipares et $n=24$ vivipares) ont d'abord été maintenues en terrariums dans les conditions standards habituelles (*i.e.* avec possibilité de thermorégulation comportementale sous les lampes), depuis leur sortie d'hibernation le 4 février, jusqu'au 3 mars. Elles ont été accouplées avec des mâles à la fin de cette période initiale. Les femelles ont ensuite été transférées dans des enceintes thermorégulées programmées soit à un régime « M » soit à un régime « N ». Les échographies réalisées au début de cette période d'élevage ont montré qu'une majorité des femelles (23 ovipares et 20 vivipares) présentaient des œufs très récemment ovulés dès le 4 au 7 mars, alors que les autres (5 ovipares et 4 vivipares) n'ont ovulé qu'entre 8 et 30 jours plus tard.

Design expérimental

Notre expérimentation de manipulation des cycles thermiques a eût pour objectifs : i) d'évaluer les bénéfices induits par l'augmentation de la durée de la thermorégulation maternelle, en considérant la possibilité d'une variation de ce bénéfice entre les phases embryonnaires et fœtales du développement ; ii) de dégager d'éventuelles différences entre les formes ovipares et vivipares (d'éventuels effets d'une prolongation du développement fœtal en milieu utérin chez la forme vivipare).

Pour répondre à notre premier objectif, nous avons réalisé un design expérimental permettant de s'intéresser aux effets et aux bénéfices procurés par l'allongement de la thermorégulation maternelle. La forme ovipare, dont la ponte intervient au moment de transition entre les phases embryonnaire et fœtale, permet d'établir plusieurs intensités d'exposition croissante des embryons à un régime mimant la thermorégulation maternelle ; mais également de tester la possibilité d'une variation des bénéfices procurés par la thermorégulation maternelle entre les phases embryonnaire et fœtale du développement.

Après un développement embryonnaire (intra-utérin) effectué dans l'un ou l'autre des traitements thermiques (M ou N), chaque ponte a été subdivisée en 2 groupes d'œufs : la moitié de la ponte a poursuivi son développement fœtal (incubation externe) sans changement de traitement thermique, tandis que l'autre moitié a été incubée dans le traitement thermique opposé. Nous avons ainsi pu constituer 4 lots expérimentaux ovipares :

- le lot ovipare NN dans lequel les phases embryonnaire et fœtale se sont toutes deux déroulées dans le traitement thermique « N ».
- le lot ovipare NM dans lequel la phase embryonnaire était effectuée dans le traitement thermique « N » et la phase fœtale dans le régime « M ».
- le lot ovipare MN dans lequel la phase embryonnaire était effectuée dans le traitement thermique « M » et la phase fœtale dans le régime « N ».
- le lot ovipare MM dans lequel les phases embryonnaire et fœtale se sont toutes deux déroulées dans le traitement thermique « M ».

Pour répondre à notre second objectif, nous avons réalisé un design expérimental permettant de s'intéresser aux éventuels effets du mode reproducteur sur le développement et aux bénéfices procurés par la thermorégulation maternelle (un régime unique sur l'ensemble du développement). Nous avons soumis les

femelles ovipares gravides et les femelles vivipares gestantes à l'un ou l'autre des traitements thermiques tout au long de leur gestation. En complément des lots NN et MM ovipares décrits précédemment, nous avons constitué deux lots expérimentaux supplémentaires :

- le lot vivipare NN, dans lequel la gestation s'est déroulée en totalité dans le régime « N »
- le lot vivipare « MM » dans lequel la gestation s'est déroulée en totalité dans le régime « M »

Ici nous n'avons pas tenté de tester la possibilité d'une variation des bénéfices procurés par la thermorégulation maternelle entre les phases embryonnaire et fœtale du développement pendant la gestation de la forme vivipare (*i.e.* il n'y a pas de lots vivipares NM ni MN). En effet pour pouvoir imposer une transition de traitement thermique (M à N ou N à M) entre les phases embryonnaire et fœtale de la gestation vivipare il aurait fallu pouvoir déterminer exactement la période charnière (moment où les embryons atteignent les stades 31-33, comme lors de la ponte des ovipares) ce qui ne nous a pas été techniquement possible du fait de la résolution insuffisante de notre échographe.

Les caractéristiques mesurées et les tests comportementaux effectués lors de notre manipulation des cycles thermiques sont décrits en détail ci-dessous. Tous les tests portant sur des performances comportementales individuelles susceptibles de varier avec la température ambiante (endurance, exploration) ont été précédés d'une période d'acclimatation d'une heure dans un contenant opaque au centre du dispositif expérimental d'une heure. De plus la température du dispositif a été mesurée avant la réalisation des observations.

Phénologie et succès reproducteur

L'influence du traitement thermique sur la vitesse et le succès du développement sont des composants essentiels de cette étude. Nous avons mesuré les durées de la rétention des œufs (forme ovipare) et de la gestation (forme vivipare) depuis la date d'ovulation déterminée par échographie (voir ci-dessus) jusqu'à la date de parition, ainsi que la durée d'incubation externe des œufs de la forme ovipare. La durée totale de développement a été calculée depuis la date d'ovulation jusqu'à la date de naissance des juvéniles. Elle est ainsi égale à la durée de la gestation pour la forme vivipare et à la somme de la durée de rétention et de la durée d'incubation externe des œufs pour la forme ovipare.

Le succès reproducteur a été défini comme le rapport du nombre de nouveau-nés vivants sur le total des ovules produits

(c'est à dire, incluant les œufs non fertilisés, les embryons morts, les mort-nés et les nouveau-nés viables). Ne pouvant pas distinguer visuellement les œufs non fertilisés des mortalités précoces (très petits embryons peu différenciés), nous les avons regroupés dans une même catégorie dénommée « ovules non développés ». Pour un total de 38 pontes-portées étudiées, nous avons dénombré 122 nouveau-nés viables, 26 ovules non développés, 12 embryons morts et 36 mort-nés.

Phénotype à la naissance

Les mesures morphologiques ont été collectées à la naissance (23 avril au 9 juin 2014). Nous avons mesuré le poids (± 1 mg) et les variables biométriques de longueur de la partie céphalo-cervicale, de la partie thoraco-abdominale et de la queue ($\pm 0,01$ mm) en utilisant un scanner numérique (voir plus haut).

Les nouveau-nés ont été sexés par comptage des deux séries d'écaille médio-ventrales entre la plaque anale et le collier). Malgré une nécessité de calibration pour chaque population, cette technique est utilisée en routine dans de nombreux suivis de populations (dans les Cévennes, Lecomte *et al.* 1992 ; en Bretagne Heulin, 1985 ; et dans les Pyrénées Heulin *et al.* 1997). Les femelles présentent toujours un plus grand nombre d'écailles que les mâles. Dans notre étude nous avons pu estimer à 98% le taux d'assignement correct du sexe à la naissance, en fondant cette estimation sur la possibilité d'un sexage visuel direct des juvéniles recapturés dans nos enclos en juillet-septembre (*i.e.* un seul mauvais assignement initial sur 51 juvéniles recapturés).

Ce comptage a aussi été l'occasion de dénombrer les anomalies des rangées d'écailles ventrales (dissymétries entre la série gauche/série droite, dues à des dédoublements et/ou fusion de rangées d'écailles) afin d'évaluer si nos divers traitements expérimentaux avaient pu en modifier la fréquence.

Performances d'endurance

Les tests d'endurance ont été effectués pour tous les juvéniles, à J+1 après leur naissance, dans un local dont la température était stabilisée entre 23° et 28°C (moyenne 27°C \pm 0.75).

Nous avons utilisé une piste de course circulaire inspirée du système de Clobert *et al.* (2000) pour mesurer l'endurance des nouveau-nés. Le diamètre extérieur de la piste est de 60 cm et un diamètre intérieur de 50 cm. La piste était délimitée par des parois de plexiglas opaques de 15 cm de haut et comportait un support enduit de sable fin collé procurant une bonne adhérence lors des déplacements des lézards. Les lézards étaient placés sur la piste de course et stimulés par de légers coups de pinceau sur la queue

pour déclencher leur fuite. L'endurance a été définie comme le temps de course effectué jusqu'à ce que l'individu s'arrête et refuse de reprendre sa course après 10 nouvelles stimulations (coups de pinceau) consécutives. Nous avons aussi mesuré la latence de premier arrêt (durée de course avant le premier arrêt) et le nombre d'arrêts de l'individu en cours de test.

Performances exploratoires

Des mesures de l'activité locomotrice et exploratoire des nouveau-nés ont aussi été réalisées à J+2 dans un espace ouvert de 365 x 207 mm pourvu d'un revêtement (bulgomme) procurant une bonne adhérence et donc facilitant les déplacements des individus. Un abri (H 30 x L 100 x l 60 mm) a été placé à chaque extrémité du dispositif. Les tests ont eu lieu dans une pièce calme et stabilisée thermiquement entre 23 et 30°C (26±0,88°C). Après chaque test l'ensemble du système était nettoyé à l'éthanol 70% afin de retirer toute odeur résiduelle.

Le test consiste à placer, après acclimatation, un nouveau-né au centre du dispositif et à enregistrer son comportement durant l'heure qui suit (caméra vidéo SONY Handycam Xr100/101). Nous avons caractérisé le comportement exploratoire (logiciel Avidemux 2.6) par comptage du nombre de secteurs visités (l'espace disponible étant subdivisé en six secteurs d'égales surfaces), un comptage du nombre de visites des abris et une quantification du temps total passé sous abri.

Maintien et suivi en enclos semi-naturels

Tous les nouveau-nés ont été identifiés individuellement et placés en enclos semi-naturels à J+3 après leur naissance. Les enclos (4m x 4m) présentaient une végétation bien développée et un abondant peuplement d'arthropodes (*i.e.* servant ainsi de nourriture aux lézards) dès le début de notre expérimentation. Un arrosage quotidien entre 16h00 et 17h00, un entretien régulier de la végétation des enclos, et un apport alimentaire additionnel (en grillons juvéniles) ont permis de maintenir de bonnes conditions de développement des juvéniles tout au long de notre suivi. Les enclos étaient équipés d'abris et de divers substrats de thermorégulation (plaque en caoutchouc, dalle de béton, graviers, briques alvéolaires).

Les nouveau-nés ont été distribués dans 10 enclos différents, en veillant à toujours répartir les individus d'une même portée dans différents enclos, et d'une façon permettant un équilibre des populations de chaque enclos (pourcentage d'individus ovipares/vivipares, pourcentage d'individus issus des divers traitements thermiques NN, NM, MN, MM). Ce protocole de

répartition a été conçu pour faire en sorte que d'éventuels effets locaux (*e.g.* variations interenclos de l'exposition solaire, des communautés animales et végétales) soient distribués de façon égale sur tous les sous-groupes considérés dans nos analyses. Cette répartition a été faite progressivement, au fur et à mesure des naissances : l'effectif introduit s'accroît donc au cours du temps, mais n'est jamais différent d'un enclos à l'autre. On mime ainsi une situation « naturelle » réaliste où les naissances s'étaleraient dans le temps.

Deux périodes de recaptures (du 1^{er} au 15 juillet et du 1^{er} au 15 septembre 2014) ont permis de réaliser un suivi de survie des juvéniles dans les enclos. Ces recaptures ont été effectuées par un piégeage (contenant enterré – pitfall trap) complété par des captures manuelles.

CONTRAINTES AU DEVELOPPEMENT FŒTAL *IN UTERO*

Compromis fécondité/développement

Nous nous sommes intéressés à la possibilité qu'en raison des contraintes de disponibilité d'oxygène dans l'utérus (voir intro-chapitre 1), il puisse exister une influence de la fécondité maternelle sur le stade de développement et/ou le poids des embryons au moment de la ponte chez la forme ovipare de notre espèce. Cette investigation a été basée sur l'étude de 66 œufs issus de 16 femelles ayant été maintenues dans nos conditions standards d'élevage (capture en août, hibernation, accouplement et ponte au laboratoire). Un contrôle biquotidien nous a permis de récolter tous les œufs dans les premières heures suivant leur ponte. La dissection de ces œufs a permis de renseigner le stade de développement (selon nomenclature des tables de Dufaure et Hubert 1961) ainsi que les poids frais et le poids sec ($\pm 0,1\text{mg}$) des embryons qu'ils contenaient. Pour éviter une erreur de mesure due à la présence de liquides extraembryonnaires, les embryons ont été brièvement égouttés (1s sur papier absorbant) avant leurs pesées (*i.e.* poids frais). La mesure du poids sec a été effectuée après séchage des embryons pendant une semaine en étuve à 60°C.

La flexibilité thoraco-abdominale (allongement/rétraction)

Il existe chez *Zootoca vivipara* un allongement flexible (suivi ultérieurement de rétraction) de la partie thoraco-abdominale du corps des femelles vivipares durant leur gestation (Bulakhova 2013). Durant ce travail nous avons réalisé un suivi de la longueur



(SVL) des femelles ovipares et vivipares pendant et après reproduction par imagerie numérique (scan, voir plus haut). Une première mesure a été effectuée au plus près de la parition (5.65 ± 4.06 jours avant parition pour la forme vivipare et 4.13 ± 3.68 jours avant parition pour la forme vivipare) et enfin une mesure dans les trois jours post parition (PP). Ces mesures ont été réalisées pour les années 2013 (n=19 femelles ovipares, 25 femelles vivipares), 2014 (17 femelles ovipares et 19 femelles vivipares) et 2015 (20 femelles ovipares et 19 femelles vivipares).

- CHAPITRE IV – CHANGEMENTS METABOLIQUES ET COÛTS ASSOCIÉS

Sommaire du chapitre

<u>IV-1) Article 1 – Influence of reproductive mode on metabolic costs of reproduction : insight from a bimodal lizard <i>Zootoca vivipara</i>.</u>	48
IV-1.1) traduction française du résumé de l'article 1.....	48
IV-1.2) Article publié dans « <i>Journal of Experimental Biology</i> »	49
<u>IV-2) Article 2 – Determinant of embryonic stages at oviposition and oxygen consumption during incubation in a lizard with prolonged egg retention (<i>Zootoca vivipara</i>).</u>	58
IV-2.1) Traduction française du résumé de l'article 2	58
IV-2.2) Manuscrit de l'article soumis à « <i>Journal of comparative Physiology B</i> »	59

TRADUCTION FRANÇAISE DU RESUME DE L'ARTICLE 1

L'examen des forces sélectives liées à la transition de l'oviparité à la viviparité chez les vertébrés doit prendre en compte la compréhension des coûts énergétiques relatifs de chacun des modes reproducteurs. Les comparaisons inter-spécifique des modes reproducteurs incluent cependant des biais de par les nombreuses autres différences inhérentes à la différence d'espèce. Dans cette étude nous avons étudié la consommation d'oxygène, qui est un proxy de la dépense énergétique, durant la reproduction des femelles ovipares et vivipares de l'espèce à reproduction bimodale *Zootoca vivipara* (Jaquin 1787).

La consommation d'oxygène des femelles augmente progressivement au cours de la reproduction pour atteindre un pic juste avant la parition. Ce pic a représenté une augmentation de 46% (forme ovipare) et 82% (forme vivipare) de la consommation d'oxygène au stade pré-reproducteur. L'augmentation totale de consommation d'oxygène au cours du temps (TIOC) durant la phase pré-ovulatoire n'a pas été différente entre les modes reproducteurs. Puis, la TIOC post-ovulatoire fut plus de trois fois supérieure chez les femelles vivipares, montrant une forte augmentation du métabolisme des fœtus, accompagné d'un coût maternel de gestation (MCP). Le MCP représente ainsi 22% du métabolisme total des femelles vivipares en fin de gestation, tandis qu'il reste négligeable chez les femelles ovipares avant ponte.

Nos résultats démontrent que la rétention intra-utérine des œufs durant la première moitié de développement typique de la plupart des squamates ovipares, induit une demande énergétique moindre ; alors que la rétention prolongée des espèces vivipares impose des contraintes métaboliques bien plus grandes. La sélection pour la transition de l'oviparité à la viviparité doit ainsi procurer des bénéfices qui contrebalanceront non seulement la charge supplémentaire associée à la prolongation de la rétention intra-utérine, mais aussi les coûts énergétiques substantiels associés à cette charge.

RESEARCH ARTICLE

Influence of reproductive mode on metabolic costs of reproduction: insight from the bimodal lizard *Zootoca vivipara*

Thomas Foucart^{1,2,*}, Olivier Lourdais^{2,3}, Dale F. DeNardo³ and Benoit Heulin¹

ABSTRACT

Examination of the selective forces behind the transition from oviparity to viviparity in vertebrates must include an understanding of the relative energy costs of the two reproductive modes. However, interspecific comparisons of reproductive mode are confounded by numerous other inherent differences among the species. Therefore, we compared oxygen consumption, as a reflection of energy costs, during reproduction in oviparous and viviparous females of the reproductively bimodal lizard *Zootoca vivipara* (Jaquin 1787). Female oxygen consumption progressively increased over the course of reproduction, peaking just prior to parturition when it was 46% (oviparous form) and 82% (viviparous form) higher than it was at the pre-reproductive stage. Total increase in oxygen consumption (TIOC) during the pre-ovulation period was not different between the reproductive modes. Conversely, post-ovulation TIOC was more than three times higher in viviparous females, reflecting a dramatic increase in embryonic metabolism as well as maternal metabolic costs of pregnancy (MCP). MCP accounted for 22% of total metabolism in viviparous females, whereas it was negligible in oviparous females. Our results demonstrate that egg retention through the first third of development, as is typical of most oviparous squamates, entails minimal maternal energy demand, while extending retention imposes much greater metabolic constraints. Selection for transition from oviparity to viviparity must therefore provide benefits that outweigh not only the added burden associated with prolonged embryonic retention, but also the substantial additional energy costs that are incurred.

KEY WORDS: Reproduction, Oviparity, Viviparity, Squamate, Metabolic cost, Evolution

INTRODUCTION

Viviparity (live birth) may impart many fitness advantages under certain conditions (Shine, 1995). Accordingly, viviparity has independently evolved 150 times in vertebrates, including instances within all major taxa except birds, crocodylians, chelonians and agnathans (for reviews, see Blackburn, 1992; Blackburn, 2014). To decipher the selective forces involved in the transition from oviparity to viviparity, it is essential to understand the various costs and benefits to both the mother and offspring (Crespi and Semeniuk, 2004). Offspring benefits of intra-uterine retention have received considerable attention, with maternal, nutritional, phenological and offspring phenotypical effects all appearing relevant [for review in reptiles, see previous publications (Shine, 1985; Shine and

Schwarzkopf, 1992; Shine, 1995; Lorigou et al., 2013a; Lorigou et al., 2013b)]. Examination of maternal constraints and associated energy costs of reproduction has primarily focused on either the physical burden or the energy demands associated with providing nutrients for embryonic development (e.g. Shine and Schwarzkopf, 1992; Stewart, 2013). However, supporting the embryos *in utero* imposes a specific energy demand on the mother. While relatively unexplored, knowing to what extent the evolution from oviparity to viviparity alters maternal energy expenditure during reproduction is a crucial component of understanding the selective forces of viviparity.

An increase in the metabolic rate of females during reproduction has been documented in a variety of oviparous and viviparous amniotes (Hyttén and Leitch, 1971; Hoversland et al., 1974; Pernoll et al., 1975; Guillette, 1982; Birchard et al., 1984; Beuchat and Vleck, 1990; Beaupre and Duvall, 1998; Angilletta and Sears, 2000; Robert and Thompson, 2000; Nilsson and Raberg, 2001; Vézina and Williams, 2002; Schultz et al., 2008; Van Dyke and Beaupre, 2011; Yue et al., 2012). Available data suggest that metabolic changes during the pre-ovulation period vary among species depending on the extent of lecithotrophic energy provisioning (i.e. via yolk) (see Van Dyke and Beaupre, 2011). Besides direct energy provisioning, oviductal proliferation for ova implantation or egg-shelling may create additional pre-ovulation energy demands (for a review, see Van Dyke and Beaupre, 2011). Metabolic changes after ovulation (i.e. during pregnancy) are attributable to (i) embryonic metabolism and (ii) maternal metabolic demand of supporting the embryos (termed the metabolic cost of pregnancy, MCP). MCP may involve numerous maternal costs including but not limited to those associated with supplying oxygen to the fetus (Bader et al., 1959; Hyttén and Leitch, 1971; Grigg and Harlow, 1981; Birchard et al., 1984; Murphy et al., 2010; Parker et al., 2010), handling fetal wastes (Clark and Siskin, 1956), and, in matrotrophic species, supplying nutrients to the embryos (Stewart and Thompson, 2000).

While viviparity has evolved in most major vertebrate taxa, the preponderance of transitions to viviparity have occurred within the squamates (i.e. 115 times in lizards, snakes and amphisbaenians versus 35 times in all other taxa) (Blackburn, 1995; Blackburn, 2006; Blackburn, 2014). Despite the distinct difference in producing an egg versus giving live birth, oviparous and viviparous squamates share important similarities. Specifically, energy provisioning is predominantly lecithotrophic regardless of reproductive mode, and most oviparous squamates retain their eggs *in utero* for more than 25% of embryonic development (Shine, 1983; Blackburn, 1995; Andrews and Mathies, 2000). Therefore, viviparity in most squamates can be viewed as an extension of oviparous egg retention with associated complex physiological adaptation to support intra-uterine life (Shine, 1983; Van Dyke et al., 2014). Yet one important difference between oviparous and viviparous squamates is the pronounced development of uterine eggshell glands prior to ovulation in oviparous forms (Heulin et al., 2005) (see also

¹Station Biologique de Paimpont, UMR 6553 CNRS, F-35380, Paimpont, France.

²Centre d'Étude Biologique de Chizé CNRS, F-79360, Villiers en Bois, France.

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

*Author for correspondence (thomas.foucart@gmail.com)

Received 19 February 2014; Accepted 29 September 2014

List of symbols and abbreviations

ER1	egg retention 1, last measure before partition in oviparous females, with equivalent for viviparous females
ER2	egg retention 2, intermediate stage during viviparous gestation
ER3	egg retention 3, last measure before partition in viviparous females
M_b	body mass (g)
MCP	metabolic cost of pregnancy ($\text{ml O}_2 \text{ min}^{-1}$)
OV	ovulation stage, first measure after ovulation
PP	post-partition, measured 3 days after partition
PR	pre-reproductive stage, first measured after winter emergence
SVL	snout-vent length (mm)
TIOC	total increase of oxygen consumption (ml O_2)
VIT	vitellogenic stage, last measure before ovulation
\dot{V}_{O_2}	oxygen consumption ($\text{ml O}_2 \text{ min}^{-1}$)
\dot{V}_{O_2}	difference between pre-partition stage \dot{V}_{O_2} and post-partition \dot{V}_{O_2}

references therein). This difference could result in significantly higher maternal energy costs in oviparous species during the pre-ovulation period. In contrast, the extended embryonic retention experienced by viviparous species probably imparts considerably larger post-ovulation energy demand.

One major problem in examining differential maternal energy costs based on reproductive mode is that such studies typically require interspecific comparisons, where critical phylogenetic and physiological differences complicate the ability to attribute differences to reproductive mode (Birchard et al., 1984; Beuchat and Vleck, 1990; Demarco and Guillette, 1992; Demarco, 1993; Beaupre and Duvall, 1998; Angilletta and Sears, 2000; Robert and Thompson, 2000; Schultz et al., 2008; Van Dyke and Beaupre, 2011; Yue et al., 2012; Dupoué and Lourdaï, 2014). However, a few squamate species are reproductively bimodal (Heulin et al., 1991; Heulin et al., 1993; Heulin et al., 1997; Qualls et al., 1995; Smith and Shine, 1997; Stewart, 2013) and therefore provide a rare opportunity for the examination of mode-based differences in reproductive energetics. *Zootoca vivipara* [formerly *Lacerta vivipara* (Jaquin 1787)] is one of three lizard species known to exhibit interpopulational variation in reproductive mode (Heulin et al., 1991; Stewart, 2013). Viviparous female *Z. vivipara* give birth to fully formed offspring (final stage 40) (Dufaure and Hubert, 1961), whereas oviparous females oviposit eggs with embryos between stages 30 and 35 (Braña et al., 1991; Heulin et al., 1991; Heulin et al., 2002). In the oviparous mode, the yolk (vitellus) and embryo are encased in an eggshell composed of a thick (40–65 μm) mat of fibrous protein overlaid by a thin (few micrometers) layer of calcium crystals (Heulin, 1990; Heulin et al., 2002; Heulin et al., 2005). The embryos of viviparous females are also lecithotrophic, but are enveloped in a very thin shell membrane (6–10 μm of fibrous protein without a calcium layer) throughout gestation (Panigel, 1956; Heulin, 1990). Under favorable climatic conditions, oviparous females can lay two clutches in a given year, while, even under optimal conditions, viviparous females are limited to a single brood each year (Heulin et al., 1991; Heulin et al., 1994; Heulin et al., 1997).

We compared, as a metabolic rate proxy, the oxygen consumption of oviparous and viviparous females throughout the reproductive cycle under standardized laboratory conditions. We limited our study to the first clutch in oviparous females. To identify possible phylogenetic (non-reproductive) differences between the two populations, we first assessed body characteristics: mass (M_b), snout-vent length (SVL), and oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) of both males and females at post-winter emergence, prior to any reproductive activity. We then monitored changes in \dot{V}_{O_2} throughout the reproductive cycle of females up to partition (term collectively

defining either oviposition or parturition) (Smith, 1975; Blackburn, 1992; Morafka et al., 2000). Increases in \dot{V}_{O_2} were integrated over time to provide synthetic estimates of total increase in oxygen consumption (TIOC) prior to and after ovulation. We also estimated the MCP just prior to partition. We hypothesized that metabolic demands of pregnancy are dependent on both the stage of reproduction and the reproductive mode being employed.

RESULTS

Oxygen consumption at winter emergence

The mean oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) values were: $14.53 \pm 1.67 \text{ l min}^{-1}$ for the viviparous population males, $13.36 \pm 2.06 \text{ l min}^{-1}$ for the oviparous population males, $12.49 \pm 2.48 \text{ l min}^{-1}$ for the viviparous females, and $10.91 \pm 2.76 \text{ l min}^{-1}$ for the oviparous females. Individuals from the viviparous population were longer and heavier (SVL $F_{1,86}=6.88$, $P=0.010$; M_b $F_{1,86}=6.95$, $P=0.010$), and there was no effect of the interaction between sex and reproductive mode. Females were longer and lighter than males, independent of reproductive mode (SVL: $F_{1,86}=15.1$, $P<0.001$; M_b $F_{1,86}=12.13$, $P<0.001$). Due to differences in M_b and SVL between sexes and reproductive modes, we examined oxygen consumption relative to body mass ($\dot{V}_{O_2}=bM_b^a$; Fig. 1). We found a pronounced effect of M_b on \dot{V}_{O_2} ($F_{1,83}=81.52$, $P<0.001$) with a significant difference between males and females ($F_{1,83}=7.63$, $P=0.007$), but no difference between oviparous and viviparous individuals ($F_{1,83}=1.97$, $P=0.163$) and no interaction effects. Hence once controlling for sex and body mass, the oxygen consumption at emergence did not differ between the oviparous and viviparous populations of *Z. vivipara*.

Changes in body mass and comparative fecundity

In the subsample considered (i.e. reproductive females), viviparous females were larger than oviparous ones (mean initial body mass 2.85 ± 0.45 and 2.46 ± 0.55 g, respectively, t -tests: $t=2.23$, d.f.=32, $P=0.033$). Body mass increased during reproduction for both reproductive modes (ANOVA; oviparous: $F_{4,80}=129.51$, $P<0.001$; viviparous $F_{6,72}=144.67$, $P<0.001$). In oviparous females, mass increased up to ovulation and remained constant thereafter [Tukey's

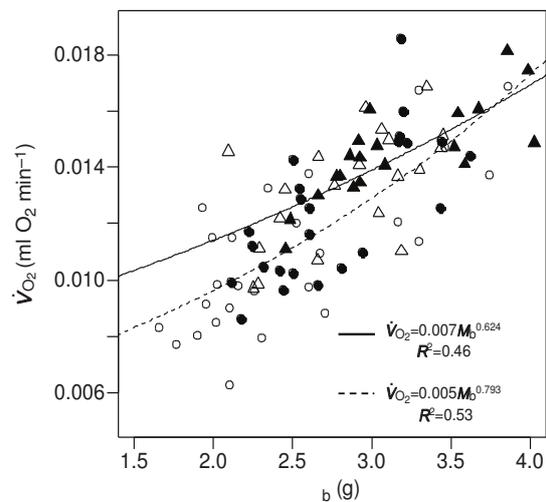


Fig. 1. Relationship between log-transformed \dot{V}_{O_2} and body mass (M_b) at post-winter emergence. Open triangles, oviparous population males; filled triangles, viviparous population males; open circles, oviparous females; filled circles, viviparous females. There is no difference between oviparous and viviparous individuals, but there is a significant difference between females (dashed regression line) and males (continuous regression line).

Table 1. Oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) of oviparous and viviparous females at various stages of reproduction

	Date (days after emergence)		Body mass (g)		\dot{V}_{O_2} ($\times 10^{-3}$, ml O_2 min $^{-1}$)	
	Oviparous	Viviparous	Oviparous	Viviparous	Oviparous	Viviparous
PR	0	0	2.46 \pm 0.55	2.85 \pm 0.45	10.21 \pm 2.78 ^a	13.01 \pm 2.65 ^{a,f}
VIT	28.6 \pm 8.5	31.2 \pm 7.9	3.13 \pm 0.75	3.44 \pm 0.49	13.88 \pm 2.74 ^b	15.07 \pm 2.31 ^{a,b}
OV	37.0 \pm 8.2	39.7 \pm 7.5	3.38 \pm 0.81	3.76 \pm 0.61	14.03 \pm 2.68 ^{b,c}	16.54 \pm 2.94 ^{b,c}
ER1	48.4 \pm 8.9	53.8 \pm 9.9	3.41 \pm 0.82	4.43 \pm 0.64	14.76 \pm 2.99 ^c	17.36 \pm 2.33 ^{c,d}
ER2	n.a.	62.7 \pm 9.4	n.a.	4.82 \pm 0.72	n.a.	19.39 \pm 3.21 ^d
ER3	n.a.	72.7 \pm 9.4	n.a.	4.89 \pm 0.85	n.a.	23.65 \pm 3.60 ^e
PP	54.1 \pm 8.4	84.2 \pm 7.7	2.34 \pm 0.47	2.76 \pm 0.38	9.53 \pm 1.88 ^a	12.24 \pm 1.50 ^f

Reproductive stages are defined as follows: PR, pre-reproductive; VIT, vitellogenesis–follicular differentiation; OV, ovulation; ER1 to ER3, intra-uterine development; PP, post-partition. The date is defined as the number of days after post-winter emergence. Superscript letters (a–f) refer to the results of Tukey's *post hoc* tests, with common letters indicating that the \dot{V}_{O_2} values do not differ between those stages within a reproductive mode (at $P>0.05$). n.a., data not available.

honestly significant difference (HSD) test, $P=0.990$]. In viviparous females, mass increased up to ER2 and remained constant thereafter (Tukey's HSD test, $P=1$; see Table 1). For each reproductive mode, body mass after reproduction (PP) was not different from body mass at emergence (PR, see Table 1) (Tukey's HSD test, $P=1$ and $P=0.39$, respectively, for viviparous and oviparous females).

Mean fecundity was significantly higher in viviparous (5.1 \pm 1.7 young per female) compared with oviparous females (4.0 \pm 1.2 eggs per female, $t=2.10$, d.f.=32, $P=0.044$). When accounting for allometric variation, a positive influence of body mass was detected (ANCOVA: $F_{1,30}=5.85$, $P=0.022$), while no difference was found between oviparous and viviparous females (ANCOVA: $F_{1,30}=1.56$, $P=0.222$).

Changes in oxygen consumption during reproduction

We first studied oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) over reproduction separately in each reproductive mode with initial maternal body mass as a covariate. We considered five stages for oviparous females (pre-reproductive, PR; vitellogenesis, VIT; ovulation, OV; early egg retention, ER1; post-partitive, PP) and seven stages for viviparous females (same five plus two additional later stages during pregnancy, ER2 and ER3). In oviparous females, \dot{V}_{O_2} varied significantly during the reproductive cycle ($F_{4,80}=60.56$, $P<0.001$) with values being lowest pre-reproduction, and then elevating during the reproductive periods (VIT, OV, ER1), and finally returning to low levels after egg laying (PP) (Table 1). Similar variation was observed in viviparous females ($F_{6,72}=62.85$, $P<0.001$) with, however, further elevation in oxygen consumption during the prolonged egg-retention stages (ER2 and ER3) (Table 1, Fig. 2).

We then compared the two reproductive modes considering only the shared reproductive stages (i.e. PR, VIT, OV, ER1 and PP). We found no significant difference between oviparous and viviparous females for any shared stage (ANCOVA: $F_{1,31}=0.32$, $P=0.573$; Fig. 2). However, \dot{V}_{O_2} of viviparous females before partition (i.e. ER3) was twice that of oviparous females before partition (i.e. ER1)

(ANCOVA: $F_{1,34.88}=0.55$, $P<0.001$). \dot{V}_{O_2} before partition was 46% (oviparous females) and 82% (viviparous females) higher than pre-reproductive \dot{V}_{O_2} measures.

We used all \dot{V}_{O_2} measures collected to evaluate the increase in oxygen consumption over time (i.e. TIOC; see Materials and methods; see also Fig. 2). The mean raw TIOC were, respectively, for oviparous and viviparous females, 143 \pm 71 and 142 \pm 77 ml O_2 during the pre-ovulation period and 106 \pm 50 and 387 \pm 92 ml O_2 during the post-ovulation period (see Table 1 for duration of each period). A significant interaction was found between stage and reproductive mode (ANCOVA with body mass as a covariate, $F_{1,32}=50.26$, $P<0.001$). TIOC was higher during pre-ovulation than post-ovulation in oviparous females (Tukey's HSD test, $P=0.003$), while the opposite pattern was found in viviparous females (Tukey's HSD test, $P<0.001$). During the pre-ovulation period, TIOC did not differ between reproductive modes (Tukey's HSD test, $P=0.760$). Pre-ovulation TIOC represented 19.17 \pm 8.19% (range 4.10–36.60%) of the total pre-ovulation oxygen consumption in *Z. vivipara*. During the post-ovulation period, TIOC was higher in viviparous females than oviparous females (Tukey's HSD test, $P<0.001$). Interestingly, post-ovulatory TIOC represented similar percentages of total post-ovulation oxygen consumption (i.e. including non-reproductive demand) for oviparous and viviparous females (oviparous: 32.64 \pm 8.02%, range 20.24–55.97%; viviparous: 33.07 \pm 6.01%, range 20.63–44.35%; ANOVA, $F_{1,32}=0.09$, $P=0.769$).

During the pre-ovulation period, TIOC increased with fecundity (ANCOVA: $F_{1,29}=10.57$, $P=0.003$) but did not differ between oviparous and viviparous females (ANCOVA: $F_{1,29}=0.77$, $P=0.388$). During the post-ovulation period, TIOC increased with pre-reproductive (PR) maternal body mass (ANCOVA: $F_{1,29}=5.14$, $P=0.031$).

Metabolic costs of pregnancy

To calculate MCP we created linear regressions of oxygen consumption difference between pre- and post-partitive stages (\dot{V}_{O_2})

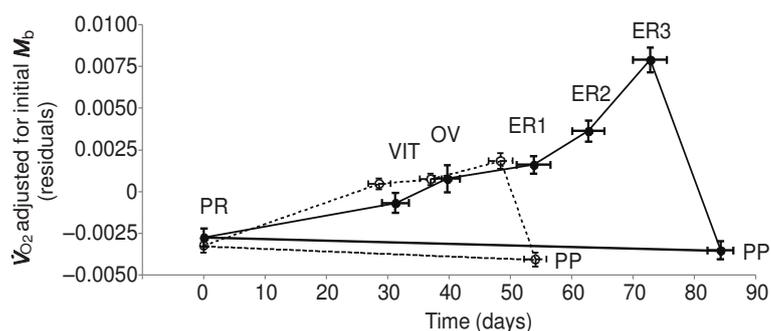


Fig. 2. Changes in oxygen consumption from emergence to partition in oviparous (open circles) and viviparous (filled circles) females. Oxygen consumption values are expressed as residuals from regression of oxygen consumption on body mass with data from all stages of followed females. Reproductive stages are as defined in Table 1. Error bars represent the standard error.

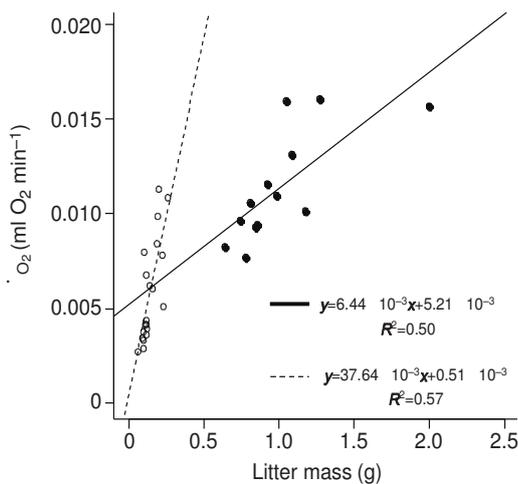


Fig. 3. MCP estimates derived from linear regressions of \dot{V}_{O_2} against litter mass (embryos at oviposition or neonates at birth) at the end of egg retention in oviparous (open circles) and viviparous (filled circles) females. \dot{V}_{O_2} is last pre-partition \dot{V}_{O_2} minus post-partition \dot{V}_{O_2} . The y -value at a null litter size represents the metabolic cost of pregnancy (MCP), i.e. the maternal energy expenditure to produce a null quantity of young.

on neonate (or embryo) masses (Fig. 3). Regressions were significant in the two groups of females (oviparous females: $F_{1,18}=26.41$, $P<0.001$; viviparous females: $F_{1,11}=12.85$, $P=0.004$). The MCP (intercept of the regression) was significantly different from zero for viviparous females (one-tailed t -test, $t=2.859$, $P=0.008$), but not for oviparous females (one-tailed t -test, $t=0.457$, $P=0.327$). The calculated intercept (MCP) was 10 times higher in viviparous females compared with oviparous females ($5.2 \pm 1.8 \times 10^3 \text{ ml O}_2 \text{ min}^{-1}$ versus $0.5 \pm 1.1 \times 10^3 \text{ ml O}_2 \text{ min}^{-1}$, respectively). These MCP values represented 46% of the mean \dot{V}_{O_2} (or 22% of \dot{V}_{O_2} at stage ER3) in viviparous females and 9% of the mean \dot{V}_{O_2} (or 3% of \dot{V}_{O_2} at stage ER1) in oviparous females.

DISCUSSION

Clarifying the energy implications of reproductive mode is a vital component in understanding selective pressures behind the evolution of viviparity (Shine and Schwarzkopf, 1992; Qualls and Shine, 1998; Bleu et al., 2012). Herein, we used the reproductively bimodal lizard *Z. vivipara* to compare the metabolic costs of reproduction between oviparous and viviparous individuals. Once controlled for body mass and sex, metabolic rate at post-winter emergence did not differ between oviparous and viviparous *Z. vivipara*.

During reproduction, oviparous and viviparous females exhibited similar increases in oxygen consumption up to the ER1 stage (last stage before oviposition in oviparous females). The most obvious difference between the two groups is that the prolonged gestation of viviparous females resulted in a further rise in metabolic rate that does not exist in oviparous females. Integration of \dot{V}_{O_2} over time provided additional insight: the total increase in oxygen consumption (TIOC) during the pre-ovulation period was similar between reproductive modes and was dependent on fecundity, but was 254% higher in viviparous females during the egg retention period. The greatly elevated TIOC of viviparous females during egg retention is not surprising, because this period is considerably prolonged compared with that of oviparous females (about 2 weeks versus 6 weeks, respectively, for oviparous and viviparous females; Table 1, Fig. 2) and because the last two-thirds of gestation corresponds to exponential embryonic growth and therefore

exponential increase in embryonic oxygen demand (Xavier and Gavaud, 1986).

Contrary to our first prediction, pre-ovulation TIOC was similar between oviparous and viviparous females. Previous dissection of recently ovulated eggs revealed that eggshells from oviparous females were eight times heavier (dry mass, 8 mg) than the embryonic membranes of viviparous females (1 mg), whereas yolk content of ovulated ova (mean dry mass, 55 mg) did not differ between the two reproductive modes (Stewart et al., 2009). Thus oviparous and viviparous female *Z. vivipara* are very similar in their pre-ovulation reproductive allocation except for the synthesis of the eggshell components that are stored in the uterine glands prior to ovulation and then deposited on the fertilized ova shortly after ovulation (Heulin et al., 2005). While synthesis of these shell components requires morphological modification of uterine epithelium (Adams et al., 2004), our results suggest that preparation for egg shelling has a negligible energy demand. Alternatively, preparation for shelling may occur over a rather short time frame and thus our measurement frequency may not have been sufficient to detect energy use associated with it. A significant increase in metabolic rate during the pre-ovulation period has previously been documented for six species of viviparous snakes, and the authors attributed the entire increase to the metabolic cost of vitellogenesis (MCV) and follicle differentiation (Beaupre and Duval, 1998; Van Dyke and Beaupre, 2011). Unfortunately, there are no comparable studies on related oviparous species with well-developed eggshells to test whether oviductal activity prior to ovulation (synthesis of components for subsequent egg shelling) may further increase pre-ovulation metabolic rate. We found significant MCV values that averaged 19% of the total metabolic demand, which is lower than those recently reported in snakes (30%) (Van Dyke and Beaupre, 2011). This highlights the need for further studies on pre-ovulatory metabolic rate.

Numerous studies have documented elevated metabolic rates near the end of reproduction in squamates, corresponding to a 50–200% increase in basal (non-reproductive) metabolism (Guillette, 1982; Birchard et al., 1984; Schultz et al., 2008; Van Dyke and Beaupre, 2011; Yue et al., 2012; Dupoué and Lourdaï, 2014). Most of these studies were performed on viviparous species, and the only one allowing for a direct comparison of oviparous versus viviparous characteristics is that of Guillette (Guillette, 1982), who found that the metabolic rate of females increased by 122% at the end of egg retention in the oviparous subspecies *Sceloporus aeneus aeneus* and by 199% at the end of pregnancy in the viviparous subspecies *Sceloporus aeneus bicanthalis*. The corresponding values calculated for *Z. vivipara* in the present study (\dot{V}_{O_2} increase of 46% in oviparous females, and 82% in viviparous females) are lower than those calculated for *S. aeneus*. Interestingly, the ratio of the metabolic increases (oviparous mode/viviparous mode: $122/199=0.61$) obtained in the study of Guillette (Guillette, 1982) is similar to that ($46/82=0.55$) obtained in our study of *Z. vivipara*. Therefore the proportion of metabolic change associated with viviparity is similar in these two squamate lineages, but further work is required to address the general value of this pattern.

Our study revealed that maternal costs of supporting early embryonic development (i.e. ER1 stage), were negligible in oviparous females, but significant in viviparous females at the end of pregnancy (i.e. at ER3 stage), when MCP represented $22 \pm 8\%$ of the total metabolism of viviparous females. Several authors previously used the same regression method to test whether the MCP (intercept of the regression) at the end of pregnancy was significantly above zero for different viviparous squamates. Significant MCPs (representing between 12 and 26% of the total metabolism of late pregnant

females), were detected for some species (Robert and Thompson, 2000; Schultz et al., 2008; Yue et al., 2012; Dupoué and Lourdais, 2014), whereas non-significant MCPs were found for others (Beuchat and Vleck, 1990; Van Dyke and Beaupre, 2011). It is not clear whether these discrepancies result from phylogenetic differences or from methodological biases (see Schultz et al., 2008; Van Dyke and Beaupre, 2011). Before now, all these estimates of MCP in squamates were calculated at the end of pregnancy or egg-retention. It is, however, logical to expect changes in MCP over embryonic development, because of maternal physiological changes such as those needed to support the increasing oxygen demand of the growing embryos [e.g. changes in oxygen affinity (Grigg and Harlow, 1981); increased heart rate (Birchard et al., 1984); or for renal processing of the increased fetal nitrogenous wastes (Clark and Siskin, 1956)]. The possibility that MCP increases as egg retention progresses, though suggested by several authors (Demarco, 1993; Robert and Thompson, 2000; Van Dyke and Beaupre, 2011; Yue et al., 2012), has not yet been investigated. This is likely because it requires invasive approaches (surgical embryo removal) to compare the metabolic rates of females with and without their embryos *in utero* at different stages of pregnancy. Our data on *Z. vivipara* provide interesting, though indirect insight, as we found negligible (not significantly different from 0%) MCP in oviparous females (broadly at one-third of development) and higher MCP (22%) in viviparous females.

Most oviparous squamates lay their eggs at an embryonic stage of development that does not exceed that of oviparous *Z. vivipara* (stages 31–34) (Blackburn, 1995). Thus we suggest that, as reported in *Z. vivipara*, most oviparous squamates do not entail the additional maternal metabolic cost (MCP) that exists in viviparous species. This conclusion is important as it has recently been demonstrated that maternal thermoregulation early in development critically influences various fitness-related traits including date of birth, offspring morphology, behavior and survival (Lorioux et al., 2013a; Lorioux et al., 2013b). Hence a high thermal sensitivity at early embryonic stages may well explain the degree of egg retention (seldom prolonged after embryo stage 34) observed in most oviparous squamates. Prolonged retention provides enhanced maternal control of the embryonic thermal environment (i.e. access to preferred temperature) during critical developmental periods (neurulation, organogenesis) with minimal energy costs (our study) and over a rather short period (thereby limiting the duration of physical burden) (e.g. Le Galliard et al., 2003). Conversely, a surge in MCP that occurs at late development may help explain why so few species of oviparous squamates retain their eggs *in utero* beyond embryonic stage 34 (Blackburn, 1995; Lorioux et al., 2013a).

In conclusion, our study underlines post-ovulation metabolic consequences of prolonged gestation in viviparous females. We provide the first empirical results showing that MCP dramatically changes over time, being negligible at early retention stages (in the oviparous females) but becoming elevated at later stages (in the viviparous females). These findings are of broad interest to the understanding of the energy costs of development *in utero* and thus selective forces involved in the evolution of viviparity. Because of this value, research using other reproductively bimodal species, such as the Australian skinks *Lerista bougainvilli* and *Saiphos equallis*, would be very useful for validating and extending the conclusions drawn from our study on *Z. vivipara*.

MATERIALS AND METHODS

Study species

Zootoca vivipara [formerly *Lacerta vivipara* (Jaquin 1787)] is a small (adults 45–75 mm snout–vent length), ground-dwelling, reproductively

bimodal lacertid that generally lives in moist habitats. Life history and ecology of both oviparous and viviparous populations has been published elsewhere (Heulin et al., 1991; Heulin et al., 1997). Viviparous populations are widely distributed from the British Isles and central France to Scandinavia and eastern Russia, whereas two distinct oviparous populations (one in southern France/northern Spain, the other in northern Italy/Slovenia) are restricted to the southern margin of the range (Heulin et al., 1993; Ghielmi et al., 2001). Phylogenetic analyses and estimates of divergence time indicate that the differentiation of the oviparous and viviparous clades of this species occurred during recent (Pleistocene) geological time (Surget-Groba et al., 2001).

During the second half of August 2012, 20 males and 30 females of each reproductive mode were collected from an oviparous population near Louvie, southwest France (43°06'N, 0°23'W, 370 m above sea level), and a viviparous population near Paimpont, northwest France (48°01'N, 2°10'W, 155 m above sea level). Both of these populations have been used previously for studies of embryonic development (Stewart et al., 2004; Stewart et al., 2009). Captured lizards were transported to the Station Biologique de Paimpont. All experimental protocols were approved (authorization no. R-23012-BH-01) by the relevant ethics committee (Comité Rennais d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale, no. 07).

Animal husbandry

Lizards were housed individually in plastic terraria. Each terrarium (30×20×20 cm) was equipped with a shelter, dishes of food and water, and a 40 W bulb that provided heat for 6 h day⁻¹. Large windows provided natural light for about 12 h day⁻¹.

In order to elicit reproduction and synchronize the reproductive cycles, the lizards were overwintered in the laboratory using a standard protocol (Gavaud, 1983; Heulin et al., 2005). On 1 October, lizards were placed in small boxes containing damp sand and wet moss, and these boxes were placed in a dark chamber (brand Liebherr, Dortmund, Germany) that was cooled progressively from 10 to 4°C during the first week, and then maintained at a constant 4°C thereafter. The lizards were removed from this chamber and placed in separate terraria after 3 months (males) or 4 months (females). At this time, all females are in a non-reproductive state (i.e. prior to the onset of vitellogenesis or uterine proliferation) (Heulin et al., 2005). During the third week post-emergence, females were allowed to copulate with males for 2–3 days.

Experimental design

First, to identify any phylogenetic (non-reproductive) differences in metabolism between the two populations, we measured, on the day following winter emergence and without having yet been fed, oxygen consumption (\dot{V}_{O_2} , in ml min⁻¹) of all lizards (26 oviparous females, 24 viviparous females, and 20 males from each population). Individuals used for \dot{V}_{O_2} measurements at winter emergence had the following body characteristics: viviparous population males ($N=20$; SVL=53.6±2.8 mm; $M_b=3.14±0.49$ g), oviparous population males ($N=20$; SVL=51.5±2.3 mm; $M_b=2.84±0.43$ g), viviparous females ($N=24$; SVL=56.1±3.7 mm; $M_b=2.75±0.45$ g), oviparous females ($N=26$; SVL=54.4±3.7 mm; $M_b=2.48±0.62$ g).

After these initial \dot{V}_{O_2} measurements, we focused solely on reproductive females. Several, mainly small individuals (five oviparous females and 11 viviparous females) did not reproduce or failed reproduction and were removed from this second analysis. Therefore, only a subset of 21 oviparous females (SVL=54.33±3.54 mm; $M_b=2.46±0.55$ g) and 13 viviparous females (SVL=56.38±3.95 mm; $M_b=2.85±0.45$ g) of the initial sample of females was used to survey oxygen consumption changes throughout reproduction. The second \dot{V}_{O_2} measurement (and an associated 48 h of fasting) was performed 3 weeks after the first measurement to avoid compromising the onset of reproduction (including copulation). During the following weeks up to ovulation, \dot{V}_{O_2} was measured approximately every 8–10 days. The total number of measures performed during the pre-ovulation period varied between females and ranged between 1 and 4 (1.94±0.89).

Ultrasound monitoring and identification of reproductive stages After each \dot{V}_{O_2} measurement, the female underwent an ultrasound (Sonosite MicroMaxx, Inc., Bothell, WA, USA) examination to determine when the

female went from the vitellogenic stage (spherical follicles in the middle of the coelomic cavity) to the post-ovulation stage (ellipsoidal ova aligned in the uterus) (Gilman and Wolf, 2007). This enabled us to identify for each female a vitellogenic stage (VIT) and, about 8–9 days later, an early post-ovulation stage (OV). Subsequent \dot{V}_{O_2} measurements were performed during the early egg-retention stage (ER1, in both parity modes), prolonged egg-retention stages (ER2 and ER3, only in viviparous females), and a final post-parity stage (PP, in all females; see Table 1 for dates). PP measurements were obtained 3 days after partition (i.e. after 24 h of feeding followed by 48 h of fasting). Cages were inspected daily for egg laying and parturition. At egg laying, we dissected the embryo from one egg and weighed it (± 1 mg) to estimate the total embryo mass of each clutch (embryo mass \times number of eggs). We also weighed all viviparous neonates to calculate total litter mass at parturition for viviparous females.

Oxygen consumption

Lizards were fasted for 48 h prior to each metabolic measurement. We estimated standard metabolic rate by measuring oxygen consumption using closed-system respirometry. We performed all trials overnight (approximately 19:00–08:00 h) in a dark climatic chamber (brand Liebherr, Dortmund, Germany), because it was previously shown that *Z. vivipara* stop all activity when placed in the dark (Cragg, 1978). All trials were carried out at $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$, which broadly corresponds to the preferred body temperature of reproductive females (LeGalliard et al., 2003; Rodríguez-Díaz et al., 2010). Lizards were placed individually into test containers (1000 ml) within the chamber and were allowed to acclimatize for 1 h before beginning a trial. A baseline air sample (two 140 ml syringes) was collected at the onset of the trial, and the test container was then carefully sealed. Trial duration was set to achieve adequate oxygen suppression based on preliminary trials (mean = 14 ± 1.13 h). A final sample of air was collected with two 140 ml syringes connected to a stopcock. Oxygen concentration (% O_2) of the samples was determined using an O_2 analyser (FOXBOX, Sable Systems, Las Vegas, NV, USA). Using an infusion pump (KDS 210, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA), samples were sent at a constant flow (60 ml min^{-1}) through a column of Drierite and then to the O_2 analyser, which was calibrated before each trial using outdoor air. Oxygen consumption (\dot{V}_{O_2} , in ml min^{-1}) was calculated as: (final % O_2 – initial % O_2) \times exact chamber volume (ml)/trial duration (min).

Metabolic parameters

In addition to \dot{V}_{O_2} , we calculated other relevant parameters. First, we estimated the increase in oxygen consumption attributable to reproduction (TIOC, in $\text{ml } O_2$) and total oxygen consumption ($\text{ml } O_2$), by integrating changes in oxygen consumption over time. TIOC corresponds to the surface area between a line joining successive \dot{V}_{O_2} measures (considering all measures for each individual) and a line that connects the pre-reproductive and post-parity values. Total oxygen consumption corresponds to the surface area between a line joining successive \dot{V}_{O_2} measures (considering all measures for each individual) and zero. We also calculated separately pre-ovulation TIOC (from winter emergence to ovulation) and post-ovulation TIOC (from ovulation to ER1 in oviparous females; from ovulation to ER3 in viviparous females). Our TIOC values are merely estimates because our measurements were not taken on the precise days of the onset of vitellogenesis, ovulation and partition, and we assume a linear change between our measurements. However, these estimates are sufficient for the comparative purposes for which they were used.

In order to estimate MCP (maintenance cost of pregnancy), we calculated for each female \dot{V}_{O_2} ($\text{ml } O_2 \text{ min}^{-1}$) as the difference between pre-parity \dot{V}_{O_2} (ER1 in oviparous females; ER3 in viviparous females) and post-parity \dot{V}_{O_2} (PP). \dot{V}_{O_2} corresponds to the fraction of oxygen consumption due to embryonic metabolism (EM), depending on the total amount of embryonic tissue and also to a specific (non-somatic) maternal metabolism (MCP) required to support the embryos *in utero*. To estimate MCP, we regressed individual females' \dot{V}_{O_2} against their litter mass (viviparous females) or embryos mass (oviparous females). MCP values correspond to the y -intercepts (when embryo mass is 0) of the regression lines (see Beauchat and Vleck, 1990; Schultz et al., 2008; Van Dyke and Beaupre, 2011; Yue et al., 2012; Dupoué and Lourdaï, 2014).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R software (The R Foundation for Statistical Computing, version 3.0.1). The data were tested for normality (Shapiro–Wilk test) and homogeneity of variances (F -test) and log transformed when required to meet the assumptions of parametric testing prior to analysis. All linear models or linear mixed models were performed with packages lme4, car and multcomp.

Oxygen consumption at winter emergence

At winter emergence, we compared \dot{V}_{O_2} (and its allometric relationship to body mass $\dot{V}_{O_2} = bM_b^a$) between all individuals (males and females) from the oviparous and viviparous populations. We used a linear model on log-transformed data and performed analysis of covariance (with log body mass as a covariate) to test for differences between groups (sex and reproductive modes) and for interaction effects.

Changes in body mass and determinant of fecundity

We used a linear mixed model to analyse body mass change during reproduction. This analysis was conducted separately for each reproductive mode (considering all stages). Reproductive stage was treated as a fixed factor and female identity as a random factor to take into account the repeated measures on females. Degrees of freedom for the F -statistic were calculated using a Kenward–Roger correction, which is the most suitable for linear mixed models (Bolker et al., 2009). To compare fecundity between reproductive modes that had different masses, we used a linear model with reproductive mode as a fixed factor and body mass as a covariate (ANCOVA).

Changes in oxygen consumption during reproduction

We used a linear mixed model to analyse metabolic change during reproduction. This analysis was first conducted separately for each reproductive mode (considering all stages). Reproductive stage was treated as a fixed factor and female identity as a random factor to take into account the repeated measures on females. Degrees of freedom for the F -statistic were calculated using a Kenward–Roger correction.

To compare oviparous and viviparous females we used the same statistical approach as described above (linear mixed model, female identity as a random factor), treating reproductive mode and stages as fixed factors but restricting the analysis to stages shared by the two groups (i.e. PR, VIT, OV, ER1 and PP; see Table 1). We also compared oxygen consumption in the two groups just before partition (i.e. stage ER1 in oviparous females and ER3 in viviparous ones) using a similar procedure.

Female body mass changes dramatically over reproduction, and we were not able to evaluate the respective masses of their metabolically active (maternal soma, developing embryos) versus metabolically inactive (yolk, eggshell, water incorporated at various rate in the fertilized ova) compartments at each reproductive stage. However, we used initial body mass (which was not significantly different from post-reproductive body mass) as a co-factor in order to account for size variation within and between reproductive modes.

We compared pre- and post-ovulation TIOC between reproductive modes using a linear mixed model treating initial body mass as a co-variate, reproductive mode (oviparous versus viviparous) and stage (pre-ovulation versus post-ovulation) as fixed factors, and female identity as a random factor. We also used a linear model to test for an influence of fecundity on TIOC. Fecundity was calculated as residuals from the regression of clutch size or litter size against female initial body mass. We performed an ANCOVA for each reproductive stage (i.e. pre-ovulation and post-ovulation) with reproductive mode as a fixed factor and mass-adjusted fecundity and initial body mass as co-variables.

Metabolic costs of pregnancy

Finally, we evaluated MCP for each reproductive mode. To do so, we calculated the linear regression of the relationship between either litter mass (viviparous females) or embryo mass (oviparous females) and \dot{V}_{O_2} ; and we then tested whether the MCP (intercept of the regression line) was significantly different from zero using a one-tailed t -test. All pairwise comparisons were conducted using Tukey's *post hoc* tests (package multcomp). All data are presented in the text and Table 1 as mean \pm s.d. In

Fig. 2, data are represented as means±s.e.m. All results were tested for statistical significance at the $P>0.05$ level.

Acknowledgements

We are grateful to Pascaline Legouar for providing help with the statistical analyses. We thank Mr Gilles Perron for providing authorization to catch lizards in The Parc Naturel National des Pyrénées. Lizards were captured in Paimpont with a permit from Préfecture d'Ille et Vilaine and in Louvie with a permit from Préfecture des Pyrénées Atlantiques.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

T.F. conceived and designed the experiment, captured the experimental animals, executed the experiments, analysed and interpreted the findings and drafted and revised part of the article. O.L. conceived and designed the experiment and drafted and revised part of the article. D.F.D. conceived and designed the experiment and drafted and revised part of the article. B.H. conceived and designed the experiment, captured the experimental animals, analysed and interpreted the findings and drafted and revised part of the article.

Funding

This study was supported by funds from the Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

References

- Adams, S. M., Hosie, M. J., Murphy, C. R. and Thompson, M. B. (2004). Changes in oviductal morphology of the skink, *Lampropholis guichenoti*, associated with egg production. *J. Morphol.* 262, 536-544.
- Andrews, R. M. and Mathies, T. (2000). Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. *Bioscience* 50, 227-238.
- Angilletta, M. J. and Sears, M. W. (2000). The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Funct. Ecol.* 14, 39-45.
- Bader, R. A., Bader, M. E. and Rose, D. J. (1959). The oxygen cost of breathing in dyspnoeic subjects as studied in normal pregnant women. *Clin. Sci.* 18, 223-235.
- Beaupre, S. J. and Duvall, D. (1998). Variation in oxygen consumption of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): implications for sexual size dimorphism. *J. Comp. Physiol. B* 168, 497-506.
- Beuchat, C. A. and Vleck, D. (1990). Metabolic consequences of viviparity in a lizard *Sceloporus jarrovi*. *Physiol. Zool.* 63, 555-571.
- Birchard, G. F., Black, C. P., Schueit, G. W. and Black, V. (1984). Influence of pregnancy on oxygen consumption, heart rates and hematology in the garter snake: implications for the cost of reproduction in live bearing reptiles. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A, 519-523.
- Blackburn, D. G. (1992). Convergent evolution of viviparity, matrotrophy and specialization for fetal nutrition in reptiles and other vertebrates. *Am. Zool.* 32, 313-321.
- Blackburn, D. G. (1995). Saltationist and punctuated equilibrium models for the evolution of viviparity and placentation. *J. Theor. Biol.* 174, 199-216.
- Blackburn, D. G. (2006). Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs* 20, 131-146.
- Blackburn, D. G. (2014). Evolution of vertebrate viviparity and specializations for fetal nutrition: a quantitative and qualitative analysis. *J. Morphol.* [Epub ahead of print] doi: 10.1002/jmor.20272.
- Bleu, J., Massot, M., Haussy, C. and Meylan, S. (2012). Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard. *Proc. R. Soc. B* 279, 489-498.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H. and White, J.-S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 24, 127-135.
- Braña, F., Bea, A. and Arrayago, M. J. (1991). Egg retention in lacertid lizards: relationships with reproductive ecology and the evolution of viviparity. *Herpetologica* 47, 218-226.
- Clark, H. and Sisken, B. F. (1956). Nitrogenous excretion by embryos of the viviparous snake *Thamnophis s. sirtalis*. *J. Exp. Biol.* 33, 384-393.
- Cragg, P. A. (1978). Oxygen consumption in the lizard genus *Lacerta* in relation to diel variation, maximum activity and body weight. *J. Exp. Biol.* 77, 33-56.
- Crespi, B. and Semeniuk, C. (2004). Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate reproductive mode. *Am. Nat.* 163, 635-653.
- Demarco, V. (1993). Metabolic rates of female viviparous lizards (*Sceloporus jarrovi*) throughout the reproductive cycle: do pregnant lizards adhere to standard allometry? *Physiol. Zool.* 66, 166-180.
- Demarco, V. and Guillette, L. J. (1992). Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovi*). *J. Exp. Zool.* 262, 383-390.
- Dufaure, J. P. and Hubert, J. (1961). Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Arch. Anat. Microscop. Exp.* 50, 309-328.
- Dupoué, A. and Lourdaux, O. (2014). Relative reproductive effort drives metabolic changes and maternal emaciation during pregnancy in a viviparous snake. *J. Zool. (Lond.)*
- Gavaud, G. (1983). Obligatory hibernation for completion of vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara*. *J. Exp. Zool.* 225, 397-405.
- Ghielmi, S., Heulin, B., Surget-Groba, Y. and Guillaume, C. P. (2001). Identification de populations ovipares de *Lacerta (Zootoca) vivipara* en Italie. *Bull. Soc. Herp. Fr.* 98, 19-29.
- Gilman, C. A. and Wolf, B. O. (2007). Use of portable ultrasonography as a non-destructive method for estimating reproductive effort in lizards. *J. Exp. Biol.* 210, 1859-1867.
- Grigg, G. C. and Harlow, P. (1981). A fetal-maternal shift of blood oxygen affinity in an Australian viviparous lizard, *Sphenomorphus quoyii* (Reptilia, Scincidae). *J. Comp. Physiol.* 142, 495-499.
- Guillette, L. J. (1982). Effects of gravidity on the metabolism of the reproductively bimodal species *Sceloporus aeneus*. *J. Exp. Zool.* 223, 33-36.
- Heulin, B. (1990). Etude comparative de la membrane coquillière chez les souches ovipares et vivipares de *Lacerta vivipara*. *Can. J. Zool.* 68, 1015-1019.
- Heulin, B., Osenegg, K. and Lebouvier, M. (1991). Timing of embryonic development and birth dates in oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara*: testing the predictions of an evolutionary hypothesis. *Acta Oecologica* 12, 517-528.
- Heulin, B., Guillaume, C. P., Bea, A. and Arrayago, M. J. (1993). Interprétation biogéographique de la bimodalité de reproduction du lézard *Lacerta vivipara*: un modèle pour l'étude de l'évolution de la viviparité. *Biogeographica* 69, 1-11.
- Heulin, B., Osenegg, K. and Michel, D. (1994). Survie et incubation des oeufs dans deux populations ovipares de *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia* 15, 199-219.
- Heulin, B., Osenegg, K. and Michel, D. (1997). Demography of a bimodal reproductive species of lizard (*Lacerta vivipara*): survival and density characteristics of oviparous populations. *Herpetologica* 53, 432-444.
- 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. *J. Morphol.* 252, 255-262.
- Heulin, B., Stewart, J. R., Surget-Groba, Y., Bellaud, P., Jouan, F., Lancien, G. and Deunff, J. (2005). Development of the uterine shell glands during the prevulatory and early gestation periods in oviparous and viviparous *Lacerta vivipara*. *J. Morphol.* 266, 80-93.
- Hoversland, A. S., Metcalfe, J. and Parer, J. T. (1974). Adjustments in maternal blood gases, acid-base balance, and oxygen consumption in the pregnant pygmy goat. *Biol. Reprod.* 10, 589-595.
- Hytten, F. and Leitch, I. (1971). *The Physiology of Human Pregnancy*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Science.
- Le Galliard, J. F., Le Bris, M. and Clobert, J. (2003). Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Funct. Ecol.* 17, 877-885.
- Lorioux, S., Vaugoyeau, M., Denardo, D. F., Clobert, J., Guillon, M. and Lourdaux, O. (2013a). Stage dependence of phenotypological and phenological maternal effects: insight into squamate reptile reproductive strategies. *Am. Nat.* 182, 223-233.
- Lorioux, S., Lisse, H. and Lourdaux, O. (2013b). Dedicated mothers: predation risk and physical burden do not alter thermoregulatory behaviour of pregnant vipers. *Anim. Behav.* 86, 401-408.
- Morafka, D. J., Spangenberg, E. K. and Lance, V. A. (2000). Neonatology of Reptiles. *Herpetological Monographs* 14, 353-370.
- Murphy, B. F., Parker, S. L., Murphy, C. R. and Thompson, M. B. (2010). Angiogenesis of the uterus and chorioallantois in the eastern water skink *Eulamprus quoyii*. *J. Exp. Biol.* 213, 3340-3347.
- Nilsson, J. and Raberg, L. (2001). The resting metabolic cost of egg laying and nestling feeding in great tits. *Oecologia* 128, 187-192.
- Panigel, M. (1956). Contribution à l'étude de l'ovoviviparité chez les reptiles: gestation et parturition chez le lézard vivipare *Zootoca vivipara*. *Ann. Sci. Nat. Zool.* 18, 569-668.
- Parker, S. L., Manconi, F., Murphy, C. R. and Thompson, M. B. (2010). Uterine and placental angiogenesis in the Australian skinks, *Ctenotus taeniolatus* and *Saiphos equalis*. *Anat. Rec.* 293, 829-838.
- Pernoll, M. L., Metcalfe, J., Kovach, P. A., Wachtel, R. and Dunham, M. J. (1975). Ventilation during rest and exercise in pregnancy and postpartum. *Respir. Physiol.* 25, 295-310.
- Qualls, C. P. and Shine, R. (1998). Costs of reproduction in conspecific oviparous and viviparous lizards, *Lerista bougainvillii*. *Oikos* 82, 539-552.
- Qualls, C. P., Shine, R., Donnellan, S. and Hutchison, M. (1995). The evolution of viviparity in the Australian scincid lizard *Lerista bougainvillii*. *J. Zool. (Lond.)* 237, 13-26.
- Robert, K. A. and Thompson, M. B. (2000). Energy consumption by embryos of a viviparous lizard, *Eulamprus tympanum*, during development. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A, 481-486.
- Rodríguez-Díaz, T., González, F., Ji, X. and Braña, F. (2010). Effects of incubation temperature on hatching phenotypes in an oviparous lizard with prolonged egg retention: are the two main hypotheses on the evolution of viviparity compatible? *Zoology* 113, 33-38.
- 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.
- Shine, R. (1983). Reptilian reproductive modes: the oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica* 39, 1-8.
- Shine, R. (1985). The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In *Biology of the Reptilia*, Vol. 15 (ed. C. Gans and F. Billet), pp. 605-694. New York, NY: Wiley Press.
- Shine, R. (1995). A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *Am. Nat.* 145, 809-823.
- Shine, R. and Schwarzkopf, L. (1992). The evolution of reproductive effort in lizards and snakes. *Evolution* 46, 62-75.

- Smith, H. M. (1975). Grist for the mills of herpetophiles in Mexico. *Bull. Md. Herp. Soc.* 11, 40-44.
- Smith, S. and Shine, R. (1997). Intraspecific variation in reproductive mode within the scincid lizard *Saiphos equalis*. *Aust. J. Zool.* 45, 435-445.
- Stewart, J. R. (2013). Fetal nutrition in lecithotrophic squamate reptiles: toward a comprehensive model for evolution of viviparity and placentation. *J. Morphol.* 274, 824-843.
- Stewart, J. R. and Thompson, M. B. (2000). Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A, 411-431.
- Stewart, J. R., Heulin, B. and Surget-Groba, Y. (2004). Extraembryonic membrane development in a reproductively bimodal lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Zoology* 107, 289-314.
- Stewart, J. R., Ecaj, T. W. and Heulin, B. (2009). Calcium provision to oviparous and viviparous embryos of the reproductively bimodal lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *J. Exp. Biol.* 212, 2520-2524.
- Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C. P., Thorpe, R. S., Kupriyanova, L., Vogrin, N., Maslak, R., Mazzotti, S., Venczel, M., Ghira, I. et al. (2001). Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 449-459.
- Van Dyke, J. U. and Beaupre, S. J. (2011). Bioenergetic components of reproductive effort in viviparous snakes: costs of vitellogenesis exceed costs of pregnancy. *Comp. Biochem. Physiol.* 160A, 504-515.
- Van Dyke, J. U., Brandley, M. C. and Thompson, M. B. (2014). The evolution of viviparity: molecular and genomic data from squamate reptiles advance understanding of live birth in amniotes. *Reproduction* 147, R15-R26.
- Vézina, F. and Williams, T. D. (2002). Metabolic costs of egg production in the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 377-385.
- Xavier, F. and Gavaud, J. (1986). Oviparity-viviparity continuum in reptiles; physiological characteristics and relation with environment. In *Endocrine Regulation as Adaptive Mechanisms to the Environment* (ed. I. Assenmacher and J. Boissin). pp 79-93. Paris: CNRS Press.
- Yue, F., Tang, X. L., Zhang, D. J., Yan, X. F., Xin, Y. and Chen, Q. (2012). Body temperature and standard metabolic rate of the female viviparous lizard *Eremias multicellata* during reproduction. *Can. J. Zool.* 90, 79-84.

TRADUCTION FRANÇAISE DU RESUME DE L'ARTICLE 2

L'importance des besoins en oxygène durant la croissance embryonnaire ainsi que les contraintes en oxygène ont été largement étudiées, notamment dans l'environnement aquatique, mais également chez les espèces terrestres pondant dans des sites de ponte où les échanges gazeux sont limités. La rétention prolongée des œufs a été observée chez de nombreux squamates ovipares (lézards et serpents). Par conséquent les contraintes en oxygène pour les embryons sont supposées élevées chez ces espèces. Il existe des variations intra-spécifiques importantes du degré de rétention entre et au sein des populations, mais les causes de ces variations restent cependant peu étudiées. Nous proposons ici que l'effort reproducteur puisse être une des causes de la limitation de la durée de rétention des œufs du fait d'une possible compétition pour l'oxygène entre les embryons en développement. Ainsi nous prédisons que le développement des embryons à la ponte devrait être corrélé négativement à la fécondité.

Le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) fait partie des rares espèces à présenter des variations du mode reproducteur entre populations allopatriques. Au moment de la ponte, les embryons de la forme ovipares atteignent les stades 30 à 35 du développement embryonnaire. Cette variation importante nous a permis d'étudier ses causes, et notamment sa relation à la fécondité relative. Nos résultats valident la prédiction d'une corrélation négative entre stade de développement à la ponte et effort reproducteur. Nous avons également pu apporter des informations quantitatives sur l'intensité métabolique (consommation d'oxygène) à différents stades du développement (ponte, mi-incubation, fin d'incubation et juste après éclosion). Cette étude nous a permis de montrer que le métabolisme absolu est corrélé au poids et varie au cours du développement avec un pic en fin d'incubation. Nos résultats suggèrent l'existence d'une compétition pour l'oxygène entre les embryons lors de la période de rétention des œufs (*i.e.* gravidité) qui pourrait influencer sur le stade de développement à la ponte, même si les besoins en oxygène sont réduits durant cette période.

Article 2 - Running head: Embryonic retention and metabolic changes in a lizard.

Determinants of embryonic stages at oviposition and oxygen consumption during incubation in a lizard with prolonged egg retention (*Zootoca vivipara*)

Thomas Foucart¹, Benoit Heulin¹, Olivier Lourdais^{2,3}

¹ Station Biologique de Paimpont. UMR 6553 CNRS, F-35380, Paimpont, France

² Centre d'étude biologique de Chizé CNRS, F-79360, Villiers en Bois, France

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

* Correspondence:

Thomas Foucart,

Station Biologique de Paimpont.

UMR 6553 CNRS, F-35380, Paimpont, France

Phone: + 33 (0)2.99.61.81.70.19

Fax: + 33 (0)2.99.61.81.89

E-mail : thomas.foucart@gmail.com

Table 1

Figures: 4

For consideration in: Journal of comparative Physiology B

Abstract

Oxygen requirements are important during embryonic growth and oxygen limitations have been widely documented notably in aquatic environment but also in terrestrial species nesting in environment with limited gas exchanges. Prolonged egg retention has been documented in many oviparous squamates (lizards and snakes) and oxygen constraints within maternal body are also supposedly elevated in such species. Significant intra-specific variation in the degree retention is known to occur among and within population and the determinant of such variation remains overlooked. We posit that reproductive effort should limit the degree retention because a competition for oxygen may occur among developing embryos. Therefore we expect that developmental stages at oviposition should be negatively related to fecundity. The common lizard (*Z vivipara*) belong the few species that exhibit inter-population variation in reproductive mode. Oviparous females lay eggs with embryos between stages 30 and 35 and provide an opportunity to study the determinant this variation. Our results support for a negative relation between embryonic stage at oviposition and reproductive effort. We also provide quantitative information on oxygen consumption at relevant stages of development (oviposition, mid and late incubation and after hatching). We found that absolute metabolic rate was closely related to embryo mass or development stage and peaked at late incubation. Our results suggest that competition for oxygen may exist among developing embryos (*i.e.* during gravidity) and influence stage at oviposition, even if oxygen requirements are relatively small at that period.

Key words: embryo, oxygen, development, physiological trade off

Introduction

Early life history stages are particularly sensitive to environmental variations (Lorioux *et al.*, 2012) that can have immediate deleterious effects but also long-lasting consequences on individual phenotype and fitness (Elphick and Shine, 1998; Lindstrom, 1999; Shine, 2004a). It is therefore particularly important to clarify environmental influences on embryonic development and the possible adaptive responses at the embryonic or parental levels (Andrews *et al.*, 1999; Angilletta *et al.* 2004; Shine, 2004a). Significant physiological constraints can result from exogenous influences (*e.g.* fluctuation in abiotic parameters such as temperature) (Deeming and Ferguson, 1991; Shine, 2004a), from endogenous embryonic demands (Crespi and Semeniuk, 2004) or from parental tactic (Jones and Reynolds, 1999a) and result in significant tradeoffs (Ricklefs and Wikelski, 2002; Stearns, 1989).

Changes in oxygen consumption during embryonic development have been intensely studied (Thompson, 1989; Vleck and Hoyt, 1991) and it has been shown that oxygen demand rise over development with an exponential increase that is closely linked to variation in embryonic mass. Oxygen requirements are massive during the period of embryonic growth (Andrews, 2004). Specific adaptations exist notably to support for gas exchanges (Beuchat and Vleck, 1990). In terrestrial environment, changes in eggshell thickness for instance is likely adaptive to facilitate increasing embryonic demand (Stahlschmidt *et al.*, 2010). Specific parental care to the eggs may exist to optimize oxygen exposure (Jones and Reynolds, 1999b). Such adjustments also exist in viviparous species since the mother undergo specific physiological changes (modified blood oxygen affinity, increase ventilation and heart rate) notably at late gestational stages to meet the oxygen requirement (Birchard *et al.*, 1984; Keller-Wood *et al.*, 2012). Another adjustment to a new, more oxidative environment may also occur at birth (*i.e.* at the onset of lung respiration) in terrestrial vertebrates (*e.g.* Pearson *et al.*, 1999; Singer and Muehlfeld, 2007). All together these observations underline the

interest of thoroughly studying the changes in oxygen consumption between contrasted period of development (embryonic organogenesis, fetal growth, hatching or parturition).

Oxygen availability may constitute a significant constraint to support embryonic development (Liang *et al.*, 2015; Yeong-choy, 1993). Variation of oxygen availability can have strong consequences on embryo development and ultimately reproductive success (Andrews, 2002). Several studies have demonstrated that oxygen limitation exist in aquatic environment which is often hypoxic (Mills and Barnhart, 1999) and pose specific constraint (low oxygen diffusion). Such limitation can also occur in terrestrial species when nesting occurs in nesting environment with limited gas exchanges (Tate *et al.*, 2015) or when specific parental care (brooding) limit oxygen availability to the embryos (Stahlschmidt and Denardo, 2009). Interestingly, oxygen constraints are also likely to exist in viviparous species or in oviparous species with extended embryonic retention depending on the vascularity and facility of gas exchanges within maternal reproductive tracts (Andrew and Mathies, 2000; Mathies and Andrews, 1996).

Many oviparous squamates (lizards and snakes) retain their embryos in the oviduct for one third to half of the total development period (see Andrews and Mathies, 2000; Shine, 1983) and the benefit of prolonged retention seems related to a better control of developmental condition (Lorioux *et al.*, 2012; Shine, 2004b, 1995). Previous works suggest that oviposition occurs when embryonic oxygen requirements are rising and are no longer supported by passive diffusion processes through the shell (Andrews, 2002; Parker *et al.*, 2004). Therefore a proximate trade off may exist between shell structure, oxygen requirements and the transition to viviparity (Mathies and Andrews, 1996). It is noteworthy that significant variations in embryonic stages at oviposition exist within a given species (Calderon-Espinosa *et al.*, 2006; Rodriguez-Diaz and Brana, 2012, 2011) and the determinant of such variation remains unclear. We expect that more prolonged embryonic retention should be associated

with higher oxygen requirements. Beside, since oxygen is supposedly limiting within maternal cavity a competition may occur among developing embryos as demonstrated in aquatic taxa (Lardies and Fernandez, 2002; Lee and Strathmann, 1998; Seymour, 1999). We expect higher oxygen constraints and possibly competition among embryos in relatively large clutches when compared to smaller ones. However, the possible interaction between reproductive effort and retention remains overlooked to date.

We studied the oviparous form of the bimodal *L vivipara* that show substantial embryonic retention (up to stages 31 to 35, Rodriguez-Diaz and Brana, 2012). Our aim was to:

- (i) Describe variation in embryonic stage at oviposition and test for a possible trade of with reproductive effort
- (ii) Measure metabolic rate at different developmental stages: oviposition which corresponds to the transition between the organogenesis and embryonic growth, mid and late incubation (predominantly corresponding to the exponential growth phase), and post hatching.

Material and Methods

Study species and husbandry

Zootoca vivipara (Jaquin 1787) is a small (45-75mm snout-vent length), ground dwelling Eurasian lacertid that generally live in moist habitats. This reproductively bimodal species presents distinct oviparous populations in southern France-northern Spain and in northern Italy-Slovenia. Lizards were captured at Louvie, SW France, Pyrenean Mountains (43°06'N, 0°23'W) and kept at the laboratory to the end of next summer. Ecology and demography of this population has been previously described elsewhere (Heulin *et al.*, 1997, 1994). Lizards were reared in plastic terrarium (30x20x20 cm). Each terrarium was equipped with a shelter, dishes of food and water, and a 40W bulb that provided heat for 6 h/day. Large windows provided natural light for about 12h a day.

Lizards were overwintered in the lab and reproduction was obtained using a standard protocol (see Foucart *et al.*, 2014). During the third week after hibernation, females were allowed to copulate with males until at least one successful mating (between 15 and 60 minutes). Floor under the shelter was lined with damp sponge to permit egg laying and prevent clutches from drying. We checked each female twice a day so the majority of the eggs were collected within the few hours after laying.

Influence of relative clutch size on embryonic retention

In 2015 a total of 66 eggs were obtained from 16 females. The number of eggs per clutch was on average 4.95 ± 1.18 (range 3 to 7 eggs). All the eggs were sacrificed at oviposition to assess embryonic stage as well as embryonic fresh and dry mass (± 1 mg). Developmental stages were determined using available development table (Dufaure and Hubert, 1961). Several methods have been described to assess reproductive effort while controlling for allometric influences (Bonnet I, 2003). In the present study we used residuals of the relationship between litter size and mother SVL (*i.e.* residual litter size - RLS) since this relation was significant ($F_{1,14}=6,23$; $P=0,026$, $r^2=0,26$).

Variation in oxygen consumption over incubation

In 2013 a total of 58 eggs were obtained from 15 females. The number of eggs per clutch was on average 3.59 ± 1.01 (range 2 to 6 eggs). Each clutch was incubated following standard incubation conditions (Heulin *et al.* 2002) at constant 30°C in a dark chamber (Liebherr, Dortmund, Germany). Incubation containers were checked daily for humidity, mortality and hatchling.

Oxygen consumption rate ($\dot{V}O_2$) was assessed at four periods. A first measure (“oviposition”) was carried out just after laying (day 1). A second measure (“mid incubation”)

was carried out at day 7 which corresponds to half incubation time (Rodríguez Díaz *et al.*, 2010). A third measure (“late incubation”) was carried out after 13 days of incubation and corresponding to last incubation days at 30°C incubation (Rodríguez Díaz *et al.*, 2010). A final measure (“neonates”) was carried out one day after hatching considering. One measure was collected for all the individual of the same clutch. Incubation duration ranged between 12 and 17 days so the delay between the late incubation and neonate measures was on average 2.72 ± 1.19 days.

After each $\dot{V}O_2$ measurement one egg was sacrificed in order to assess developmental stage as well as the fresh and dry mass of the embryos, the yolk and the shell. Embryo development is well synchronized within a clutch (Andrews, 2004) and embryonic mass obtained for one egg provided a reference for the clutch for which total oxygen consumption was collected (see below). For small clutches (number of eggs <4) all four stages were not available and we only carried out measurements at oviposition and late incubation (for clutches of 2 eggs) or at oviposition, mid and late incubation (for clutches of 3 eggs). Sample sizes were as follow: oviposition=21 clutches, mid incubation= 12 clutches, late incubation 17 clutches and neonates = 8 clutches. We also collected neonates mass shortly after hatching (± 1 mg).

We measured $\dot{V}O_2$ using a closed system respirometry (see Foucart *et al.*, 2014). At each incubation stage, we measured $\dot{V}O_2$ of clutch. After birth, metabolic rate was measured collectively for all neonates of a given clutch on average 1.78 ± 0.75 day after hatching. All trials were carried out at 30 ± 0.5 °C. Eggs inside their incubation container or neonates were placed in a hermetic chamber (1000 ml). Before the beginning of trials a baseline air sample (two syringes of 140 ml) was collected. Then the test chamber was carefully sealed. Trials duration was adjusted to incubation stages in order to obtain a minimal oxygen suppression of 0.04% (early incubation 24h, mid incubation 10 h, late incubation 7 h) and to number of

individuals for neonates (4 to 15 h for 4 to 1 neonate). After trials we collected a final air sample using two 140 mL syringes connected to one-way stopcock. Oxygen proportion (% O₂) of the samples was determined using an O₂ analyzer (FOXBOX, Sable System, Las Vegas, USA). Using an infusion pump (KDS 210, KD Scientific Inc, Holliston, USA), samples were sent at a constant flow (60 ml.min⁻¹) through a column of Drierite and then to the O₂ analyzer, which was calibrated before each trial using outdoor air. Oxygen consumption rate ($\dot{V}O_2$ in ml.min⁻¹) was calculated as: (final % O₂ – initial % O₂) x exact chamber volume / trial duration. Exact volume chamber was calculated as chamber volume – incubation container volume (sand and water) for eggs. Statistical analysis were conducted on individual $\dot{V}O_2$ simply derived by dividing absolute (clutch/litter) oxygen consumption by the number of egg or neonates in the trial.

Statistical analyses

All analyses were performed with R software (R Development Core Team, version 3.1.1) with packages lme4, car, lsmeans and multcompView. The data were tested for normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (F test) and log transformed when required to meet the assumptions of parametric testing prior to analysis. Changes in egg traits and $\dot{V}O_2$ were analyzed using linear mixed model with mother identity as random factor. Mass specific metabolism was first analysed simply using the ratio between individual $\dot{V}O_2$ and embryonic mass. We also used a general linear model treating individual log ($\dot{V}O_2$) as the dependent variable, embryonic stage as the fixed factor and log (embryonic mass) as linear covariate to examine allometric variation. All pairwise comparison was made by post-hoc Tuckey HSD test. All data are presented as mean ± SD. All results were tested for statistical significance at the p < 0.05 level. Denominator degrees of freedom for the F-statistic in mixed models were calculated using a Kenward–Roger correction (Kenward and Roger 1997).

Results

1) Determinants of embryonic stages at oviposition

Developmental stages ranged from 31 to 33. We found significant variation in embryonic developmental stages at oviposition among females ($F_{15,50}=11.75$, $P<0.001$). We found a negative relationship between relative clutch size and developmental stage at oviposition ($F_{1,34.96}=34.96$, $P<0.001$, $r^2=0.54$). This relationship, obtained for the developmental stages of individual eggs, was also significant when considering the mean developmental stage of each clutch ($F_{1,14}=39.54$, $P<0.001$, $r^2=0.72$, see Figure 1).

We also examined the relation between relative clutch size and embryonic stage at oviposition in the second group of females for which one egg was examined 24h after oviposition. The negative relationship between fecundity and embryonic stage was also supported ($F_{1,16}=10.65$, $P=0.005$, $r^2=0.39$).

2) Changes in embryonic and eggs traits over incubation

Examination of the embryos revealed that developmental stages ranged from 33 to 35 at early incubation (N=21), 37 to 38 at mid incubation (N=12) and 40 for late incubation (N=17). A dramatic increase of embryonic dry mass (ANOVA, $F_{2,15.64}=403.06$, $P<0.001$; Table 1) or fresh mass (ANOVA, $F_{3,42.64}=721.37$, $P<0.001$, all HSD Tuckey post-hoc <0.001) was detected during incubation. A similar pattern was observed for yolk (ANOVA, $F_{2,32.40}=70.32$, $P<0.001$) while shell mass remain stable over time (ANOVA, $F_{2,36.94}=0.32$, $P=0.73$) and there was no significant difference, (HSD Tuckey $P=0.1$) in the fresh mass of neonates (215.63 ± 47.47 mg) and of late incubation embryos (179.51 ± 28.38 mg).

3) Changes in egg oxygen consumption over incubation

A clear absolute $\dot{V}O_2$ increase was detected over incubation period (ANOVA, $F_{3,42.89}=293.86$, $P<.001$, HSD Tuckey post-hoc test all p-value <0.001 , Figure 2). We also found that $\dot{V}O_2$ decrease significantly after hatching (HSD Tuckey $P=0.0163$). Mass specific $\dot{V}O_2$ (ratio) varied along the four studied stages ($F_{3,46.60}=71.11$, $P<0.001$) with maximal values collected at early incubation (Figure 3).

We found that $\dot{V}O_2$ and embryonic mass (log transformed) were closely related for at each stages (early incubation $R^2=0.24$, $P=0.01$; mid incubation $R^2=0.46$, $P=0.009$; late incubation $R^2=0.68$, $P<0.001$; neonate $R^2=0.88$, $P<0.001$, Figure 4). Using a GLM we found a significant influence of stage and embryonic mass on oxygen consumption (respectively $F_{3,45.08}=11.83$, $P<0.001$ and $F_{1,43.33}=55.49$, $P<0.001$) as well as a marginally significant interaction term ($F_{3,45.93}=2.43$, $P=0.08$). A contrast analysis revealed that the slope of the relation was significantly in the early incubation stage when compared to others (early: 0.43 ± 0.15 ; mid-late: 0.83 ± 0.05 ; neonate: 1.05 ± 0.19 ; ANCOVA, $F_{2,49.29}=3.62$, $P=0.03$). We also found a lower intercept in neonate compare to mid and late incubation measures (ANCOVA, $F_{2,23.79}=53.44$, $P<0.001$). No difference of intercept was found between mid and late incubation (HSD-tuckey, $P=0.35$).

Discussion

Embryonic oxygen requirements may be constrained notably when development occurs in a limiting environments (*i.e.* hypoxic or with low diffusion capacities - Lee and Strathmann, 1998). While the transition to viviparity occurred repeatedly among squamates, the massive rise in oxygen demand may impose a significant physiological limit influencing oviposition stages (Andrews, 2002). Our study in the oviparous form of the bimodal *Zootoca vivipara* provided significant insight.

We detected significant variation in embryonic stages at oviposition among females. In support with our prediction we found that fecundity and reproductive effort influenced mean embryonic stages at oviposition. This relation was also found in the second group of females for which one egg was examined at the end of the first $\dot{V}O_2$ measurement (*i.e.* 24h after oviposition). Therefore, females with larger reproductive effort lay eggs with less advanced embryos. Oxygen solubility and diffusion are much lower in water than in the air and significant limitation are expected in liquid environment (Lee and Strathmann, 1998). Previous work suggests that oxygen constraints exist in terrestrial vertebrates, notably in oviparous species for which a significant fraction of embryonic development occurs within maternal reproductive tracts (Parker *et al.*, 2004). Our results suggest that clutch size also impose significant constraints presumably by inducing a competition for oxygen among siblings (Seymour, 1999) and affecting the degree of embryonic retention. Therefore a physiological conflict may exist between embryonic retention, oxygen requirements and reproductive effort. A previous comparative study in Sceloporine lizards found no relation between relative clutch mass and experimentally induced egg retention (Calderon-Espinosa *et al.*, 2006).

Patterns of oxygen consumption over incubation have been well studied in reptiles revealing dramatic increase over time in relation with exponential embryonic demand required for active tissue synthesis (Thompson, 1989). In most oviparous squamates, oviposition occurs after organogenesis at the beginning of exponential growth. Our results in the common lizard are in accordance with previous findings and clearly reveal an increase in egg metabolic rate related to changes in embryonic mass (Andrews and Mathies, 2000; Andrews, 2002; Thompson, 1989). Mass specific metabolic rate (derived from the ratio $\dot{V}O_2/\text{mass}$) suggest important variation over time, with a higher value at the oviposition stage

compared to mid and late incubation stages. Previous studies have also used ratio to examine changes in metabolic rate and suggest important variation over time (Clark, 1953; Vladimirova *et al.*, 2005). When considering each period individually, we found that metabolic rate was closely related to embryonic mass (Figure 4). Our results suggest that variation in mass but also developmental stage influence oxygen requirements at oviposition. Previous study suggests that oviposition time may be driven by oxygen constraints preventing further embryonic development within maternal body (Mathies and Andrews, 1996). Our results do not permit to test specifically for such constraint but clearly advocate that oxygen requirements are significant at oviposition stages and closely related to the degree of retention.

Our analysis of covariance revealed significant changes in the relation between oxygen consumption and embryonic mass over time as demonstrated in viviparous species (Demarco, 1993). The slope of the relation was lower at oviposition compared to mid and late incubation periods. We can hypothesize that the mass-dependence of metabolic demands is linked to the transition between contrasted periods of development (organogenesis to early growth). Beside, the embryos experience drastic changes in their environment with a shift at oviposition from a liquid environment, with low oxygen diffusion, to atmospheric air (Parker *et al.*, 2004). The particular pattern observed at oviposition may represent an adjustment to a new, more oxidative environment as reported at birth in mammals (Pearson *et al.*, 1999; Singer and Muehlfeld, 2007). In turn, the slope for oxygen consumption was equivalent for mid and late incubation measures which probably reflect a period of continuous embryonic growth (Andrews, 2004).

We found that birth was associated to a clear decrease of mass specific $\dot{V}O_2$. Several factors may well explain this pattern with possibly the mobilization of yolk reserves and a decrease

or a stop in growth (Thompson, 1989). Here again, a shift in respiratory processes, from chorio-allantoic diffusion to lung exchanges may also explain this observation. The study species shows reproductive bimodality and we have previously compared maternal metabolic changes in the two forms and measured metabolic costs of pregnancy (MCP see Schultz et al., 2008; Van Dyke and Beaupre, 2011; Yue et al., 2012). It is worth noting that among studies that have previously investigated the metabolic cost of pregnancy, some of them (Birchard et al., 1984; Robert and Thompson, 2000) have used the metabolic rate of neonates to approximate embryo $\dot{V}O_2$ before parturition. However, this may be inappropriate since there may exist important changes in metabolic rate associated with parturition or hatching as documented here and see also (Demarco and Guillette, 1992).

Acknowledgment: We thank Mr. Gilles Perron for providing authorization to catch lizards in The Parc Naturel National des Pyrénées. Lizards were captured in Louvie with a permit from Préfecture des Pyrénées Atlantiques. The experimental protocol was approved (authorization #R-23012-BH-01) by the relevant ethics committee (Comité Rennais d’Ethique en matière d’Expérimentation Animale).

References

- Andrew, R.M., Mathies, T.** (2000). Natural history of reptilian development : constraints on the evolution of viviparity. *Bioscience*. **50** : 227–238.
- Andrews, R.M.** (2004). Patterns of embryonic development, in: Deeming, D.C. (Ed.), *Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 75–102.
- Andrews, R.M.** (2002). Low oxygen: A constraint on the evolution of viviparity in reptiles. *Physiological Biochemical Zoology*. **75** : 145–154.
- 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., Mathies, T., Qualls, C.P. and Qualls, F.J.** (1999). Rates of embryonic development of Sceloporus lizards: Do cold climates favor the evolution of rapid development? *Copeia*. 692–700.
- Angilletta, M.J., Oufiero, C.E., Sears, W.S. and Sears, M.W.** (2004). Thermal adaptation of maternal and embryonic phenotypes in a geographically widespread ectotherm. *Int. Congr. Ser.* 1275, 258–266. doi:10.1016/j.ics.2004.07.038
- Beuchat, C.A. and Vleck, D.** (1990). Metabolic consequences of viviparity on a lizard, *Sceloporus jarrovi*. *Physiological Zoology*. **63** : 555–570.
- Birchard, G., Black, C., Schuett, G. and Black, V.** (1984). Influence of pregnancy on oxygen consumption, heart rate and hematology in the grater snake implications for the cost of reproduction in live bearing reptiles. *Comparative Biochemistry Physiology*. **77A** : 519–523.
- Bonnet, X., Shine, R., Lourdais, O. and Naulleau, G.** (2003). Measures of reproductive allometry are sensitive to sampling bias. *Functional Ecology*. **17** : 39–49.
- Calderon-Espinosa, M.L., Andrews, R.M. and De la Cruz, F.R.M.** (2006). Evolution of egg retention in the Sceloporus spinosus group: Exploring the role of physiological, environmental, and phylogenetic factors. *Herpetological Monographs*. 147–158.
- Clark, H.** (1953). Metabolism of the black snake embryo, II. Respiratory Exchange. *Journal of Experimental Biology*. **30** : 502–505.
- Crespi, B. and Semeniuk, C.** (2004). Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate reproductive mode. *American Naturalist*. **163** : 635–653.
- Deeming, D.C. and Ferguson, M.W.J.** (1991). Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds, in: Deeming, D.C., Ferguson, M.W.J. (Eds.), *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 147–171.
- Demarco, V.** (1993). Metabolic rates of female viviparous lizards (*Sceloporus jarrovi*) throughout the reproductive cycle : do pregnant lizards adhere to standart allometry ? *Physiology Zoology*. **66** : 166–180.
- Demarco, V. and Guillette, L.J.** (1992). Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovii*). *Journal of Experimental Zoology*. **262** : 383–390.
- Dufaure, J.P. and Hubert, J.** (1961). Table de développement du lézard vivipare : *Lacerta vivipara*. *Archives Anatomie Microscopique Morphology Expérimentale*. 309–328.
- Elphick, M.J. and Shine, R.** (1998). Long term effects of incubation temperatures on the morphology and locomotor performance of hatchling lizards (*Bassiana duperreyi*, *Scincidae*). *Biological Journal of Linnean Society*. **63** : 429–447.
- Foucart, T., Lourdais, O., Denardo, D.F. and Heulin, B.** (2014). Influence of reproductive mode on metabolic costs of reproduction : insight from the bimodal lizard *Zootoca vivipara*. *Journal of Experimental Biology*. **33** : 4049–4056.
- Heulin, B., Osenegg, K. and Michel, D.** (1994). Survie et incubation des oeufs dans deux populations ovipares de *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia*. **15** : 199–219.
- Heulin, B., Osenegg-Leconte, K. and Michel, D.** (1997). Demography of a bimodal reproductive species of lizard (*Lacerta vivipara*): Survival and density characteristics of oviparous populations. *Herpetologica*. **53** : 432–444.

- Jones, J.C. and Reynolds, J.D.** (1999a). Oxygen and the trade-off between egg ventilation and brood protection in the common goby. *Behaviour*. **136** : 819–832.
- Jones, J.C. and Reynolds, J.D.** (1999b). Costs of egg ventilation for male common gobies breeding in conditions of low dissolved oxygen. *Animal Behaviour*. **57** : 181–188.
- Keller-Wood, M., Richards, E.M., Scheuer, D.A. and Wood, C.E.** (2012). Effect of Increased Cortisol on Heart Rate in Pregnant Ewes. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. **26**
- Lardies, M.A. and Fernandez, M.** (2002). Effect of oxygen availability in determining clutch size in *Acanthina monodon*. *Marine Ecological Progress Series*. **239** : 139–146.
- Lee, C.E. and Strathmann, R.R.** (1998). Scaling of gelatinous clutches: effects of siblings' competition for oxygen on clutch size and parental investment per offspring. *American Naturalist*. **151** : 293–310.
- Liang, L., Sun, B.-J., Ma, L. and Du, W.-G.** (2015). Oxygen-dependent heat tolerance and developmental plasticity in turtle embryos. *Journal of Comparative Physiology B*. **185** : 257–263.
- Lindstrom, J.** (1999). Early development and fitness in birds and mammals. *Trends of Ecology and Evolution*. **14** : 343–348.
- Lorioux, S., DeNardo, D.F., Gorelick, R. and Lourdais, O.** (2012). Maternal influences on early development: preferred temperature prior to oviposition hastens embryogenesis and enhances offspring traits in the Children's python, *Antaresia childreni*. *Journal of Experimental Biology*. **215** : 1346–1353.
- Mathies, T. and Andrews, R.M.** (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.
- Mills, N.E. and Barnhart, M.C.** (1999). Effects of hypoxia on embryonic development in two *Ambystoma* and two *Rana* species. *Physiological Biochemical Zoology*. **72** : 179–188.
- Parker, S.L., Andrews, R.M. and Mathies, T.** (2004). Embryonic responses to variation in oviductal oxygen in the lizard *Sceloporus undulatus* from New Jersey and South Carolina, USA. *Biological Journal of Linnean Society*. **83** : 289–299.
- Pearson, J.T., Noma, Y. and Tazawa, H.** (1999). Developmental patterns of heart rate in altricial avian embryos and hatchlings. *Journal of Experimental Biology*. **202** : 1545–1550.
- Ricklefs, R.E. and Wikelski, M.** (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends of Ecology and Evolution*. **17** : 462–468.
- Robert, K.A. and Thompson, M.B.** (2000). Energy consumption by embryos of a viviparous lizard, *Eulamprus tympanum*, during development. *Comparative Biochemical Physiology A*. **12** : 481–486.
- Rodriguez Diaz, T., Gonzalez, F., Ji, X. and Brana, 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.
- Rodriguez-Diaz, T. and Brana, F.** (2012). Altitudinal variation in egg retention and rates of embryonic development in oviparous *Zootoca vivipara* fits predictions from the cold-climate model on the evolution of viviparity. *Journal of Evolutionary Biology*. **25** : 1877–1887.
- Rodriguez-Diaz, T. and Brana, F.** (2011). Plasticity and limitations of extended egg retention in oviparous *Zootoca vivipara* (Reptilia: Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. **102** : 75–82.
- 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.
- Seymour, R.S.** (1999). Respiration of aquatic and terrestrial amphibian embryos. *American Zoologist*. **39** : 261–270.
- Shine, R.** (2004a). Adaptive consequences of developmental plasticity, in: *Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour*. pp. 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 Linnean Society*. **83** : 145–155.
- Shine, R.** (1995). A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *American Naturalist*. **145** : 809–823.
- Shine, R.** (1983). Reptilian reproductive modes - The oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica*. **39** : 1–8.

- Singer, D. and Muehlfeld, C.** (2007). Perinatal adaptation in mammals: The impact of metabolic rate. *Comparative Biochemistry*. **148** : 780–784.
- Stahlschmidt, Z.R. and Denardo, D.F.** (2009). Obligate costs of parental care to offspring: egg brooding-induced hypoxia creates smaller, slower and weaker python offspring. *Biological Journal of Linnean Society*. **98** : 414–421.
- Stahlschmidt, Z.R., Heulin, B. and DeNardo, D.F.** (2010). The Role of Python Eggshell Permeability Dynamics in a Respiration-Hydration Trade-Off. *Physiological Biochemical Zoology*. **83** : 576–586.
- Stearns, S.C.** (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology*. **3** : 259–268.
- Tate, K.B., Kohl, Z.F., Eme, J., Rhen, T. and Crossley II, D.A.** (2015). Critical Windows of Cardiovascular Susceptibility to Developmental Hypoxia in Common Snapping Turtle (*Chelydra serpentina*) Embryos. *Physiological Biochemical Zoology*. **88** : 103–115.
- Thompson, M.B.** (1989). Patterns of metabolism in embryonic reptiles. *Respiratory Physiology*. **76** : 243–256.
- Van Dyke, J.U. and Beaupre, S.J.** (2011). Bioenergetic components of reproductive effort in viviparous snakes: Costs of vitellogenesis exceed costs of pregnancy. *Comparative Biochemistry Physiology A*. **160** : 504–515.
- Vladimirova, I.G., Alekseeva, T.A. and Nechaeva, M.V.** (2005). Growth and oxygen consumption in embryonic and early postembryonic development of European pond turtle *Emys orbicularis* (Reptilia : Emydidae). *Biological Bulletin*. **32** : 172–178.
- Vleck, C. and Hoyt, D.** (1991). Metabolism and energetics of reptilian and avian embryos. pp. 285–306.
- Yeong-choy, K.** (1993). Physiological effects of hypoxia on metabolism and growth of turtle embryos. *Respiratory Physiology*. **92** : 127–138.
- Yue, F., Tang, X., Zhang, D.-J., Yan, X.-F., Xin, Y., Chen, Q.** (2012). Body temperature and standard metabolic rate of the female viviparous lizard *Eremia multiocellata* during reproduction. *Canadian Journal of Zoology*. **90** : 79–84.

Table 1. Changes in dry mass (mg) of the different egg component over incubation. Values are expressed mg as mean \pm SD.

Component	Stages		
	Early Incubation	Mid Incubation	Late Incubation
Embryo	1.96 \pm 0.79	10.84 \pm 1.96	38.92 \pm 6.70
Vitellus	44.10 \pm 10.53	38.19 \pm 10.55	8.52 \pm 3.47
Shell	8.50 \pm 2.93	8.81 \pm 2.90	8.00 \pm 2.55

Caption to figures:

Figure 1. Relation between reproductive effort and mean embryonic stage at oviposition. For each female (n=16) we averaged embryonic developmental stage of the clutch. Relative clutch size was derived from the residuals of the regression between clutch size and maternal size (see method section)

Figure 2. Evolution of individual VO_2 and mass over incubation and after hatching. Error bars represents standard deviation. Different letters represent significantly different value.

Figure 3. Evolution of mass specific VO_2 (VO_2 / embryonic mass) of the incubated eggs and of neonates. Different letters represent significantly different value.

Figure 4. Relationships between individual VO_2 and embryonic or neonate mass using log transformed data.

Figure 1

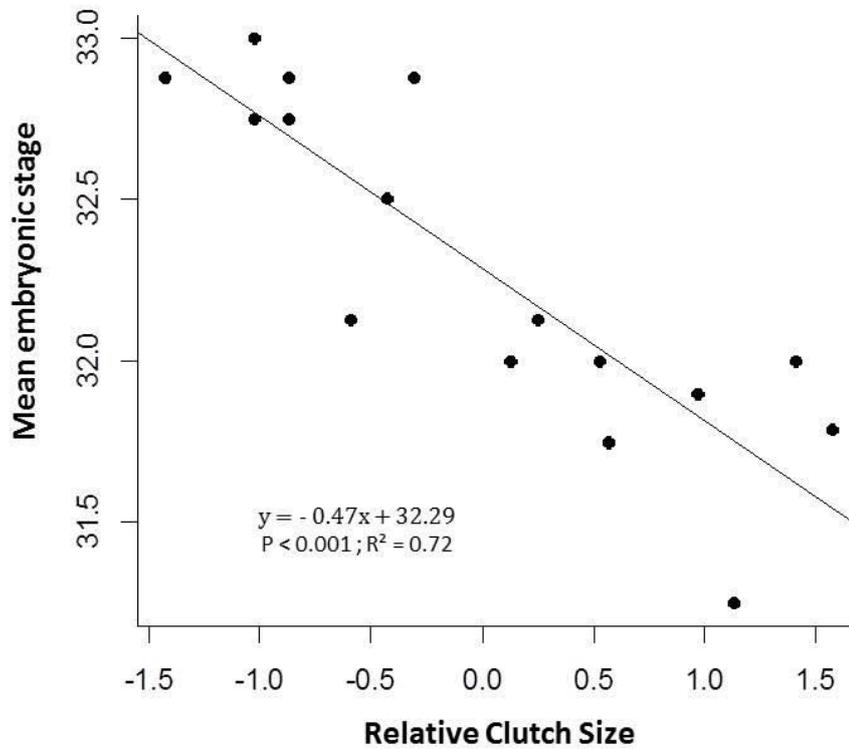


Figure 2

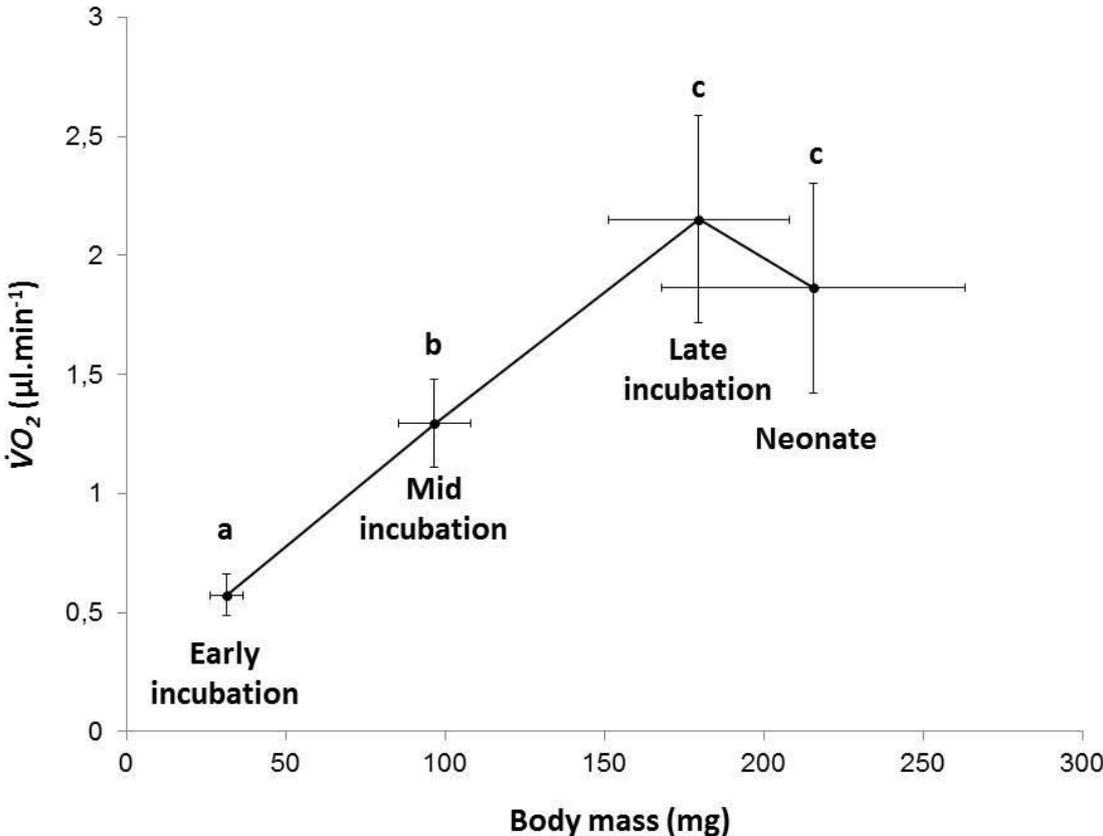


Figure 3

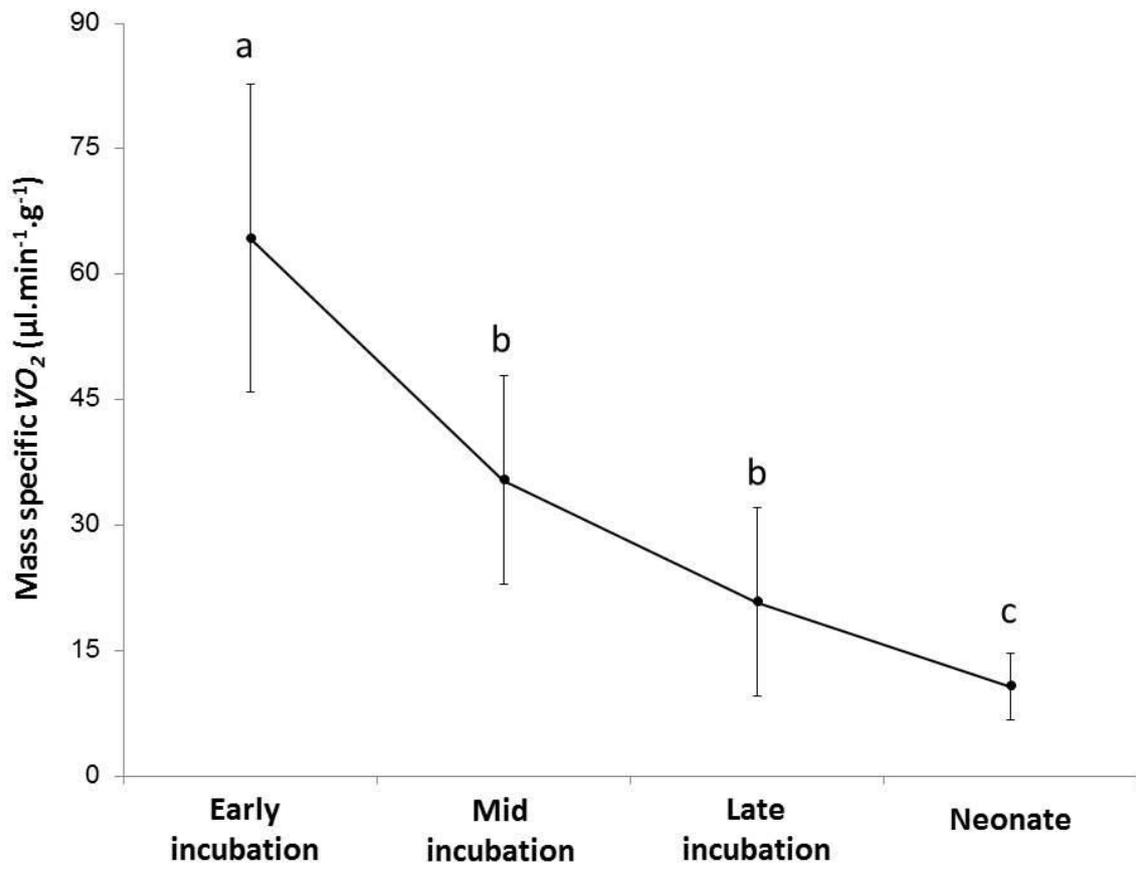
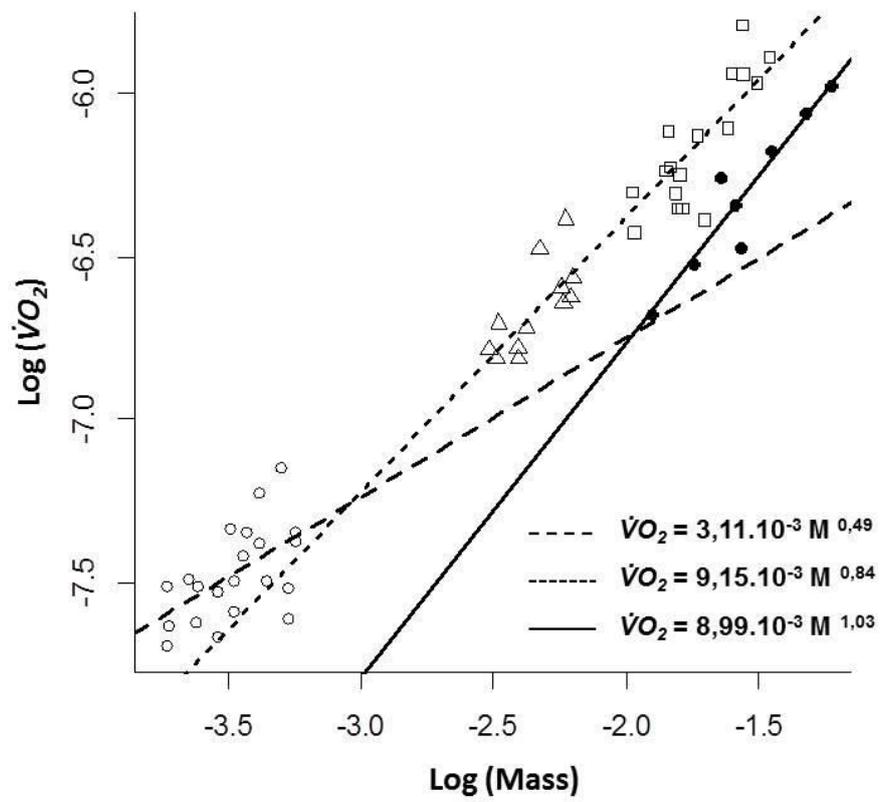


Figure 4



- CHAPITRE V –

MANIPULATION DES CYCLES THERMIQUES

Les conséquences de la rétention prolongée des œufs sur le développement embryonnaire et l'investissement maternel.

Sommaire du chapitre

<u>V-1) Article 3 – Maternal thermorégulation enhance reproductive phenology and offspring locomotion in an oviparous lizard with extended egg retention (<i>Zootoca vivipara</i>).....</u>	82
V-1.1) Traduction française du résumé de l'article 3	82
V-1.2) Manuscrit de l'article 3 en préparation	83
<u>V-2) Article 4 en préparation - Effet du mode de reproduction et des cycles thermiques de développement sur la phénologie reproductive, le succès reproducteur et les traits des nouveau-nés chez la forme ovipare et la forme vivipare de <i>Zootoca vivipara</i>.....</u>	111

TRADUCTION FRANÇAISE DU RESUME DE L'ARTICLE 3

Les stades précoces du développement sont particulièrement vulnérables aux perturbations environnementales. La sensibilité thermique embryonnaire pourrait ainsi être une force favorisant l'émergence des soins parentaux prénataux et de la thermorégulation maternelle. La viviparité est apparue à de nombreuses reprises chez les reptiles squamates et deux hypothèses principales (nommées "l'hypothèse des climats froids" et "l'hypothèse de manipulation maternelle") ont été proposées pour expliquer cette évolution du mode reproducteur. Les embryons des squamates doivent faire face à des variations thermiques journalières importantes dans les sites de ponte ou à l'intérieur de l'organisme maternel. Cependant, de nombreuses études portant sur le développement ont été réalisées à température constante et n'ont pu apporter que des réponses limitées sur l'importance de la thermorégulation maternelle.

Nous avons manipulé les conditions thermiques durant la gravidité et l'incubation de la forme ovipare d'une espèce à reproduction bimodale de squamate (*Zootoca vivipara*). Spécifiquement, nous avons comparé l'influence d'un cycle thermique typique d'une femelle gravide ou de site de ponte sur le développement embryonnaire, le phénotype des nouveau-nés et leurs performances. Le cycle thermique de site de ponte est basé sur les données récoltées dans une population de basse altitude. Malgré une température moyenne similaire de ces deux cycles, nous avons montré que le cycle maternel accélère fortement le développement des embryons, notamment lorsqu'il est appliqué pendant la période de rétention des oeufs. À l'inverse, les phénotypes des nouveau-nés n'ont pas été fortement impactés par le traitement thermique. Nous avons pu observer une endurance plus importante des nouveau-nés ayant été exposés au traitement maternel durant l'ensemble de leur développement. Nos résultats suggèrent que des contraintes thermiques modestes peuvent affecter significativement la phénologie de la reproduction et pourraient être un paramètre primordial dans l'émergence de la viviparité. De prochaines études sont cependant nécessaires pour comprendre les effets à long terme de l'influence thermique maternel.

Article 3 - Running head: maternal thermal influences during embryonic life in an oviparous lizard

Maternal thermoregulation enhances reproductive phenology and offspring locomotion in an oviparous lizard with extended egg retention (*Zootoca vivipara*)

Thomas Foucart^{1,2}, Benoit Heulin¹, Olivier Lourdais^{2,3}

¹ Station Biologique de Paimpont. UMR 6553 CNRS, F-35380, Paimpont, France

² Centre d'étude biologique de Chizé CNRS, F-79360, Villiers en Bois, France

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

Fax: + 33 (0)2.99.61.81.89

E-mail : thomas.foucart@gmail.com

Tables: 3

Figures: 3

For consideration in: Canadian Journal of Zoology

Manuscript in preparation

Abstract

Early life stages are particularly vulnerable to environmental perturbations. Embryonic thermal sensitivity may be a driving force in the emergence of prenatal parental care and maternal thermoregulation. Viviparity has emerged on repeated occasions among squamate reptiles and two main evolutionary hypotheses (namely the “cold climate hypothesis” and the “maternal manipulation hypothesis”) have been proposed to explain these transitions. Squamates embryos typically face important daily temperature fluctuations either in the nest or within maternal body. However, many experimental studies on development have relied on constant temperature and therefore may provide limited insight on the significance of maternal thermoregulation.

We manipulated thermal conditions during gravidity and incubation in the oviparous form of a reproductively bimodal squamate (*Zootoca vivipara*). Specifically we compared the influence of typical maternal temperature cycle during gravidity or nest thermal condition recorded in a lowland population in a thermally non-binding environment. While the two treatments had similar mean temperature, we found that maternal cycle strongly accelerated development notably when applied during gravidity. In turn, only limited effects were found when considering offspring phenotype. We found enhanced stamina in neonates exposed to maternal thermal regime during the entire development. Overall, our results suggest that modest thermal constraints can significantly affect reproductive phenology and may therefore be a proximate target in the emergence of viviparity. Further studies are required to address long term effects of maternal thermal influences.

Key word: development, embryo, reproductive mode, viviparity, parental care

Introduction

Early life history stages are particularly sensitive to environmental influences (Farmer 2000; Shine 2004a). That is influences experienced during embryonic life can have immediate consequences on embryonic survival or development but also long lasting effects on offspring performances (Elphick and Shine 1998; Lummaa and Clutton-Brock 2002; Lummaa 2003; Gorman et Nager 2004). In addition, recent developments in epigenetics clearly demonstrated that environmental perturbations at early stages can have multigenerational consequences (Pembrey 2002). Embryonic sensitivity is therefore considered as a driving force in the evolution of parental care notably at early stages (ie. prenatal care). A wide diversity of taxa has developed specific behavioral or physiological strategies to buffer the effects of environmental factors (Farmer 2000). Parents may also exert specific influences on developmental trajectory depending on the environmental conditions (food level, predation risks) they face (Mousseau *et al.* 2009). Therefore clarifying embryonic sensitivity appears essential to better understand life history transitions from oviparity to viviparity and the nature of parental influences (Clutton Brock 1991).

Embryos are sensitive to a diversity of parameters depending on the environment considered. For instance, oxygen supply is a critical parameter for aquatic organisms and this constraint affects both embryonic traits and parental behavior (Jones and Reynolds 1999). Temperature is a crucial parameter (either in aquatic and terrestrial environments) and embryonic thermal sensitivity is an ubiquitous trait in vertebrates and invertebrates (Farmer 2000). Thermal conditions during embryogenesis affect the duration of development, embryonic survival (Van damme *et al.* 1992; Lourdais *et al.* 2004) but also a diversity of phenotypic (body size, body condition) and behavioral (locomotor performances, feeding behavior) traits in offspring (Burger 1989; Webb, Brown and Shine 2001; Shine 2004a;

Rodríguez-Díaz and Brana 2011). Long term effects on survival have also been reported (Shine and Harlow 1993; Wapstra *et al.* 2010; Le Henanff, Meylan and Lourdais 2013).

Embryonic thermal sensitivity may have been a driving force in the evolution of parental care such as nesting behavior and nest site selection (Brown and Shine 2004; Lowenborg *et al.* 2010), the transition to viviparity (Shine 1995, 2002), and possibly the emergence of endothermy in birds and mammals (Farmer 2000). One critical aspect to consider in the evolution of thermal care is the link between a change in parental temperature and reproductive performances (Angilletta 2009). For instance, a central assumption of Farmer's scenario is that a small increment in maternal ability to thermoregulate (*i.e.* produce heat) will be selected if the reproductive benefits are high (Farmer 2000). This assumption can be extended to different forms of thermal cares such as behavioral thermoregulation in ectotherms and the evolution of maternal thermoregulation. Importantly, embryonic development is a continuous process but is based on multiples and connected phases (Andrews 2004). Early phases include critical neurogenesis and organogenesis that are followed by embryonic growth. Stage dependence of embryonic sensitivity has been demonstrated and early organizational steps are likely more sensitive to perturbations (Brana *et al.* 2007). High sensitivity at early developmental stages may have been a driving force in the emergence of thermal care to the embryos (Lorioux *et al.* 2013). The study of parental regulation of development should specifically address this stage- dependence of embryonic sensitivity.

Viviparity has emerged on number of occasions notably among squamate reptiles with > 100 independent transitions (Thompson and Blackburn 2006; Van Dyke, Brandley and Thompson 2014). Therefore it is not surprising that this group generated considerable interest to clarify the benefit of maternal regulation of development (see Shine 2004, 2005 and references therein). Two main hypotheses have been formulated to explain these repeated

transitions. The first one, the “cold climate hypothesis” (Tinkle and Gibbons 1977) posits that maternal regulation is critical to optimize development under cold conditions. In turn, according to the “maternal manipulation hypothesis”, maternal regulation is critical to optimize offspring phenotypic quality (Shine 1995). Importantly, these hypotheses are not exclusive both conceptually and functionally. Notably, recent works clearly support that female can optimize both reproductive phenology and offspring phenotypic quality (Rodríguez-Díaz and Brana 2011; Loricou *et al.* 2013). Embryos in most squamates are exposed to important diel fluctuation in temperature and the shape of daily temperature pattern will influence offspring traits (Shine *et al.* 1997; Shine 2004c). From a proximate perspective, embryonic thermal sensitivity differs from typical ectotherms performance curve with relatively narrow optimal temperature range (Angilletta 2009). Accessing optimal temperature likely constitutes a critical aspect for embryonic development (Huey *et al.* 1999). Maternal influences may likely exist through minimizing deviation from optimal temperature and optimizing time spent at preferred body temperature (Loricou *et al.* 2012; Loricou *et al.* 2013).

Most oviparous squamates retain their eggs until one third of the embryonic development is achieved. Therefore critical steps of embryonic life (organogenesis and early embryonic growth) occur within maternal body (Andrews 2004). During that period, embryos are exposed to maternal thermal regimes and numerous studies demonstrated that females actively thermoregulate during gravidity (Shine 2006; Loricou, Heulin and Denardo 2008). Therefore, egg retention may be important to optimize developmental condition as demonstrated in viviparous taxa. For example, in the Children’s python, an oviparous snake, maternal access to thermal preferences reduces developmental time and enhances offspring phenotype and behavior (Loricou *et al.* 2012). The subsequent transition to viviparity may be based on the extension of maternal control that pre-existed in oviparous taxa (Shine 2006).

Among squamates, a few number of species show reproductive bimodality with the coexistence of viviparous and oviparous populations (Heulin, Osenegg and Lebouvier 1991; Qualls *et al.* 1995; Smith and Shine 1997). The common lizard (*Zootoca vivipara*), is one of these species. We studied the oviparous form of the common lizard that retains its eggs until embryos reach stages 30-35 (Heulin *et al.* 1991; Rodríguez-Díaz and Brana 2012). We manipulated developmental conditions applying either maternal thermal regime of the viviparous form or average temperature recorded in the nest. Specifically we wanted to examine the following predictions:

(1) a small change in thermal regime (increased time at thermal preference) should translate in significant enhancement of reproductive performances;

(2) early embryonic stages (gravity period) are more sensitive to thermal constraints than the incubation period.

Material and methods

Study species

Zootoca vivipara (Jacquin, 1787) is a small (45-75mm snout-vent length), ground dwelling Eurasian lacertid that generally lives in humid habitats (heathland, peat bogs). This reproductively bimodal species presents distinct oviparous populations in southern France-northern Spain and in northern Italy-Slovenia. The oviparous form lay eggs at an advanced stage (30 to 35) which correspond to 50% of development duration (Brana, Bea and Arrayago 1991; Heulin *et al.* 1991; Rodríguez-Díaz and Brana 2012). Lizards (20 males and 30 females) were captured at Louvie, SW France, Pyrenees Mountains (43°06'N, 0°23'W) in summer 2013. Ecology and demography of this population has been previously described elsewhere (Heulin *et al.* 1994; Heulin *et al.* 1997).

Husbandry and reproduction

Lizards were reared in plastic terrarium (30x20x20 cm). Each terrarium was equipped with a PVC shelter and a 40W bulb that provided heat for 6 h/day. Water and food (mealworms) were provided *ad libitum*. Room temperature was on average $16.99 \pm 1.29^{\circ}\text{C}$. Large windows provided natural daylight.

Lizards were overwintered in the lab from first october until February 2014. Reproduction was obtained using a standard protocol (see Foucart et al., 2014). During the third week after hibernation, females were allowed to copulate with males until successful mating was observed. Ultrasonography (Sonosite microMaxx, Inc., Bothell, WA, USA) was used to monitor reproduction. This technique enables to distinguish vitellogenesis from ovulation and identify ovulation time (Gilman and Wolf 2007). A total number of 28 females engaged in reproduction and ovulation have been recorded in early march 2014.

Females were transferred in climatic chambers (Voëtsch VP 600, Balingen, Germany) in plastic terraria (Fauna Box, L: 41 x W: 23 x H: 17 cm). A 12h:12h light:dark cycle was provided using a fluorescent tube controlled by a programmable timer and placed in front of each climatic chamber. A damp sponge was placed under the shelter to increase humidity and to prevent the desiccation of clutches. We checked each female twice a day so the eggs were collected within the few hours after they were laid. Eggs were incubated on water saturated sand using a previously described protocol (Heulin 1988; Arrayago, Bea and Heulin 1996; Heulin *et al.* 2011)

Experimental design

In order to address stage-dependent embryonic thermal sensitivity we considered two relevant periods:

1) "Gravidity": this period corresponds to the fraction of development that occurs within maternal body between ovulation and egg-laying. Embryonic stage at oviposition ranges between 31 to 35 and therefore gravidity period encompasses major steps of organogenesis up to early embryonic growth (Andrews 2004). During that period gravid females are known to actively thermoregulate (Rodríguez-Díaz and Brana 2011)

2) "Incubation": this period is the fraction of development that occurs in the nest site and corresponds to embryonic growth and fetal life. During that period, embryos are exposed to thermal condition experienced in the nest.

Daily temperature cycles

In the common lizard, both pregnant females (viviparous form) and gravid females (oviparous form) display a shift in thermoregulation based on a decrease in thermal preference and an increase in basking time (Le Galliard, Le Bris and Clobert 2003; Rodríguez-Díaz and Brana 2011). We wanted to compare, in the oviparous form, the effect two daily thermal cycles (reflecting either maternal or nest conditions) and applied at two different stages (gravidity or incubation).

The two thermal cycles (Figure 1) were designed with SIMPATI software (version 2.06, Vötsch Industrietechnik) and applied using four climatic chambers (two for each type of thermal cycle). The two thermal cycles were as follow:

- Maternal cycle ("M"): This cycle corresponds to a typical maternal body temperature pattern observed in either gravid females (oviparous form, see Rodríguez-Díaz and Brana 2011) or pregnant ones (viviparous females, Le Galliard, Le Bris and Clobert 2003). The two forms share the same temperature preference (T_{set}) and the cycle is based on a long (6h/day) access to T_{set} (31°C; 6 hours/day; mean $T^{\circ} = 20 \pm 7^{\circ}\text{C}$). This cycle typically mimic maternal thermoregulatory effort during sunny days.

- Nest cycle ("N"). This cycle correspond to thermal condition recorded in a natural nest site of the oviparous form (Louvie, Pyrénées-Atlantiques, France, 43° 06' N, 0° 23' W, alt. 370 m). The cycle represent average and favorable thermal condition offering a daily access maternal T_{set} (31°C ; 1 hour/day; mean $T^{\circ} = 19 \pm 5$ °C, see Figure 1). This regime was based on thermal conditions previously recorded in the field in a lowland population (Pyrénées-Atlantiques, France, 43° 06' N, 0° 23' W, alt. 370 m) during the natural incubation period. Temperature was regularly recorded (1 record every hour) 2cm deep in a south facing tuft of sphagnum moss, which correspond to a typical nesting site (Heulin *et al.* 1994).

Thermal treatments

Gravid females were exposed to thermal treatments as soon as ovulation was detected. The assignment of females to the treatment ("M", 14 individuals and "N", 14 individuals) and to the four climatic chambers was random. For each female, as soon as egg laying was observed, eggs were allocated to one or the other thermal regimes (Table 1). Using a two by two design, the following thermal treatments were obtained (see Table 1):

- "MM": gravidity period and incubation at the maternal cycle. The treatment corresponds to typical thermal condition observed in the viviparous form.
- "MN": gravidity period at the maternal cycle and incubation at the nest cycle. The treatment corresponds to typical condition in the oviparous form
- "NN": gravidity and incubation at the nest temperature cycle. The treatment corresponds to altered thermoregulation during gravidity in the oviparous form
- "NM": gravidity at the nest cycle and incubation at the maternal cycle. This treatment corresponds to altered thermoregulation at early stage in the viviparous form.

Four females (3 under the M gravidity treatment and one from the N gravidity treatment) produced undeveloped ova. One female died during the experiment for unknown reasons and

another showed important mass loss and was removed from the experiment. Therefore, a total of 19 females (9 in the N and 10 in the M gravidity treatment) produced healthy eggs that were later incubated (see Table 1).

Variables measured

We collected different parameters related to reproductive phenology, reproductive success, and offspring traits. They are described below.

1) Development duration

We considered total development duration (days) from ovulation (determined by ultrasounding) to hatching. We also considered gravidity duration (from ovulation to laying) and incubation duration (from laying to hatching).

2) Hatching success

We considered the influence of thermal treatment on the proportion of eggs that produced healthy neonates.

3) Offspring phenotype

At birth, we collected snout-vent length ($SVL \pm 0.1$ mm), head length, total length, and body mass ($BM \pm 1$ mg). Body condition was derived from the residuals of $\log(BM)$ against $\log(SVL)$. For each offspring, a high resolution scan (600 Dpi) of the ventral face was obtained (CanoScan 8800F, Canon). Body size measurements were collected on the scanned images using Inkscape software (Open source Software, licensed under the GPL, version 0.48.5). Ventral scales count was determined between the anal plate and the gular collar considering the two medioventral lines to determine offspring sex and also to record ventral

scalation abnormalities. This sex assignment technique has previously been used successfully in this species (Lecomte *et al.* 1992; Heulin, 1985; Heulin *et al.* 1997). Count of ventral scales abnormalities was defined as the sum of scales duplication on the right and the left medioventral lines.

4) Locomotor performances

We measured offspring stamina one day after hatching in a temperature controlled room (mean temperature $27.04 \pm 0.61^\circ\text{C}$). Before the test each individual was acclimated for an hour in an opaque container to minimize stress. We used a circular runway (internal and external diameter respectively 50 and 60cm) as described by Clobert *et al.* (2000). The runway was delimited by 15cm high perplexed wall and the surface was covered with sandpaper to facilitate locomotion.

Each individual was placed on the runway and was stimulated using gentle tap on the tail with a soft paintbrush. Stamina was derived from the running time until the individual was no longer responding to repeated stimulations (>10 in a row). We also measured the duration of the run until the first stop and the number of stops during the run.

5) Exploratory behavior

Neonate lizards are autonomous at birth and individual exploratory behavior is a good indicator of the individual's ability to find suitable microhabitats in a new environment. Two days after birth, we assessed neonate exploratory behavior using a 360 x 270 mm polypropylene box. Two shelters (H 30 x L 100 x l 60 mm) were provided on each side of the arena. Trials were conducted in a temperature controlled room ($25.87 \pm 0.9^\circ\text{C}$) and each individual was acclimated in the middle of the arena under an opaque cover for 1 hour. The cover was removed and the lizard's behavior was video recorded for 1 hour (camera SONY

Handycam Xr100/101). The space of the arena was subdivided in 6 virtual, equal size compartments. We documented the number of visited compartments, the number of visited shelters and time spent under shelter. Between trials, the entire system was cleaned with 70% alcohol to remove residual odors.

Statistical analyses

All analyses were performed with the R software (R Development Core Team, version 3.1.1) with packages lme4, car and multcomp. The data were tested for normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (F test) and log transformed when required to meet the assumptions of parametric testing prior to analysis. Influences of thermal treatment on reproductive output were tested using general linear models treating clutch traits as the dependent variable and maternal traits (body size) as covariate. We analyzed possible impact on hatchling success using a binomial model treating individual egg success (0/1) as the dependent variable and maternal identity as a random factor. A similar procedure was used to test the influences of treatment on offspring sex. We tested of thermal treatment on offspring traits were examined using linear mixed model with mother identity as a random factor and maternal traits (body size) as cofactor. A Gaussian distribution was used for morphological traits while a Poisson distribution was used for scale duplication counts. All pairwise comparisons were made by post-hoc Tuckey HSD tests. All data are presented as means \pm SD. All results were tested for statistical significance at the $p < 0.05$ level. Denominator degrees of freedom for the F-statistic in mixed models were calculated using a Kenward–Roger correction (Kenward and Roger 1997).

Results

1) Reproductive output and hatching success

We found no influence of gravidity thermal treatment on clutch size, relative clutch size, and clutch mass (Clutch size, ANOVA $F_{1,16}=0.31$, $P=0.58$; Relative Clutch size ANCOVA $F_{1,14}=0.49$, $P=0.50$; Clutch mass ANOVA $F_{1,16}=2.07$, $P=0.17$). In turn, we found a significant influence of gravidity thermal treatment on relative clutch mass (ANCOVA, $F_{1,14}=5.34$, $P=0.03$) with higher relative clutch mass in M treatment. We found no influence of gravidity thermal treatment or incubation treatment on hatchling success (respectively ANOVA Wald $\text{Chisq}=0.83$, $df=1$, $P=0.36$; ANOVA Wald $\text{Chisq}=2.31$, $P=0.13$).

2) Reproductive phenology

We found a strong influence of thermal treatment on the duration of development. Gravidity duration was much longer in females exposed to the N regime when compared to the M time (respectively 40.9 ± 6.4 and 25.4 ± 5.9 days; $F_{1,16}=24.477$; $P<0.001$). Similarly we found a strong influence of thermal treatment on incubation duration (ANOVA $F_{1,51.72}=1453.16$, $P<0.001$). We also found a significant interaction between gravidity and incubation thermal treatment on incubation duration (ANOVA, $F_{1,15.18}=21.42$, $P<0.001$). Within each incubation thermal treatment we found that gravidity thermal treatment (*i.e.* inside maternal body) hastened incubation. The four experimental groups significantly differed in incubation duration (ANOVA $F_{3,40.71}=493.19$, $P<0.001$, Figure 2a, all Tuckey HSD post-hoc test $P<0.01$). When considering total development duration, we also found a significant influence of gravidity (ANOVA $F_{1,16.01}=31.79$, $P<0.001$) and incubation thermal treatment (ANOVA $F_{1,53.05}=1475.46$, $P<0.001$) but no interaction was found between the two (ANOVA $F_{1,53.07}=1.34$, $P=0.25$). As described above, the four experimental groups

significantly differed in development duration (ANOVA $F_{3,43.18}=493.83$ $P<0.001$, all Tukey HSD post-hoc test < 0.04 , Figure 2b).

3) Offspring morphology

We found no influence of thermal treatment on offspring sex (Table 3). Since sex effects were not the main focus of the present study, males and females were pooled in subsequent analyses. Controlling for maternal SVL and relative clutch size, we found no influence of gravidity or incubation thermal treatment on body size (head length, SVL, TL) or body condition at birth (Table 3). Significant influence of incubation thermal treatment on body mass was detected (ANCOVA, $F_{1,56.67}=6.58$, $P=0.013$). We found a positive influence of maternal size on offspring mass, SVL and body condition. We found a significant influence of thermal treatment on the occurrence of scales abnormalities that was lower in the MN group compared to NN group (Chisq=12.29, df=3, $P=0.006$; Tukey HSD post-hoc test $P=0.003$).

4) Offspring behavior and locomotion

We found no impact of thermal treatment on the different estimate of exploratory behavior. In turn we found a significant effect on locomotion with higher stamina in the MM incubation treatment group when compared to others (Table 2, ANOVA, $F_{3, 31.65}=6.03$, $P=0.002$; HSD Tukey post-hoc test MM vs. NN $P=0.075$, all other comparison $P<0.02$).

Discussion

Embryonic thermal sensitivity may be a crucial driving force in the emergence of parental care, thermoregulation and reproductive mode (Farmer 2000, 2003; Shine 2004a). Our study in a lizard with extended embryonic retention demonstrates that a rather minor contrast in daily temperature cycle may have important consequences on reproductive performance and notably reproductive phenology. We discuss our findings below.

The influence of temperature on reproduction has been demonstrated in a variety of taxa (Deeming and Ferguson 1991; Qualls and Andrews 1999; Farmer 2000; Angilletta 2009). Notably, it is well known that deviation from natural thermal regimes can have profound consequences. Importantly, a vast majority of studies have used constant temperature and/or have often imposed important deviation from natural conditions. While these approaches provide a significant insight on developmental sensitivity, they can be problematic to understand the significance of maternal thermoregulation (Shine 2004a). For instance, imposing constant and either high or low temperature will often necessarily lead to deleterious effect on the embryos because the regimes are out the natural context (Huey *et al.* 1999). Herein, we imposed ecologically relevant temperature cycles and tested the impact of only a mild temperature contrast. That is, the two regimes were very similar in mean temperature but differed mostly in the amount of exposed time at maternally preferred temperature.

Using this protocol, we detected a massive impact on phenology since maternal thermal regime accelerated development time by 25 days when compared to nest incubation regimes. Importantly gravidity duration was 40% shorter under maternal thermal regime. Conversely, the effect during incubation was less marked with an average 25% reduction in duration. We also found that conditions experienced during gravidity influenced incubation dynamics. That is incubation duration was shorter when maternal conditions were imposed during gravidity when compared to nest condition. Therefore gravidity (which encompasses the first half of embryonic life) period of development seems particularly sensitive to thermal condition and access to thermal preferences. Early development may be critical to speed up the developmental time and subsequently influences the incubation dynamics. It has been shown that phenology is an important determinant of reproductive performance in a variety of taxa (Goutte, Antoine and Chastel 2011; Le Henanff *et al.* 2013) notably under cold climatic

conditions. Hastened development and early date of birth will optimize the time available for essential aspects such as energy intake and may have long term positive effects on individual performances (Wapstra *et al.* 2010; Le Henanff *et al.* 2013). While the contrast in thermal treatments was small, the differences in date of birth here are likely to be ecologically relevant. Overall, our results on phenology provide support to our two main predictions.

When considering offspring traits, we found that maternal size positively influenced offspring mass, body size, and therefore body condition. Contrary to development duration, thermal treatments had a very limited effect on offspring morphology with only a marginal effect on offspring mass. The lack of clear phenotypical effects could be related to the positive effect of accessing thermal preferences ($T > 28^{\circ}\text{C}$) for 3 hours under the nest incubation treatment. Similarly, a recent study in an oviparous snakes demonstrated that accessing thermal preference, even for a short duration, hastens development duration and enhances offspring morphology and behaviour (Lorioux *et al.* 2012). Such experimental evidences provide support to the optimal developmental temperature hypothesis (Huey *et al.* 1999). Interestingly, when considering offspring behavior, we found that offspring exposed to maternal thermal regimes during gravidity and incubation had higher stamina than the other groups. Therefore, while no effects on morphology were detected, more subtle influences on offspring performances may exist notably when thermal treatments are applied during the entire development.

Previous studies demonstrated the stage-dependence of embryonic sensitivity and the fact that maternal thermoregulation can enhance both reproductive phenology and offspring phenotype (Rodríguez-Díaz and Brana 2011; Lorioux *et al.* 2013). It has also been shown that early embryonic stages are particularly vulnerable to thermal perturbations (Brana *et al.* 2007; Lorioux *et al.* 2013). This sensitivity may explain the benefit gained from egg retention in oviparous squamates (Shine 2006). Interestingly, Lorioux *et al.* (2013) found in a viviparous

snake that phenotypical effects were more relevant at early stages while maternal phenological influences were more continuous during pregnancy. However this study imposed a deviation from thermal preferences rather than manipulating the time exposure at T_{set} . It is noteworthy that thermal constraints depend on environmental conditions that affect thermal condition in potential nest and also maternal thermoregulatory possibilities (Shine 2004b; Wang *et al.* 2014). Therefore, the fitness benefits of active maternal regulation has to be considered in the frame of thermal constraints. Under cold climate maternal thermoregulation is likely to be beneficial by allowing exposure to higher temperature and also accessing to thermal preferences that would simply not be accessible in a nest site (Bernard 2004; Shine 2004c). Therefore, active thermoregulation is necessary under cold climatic conditions in order to achieve and maintain thermal preferences (Gvozdík 2002; Lourdais *et al.* 2013).

Overall, our study revealed that maternal temperature had a significant effect mainly through enhanced phenology notably during gravidity. Also thermal conditions during gravidity subsequently influenced the dynamics of incubation. In turn, no pronounced phenotypical effects were found, likely because embryos always accessed maternal thermal preferences. Our results suggest that phenological effects may be particularly sensitive to variations in the access to thermal preferences. A small enhancement of thermal conditions experienced by the embryos may therefore be relevant to optimize reproductive phenology. Further work is needed to clarify the relation between maternal thermoregulatory efforts and fitness benefit derived from combined phenological and phenotypical effects.

Acknowledgements: We thank Mr. Gilles Perron for providing authorization to catch lizards in The Pyrenees National Park. Lizards were captured in Louvie with a permit from the Prefecture of the *Pyrénées-Atlantiques* department.

References

- Andrews, R.M.** (2004). Patterns of embryonic development. *Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour* (ed D.C. Deeming), pp. 75–102. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Angilletta, M.J.** (2009). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford University press, New York.
- Arrayago, M.J., Bea, A. and Heulin, B.** (1996). Hybridization experiment between oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara*: A new insight into the evolution of viviparity in reptiles. *Herpetologica*. **52** : 333–342.
- Bernard, C.** (2004). Fetal sex ratio variation in the highly polygynous Himalayan tahr : evidence for differential male mortality. **15**: 572–578.
- Brana, F., Bea, A. and Arrayago, M.J.** (1991). Egg retention in Lacertid Lizards: relationships with reproductive ecology and the evolution of viviparity. *Herpetologica*. **47** : 218–226.
- Brana, 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.
- Brown, G.P.G. and Shine, R.** (2004). Maternal nest-site choice and offspring fitness in a tropical snake (*Tropidonophis mairii*, colubridae). *Ecology*. **85** : 1627–1634.
- Burger, J.** (1989). Incubation temperature has long-term effects on behaviour of young Pine snakes (*Pituophis melanoleucus*). *Behavioral Ecology And Sociobiology*. **24** : 201–207.
- Clobert, J., Oppliger, A., Sorci, G., Ernande, B., Swallow, J.G. and Garland, T.** (2000). Trade-offs in phenotypic traits: endurance at birth, growth, survival, predation and susceptibility to parasitism in a lizard, *Lacerta vivipara*. *Functional Ecology*. **14** : 675–684.
- Clutton Brock, T.H.** (1991). *The Evolution of Parental Care*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Van damme, R., Bauwens, D., Brana, F. and Verheyen, R.F.** (1992). Incubation temperature differentially affects hatching time, egg survival, and hatchling performance in the lizard *Podarcis muralis*. *Herpetologica*. **48** : 220–228.
- Deeming, D.C. and Ferguson, M.W.J.** (1991). Egg incubation its effects on embryonic development in birds and reptiles. *Egg incubation its effects on embryonic development in birds and reptiles*. (ed D.C.& F. Deeming) Cambridge university press, Cambridge.
- Van Dyke, J.U., Brandley, M.C. and Thompson, M.B.** (2014). The evolution of viviparity: molecular and genomic data from squamate reptiles advance understanding of live birth in amniotes. *Reproduction*. **147** : R15–R26.
- Elphick, M.J. and Shine, R.** (1998). Long term 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.
- Farmer, C.G.** (2000). Parental care: The key to understanding endothermy and other convergent features in birds and mammals. *American Naturalist*. **155** : 326–334.

- Farmer, C.G.** (2003). Reproduction: The adaptive significance of endothermy. *American Naturalist*. **162** : 826–840.
- Foucart, T., Lourdais, O., Denardo, D.F. and Heulin, B.** (2014). Influence of reproductive mode on metabolic costs of reproduction : insight from the bimodal lizard *Zootoca vivipara*. *Journal of Experimental Biology*. **33** : 4049–4056.
- Le Galliard, J.-F., Le Bris, M. and Clobert, J.** (2003). Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology*. **17** : 877–885.
- Gilman, C.A. and Wolf, B.O.** (2007). Use of portable ultrasonography as a nondestructive method for estimating reproductive effort in lizards. *Journal Of Experimental Biology*. 1859–1867.
- Gorman, H.E. and Nager, R.G.** (2004). Prenatal developmental conditions have long-term effects on offspring fecundity. *Proceeding of the royal society B*. **271** :1923–1928.
- Goutte, A., Antoine, E. and Chastel, O.** (2011). Experimentally delayed hatching triggers a magnified stress response in a long-lived bird. *Hormones and Behavior*. **59** : 167–173.
- Gvozdík, L.** (2002). To heat or to save time? Thermoregulation in the lizard *Zootoca vivipara* (*Squamata: Lacertidae*) in different thermal environments along an altitudinal gradient. *Canadian Journal of Zoology*. **80** : 479–492.
- Le Henanff, M., Meylan, S. and Lourdais, O.** (2013) The sooner the better: reproductive phenology drives ontogenetic trajectories in a temperate squamate (*Podarcis muralis*). *Biological Journal of the Linnean Society*. **108** : 384–395.
- Heulin, B.** (1988) Données nouvelles sur les populations ovipares de *Lacerta vivipara*. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences de Paris*. **306** : 63–68.
- Heulin, B., Osenegg, K. and Lebouvier, M.** (1991). Timing of embryonic development and birth dates in oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara* : testing the predictions of an evolutionary hypothesis. *Acta Oecologica International Journal of Ecology*. **12** : 517-528.
- Heulin, B., Osenegg, K. and Michel, D.** (1994). Survie et incubation des oeufs dans deux populations ovipares de *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia*. **15** : 199–219.
- Heulin, B., Osenegg-Leconte, K. and Michel, D.** (1997). Demography of a bimodal reproductive species of lizard (*Lacerta vivipara*): Survival and density characteristics of oviparous populations. *Herpetologica*. **53** : 432–444.
- Heulin, B., Surget-Groba, Y., Sinervo, B., Miles, D. and Guiller, A.** (2011). Dynamics of haplogroup frequencies and survival rates in a contact zone of two mtDNA lineages of the lizard *Lacerta vivipara*. *Ecography*. **34** : 436–447.
- 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.
- Jones, J.C. and Reynolds, J.D.** (1999). Costs of egg ventilation for male common gobies breeding in conditions of low dissolved oxygen. *Animal Behaviour*. **57** : 181–188.
- Kenward, M.G. and Roger, J.H.** (1997). Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*. **53** : 983–997.
- Lorioux, S., DeNardo, D.F., Gorelick, R. and Lourdais, O.** (2012). Maternal influences on early development: preferred temperature prior to oviposition hastens embryogenesis

and enhances offspring traits in the Children's python, *Antaresia childreni*. *Journal of Experimental Biology*. **215** : 1346–1353.

- Lorion, S., Vaugoyeau, M., Denardo, D.F., Clobert, J., Guillon, M. and Lourdais, O.** (2013). Stage dependence of phenotypical and phenological maternal effects: insight into squamate reptile reproductive strategies. *The American naturalist*. **182** : 223–233.
- Lourdais, O., Guillon, M., DeNardo, D.F. and Blouin-Demers, G.** (2013). Cold climate specialization: adaptive covariation between metabolic rate and thermoregulation in pregnant vipers. *Physiology and behavior*. **119** : 149–55.
- Lourdais, O., Heulin, B. and Denardo, D.F.** (2008). Thermoregulation during gravidity in the children's python (*Antaresia childreni*): a test of the preadaptation hypothesis for maternal thermophily in snakes. *Biological Journal of the Linnean Society*. **93** : 499–508.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Naulleau, G., Guillon, M. and Naulleau, G.** (2004). Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*. **104** : 551–560.
- Lowenborg, K., Shine, R., Karvemo, S. and Hagman, M.** (2010). Grass snakes exploit anthropogenic heat sources to overcome distributional limits imposed by oviparity. *Functional Ecology*. **24** : 1095–1102.
- 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.
- 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 of London. Series B, Biological sciences*. **364** : 1035–1038.
- Pembrey, M.E.** (2002). Time to take epigenetic inheritance seriously. *European Journal of Human Genetics*. **44** : 669–671.
- 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.
- Qualls, C.P., Shine, R., Donnellan, S. and Hutchinson, M.** (1995). The evolution of viviparity within the Australian scincid lizard *Lerista bougainvillii*. *Journal of Zoology*. **237** : 13–26.
- Rodríguez-Díaz, T. and Brana, F.** (2011). Shift in thermal preferences of female oviparous common lizards during egg retention : insights into the evolution of reptilian viviparity. *Evolutionary biology*. **38** : 352–359.
- Rodríguez-Díaz, T. and Brana, F.** (2011) Plasticity and limitations of extended egg retention in oviparous *Zootoca vivipara* (Reptilia: Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. **102** : 75–82.
- Rodríguez-Díaz, T. and Brana, F.** (2012). Altitudinal variation in egg retention and rates of embryonic development in oviparous *Zootoca vivipara* fits predictions from the cold-

climate model on the evolution of viviparity. *Journal of Evolutionary Biology*. **25** : 1877–1887.

- Shine, R.** (1995). A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *The American naturalist*. **145** : 809–823.
- Shine, R.** (2002). An empirical test of the “predictability” hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *Journal of Evolutionary Biology*. **15** : 553–560.
- Shine, R.** (2004a). Adaptive consequences of developmental plasticity. *Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour*, pp. 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). Does viviparity evolve in cold climate reptiles because pregnant females maintain stable (not high) body temperatures? *Evolution*. **58** : 1809–1818.
- Shine, R.** (2005). Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, pp. 23–46.
- Shine, R.** (2006). Is increased maternal basking an adaptation or a pre-adaptation to viviparity in lizards? *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology*. **305A** : 524–535.
- Shine, R. and Harlow, P.** (1993). Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia*. **96** : 122–127.
- Shine, R., Madsen, T.R.L., Elphick, M.J. and Harlow, P.S.** (1997). The influence of nest temperatures and maternal brooding on hatchling phenotypes in water pythons. *Ecology*. **78** : 1713–1721.
- Smith, S.A. and Shine, R.** (1997) Intraspecific variation in reproductive mode within the scincid lizard *Saiphos equalis*. *Australian Journal of Zoology*. **45** : 435–445.
- Thompson, M.B. and Blackburn, D.G.** (2006). Evolution of viviparity in reptiles: Introduction to the symposium. *Herpetological Monographs*. **20** :129–130.
- Tinkle, D.W. and Gibbons, J.W.** (1977). The distribution and evolution of viviparity in Reptiles. *Miscellaneous publications Museum of Zoology, University of Michigan*. 1–55.
- Wang, Z., Lu, H.L., Ma, L. and Ji, X.** (2014). Viviparity in high-altitude *Phrynocephalus* lizards is adaptive because embryos cannot fully develop without maternal thermoregulation. *Oecologia*. **174** : 639–649.
- 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.
- Webb, J.K., 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.

Table 1. Experimental design used for the study

Experimental Design		Variables measured		
<p style="text-align: center;">Egg laying Hatchling</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓</p> <p>Gravidity Incubation</p> <p>Treatment M (n=14) Treatment M (n=23)</p> <p>10 Reproductive Treatment N (n=21)</p> <p>Treatment N (n=14) Treatment M (n=19)</p> <p>9 Reproductive Treatment N (n=20)</p>		<p style="text-align: center;">Reproduction traits</p> <p>Development duration Incubation duration Hatchling success Sex-ratio</p> <p style="text-align: center;">Offspring traits</p> <p>J-0 Phenotype Scale abnormalities Body mass Head length Body condition</p> <p>J-1 Locomotor performances Stamina Run duration until first stop Number of stop</p> <p>J-2 Exploratory behavior Number of visited compartments Number of visited shelters Time under shelters</p>		

Table 2. Influence of thermal treatment on hatching success

	Gravidity treatment		Incubation treatment		Interaction			
	N	M	N	M	NN	NM	MN	MM
N reproductive female	9	10	-	-	-	-	-	-
N eggs incubated	39	44	41	42	20	19	21	23
N egg hatchling	30	43	37	36	17	13	20	23
Hatchling success	77%	98%	90%	86%	85%	68%	95%	100%
Statistic test	NS		NS		NS			

Table 3. Influence of thermal treatment on offspring traits.

Offspring traits	Co-variable	Gravidity treatment		Incubation treatment		Interaction	
		M	N	M	N		
Sex-ratio (Males/Female)	n.a.	$\chi^2 = 0.18, df=1, P=0.67$ 21 /21 17/14		LR $\chi^2 = 1.49, df=1, P=0.22$ 22/15 16/20		LR $\chi^2 = 1.762, df=1, P=0.18$	
Mass (mg)	Mother SVL RCS	F_{1,10.38}=11.01, P=0.007 F _{1,10.17} =1.26, P=0.28	F _{1,19.41} =2.37, P=0.14 232.45 ± 24.94 228.58 ± 26.46		F_{1,56.67}=6.58, P=0.013 229.57 ± 25.70 232.08 ± 25.56		All NS
Head length (mm)	Mother SVL RCS	F _{1,9.67} =0.11, P=0.75 F _{1,9.21} , P=0.79	F _{1,12.07} =1.07, P=0.32 8.03 ± 0.37 7.90 ± 0.38		F _{1,53.66} =0.21, P=0.65 8.01 ± 0.37 7.94 ± 0.39		All NS
SVL (mm)	Mother SVL RCS	F_{1,9.67}=5.79, P=0.04 F _{1,9.21} =0.34, P=0.57	F _{1,12.08} =1.42, P=0.26 20.22 ± 0.98 20.03 ± 1.11		F _{1,53.66} =0.01, P=0.91 20.18 ± 1.09 20.09 ± 0.99		All NS
TL (mm)	Mother SVL RCS	F _{1,10.45} =2.43, P=0.15 F _{1,10.12} =1.65, P=0.23	F _{1,19.70} =0.0004, P=0.98 46.26 ± 2.16 46.96 ± 2.30		F _{1,54.52} =2.57, P=0.11 46.98 ± 2.38 46.11 ± 2.00		All NS
Body Cond. (Res)	Mother SVL RCS	F_{1,9.26}=12.53, P=0.006 F _{1,8.42} = 1.53, P=0.24	F _{1,10.37} =0.72, P=0.41		F _{1,52.97} =2.04, P=0.16		All NS

Figures 1. Thermal treatments were based on two different daily temperature cycles applied during gravidity and incubation. (A) In the warm daily cycle which mimicked the thermal cycle of reproductive females in the wild (black line), females reached their preferred body temperature ($T_{set}=31.0^{\circ}\text{C}$) for 6 hours, while the cool cycle mimicked the thermal regime recorded in a nest site in lowland population. Conditions in the nest were mild since temperature rose above 28°C for 3 hours a day and reached maternal T_{set} for one hour.

Figure 2. Influence of thermal treatment on A) incubation duration and B) total development duration in *Z vivipara*. Error bars represent SE. Symbols not connected by the same letter are significantly different.

Figure 3. Influence of thermal treatment on offspring stamina (measured from the time delay before the first stop in the experimental arena). Error bars represent SE. Symbols not connected by the same letter are significantly different.

Figure 1

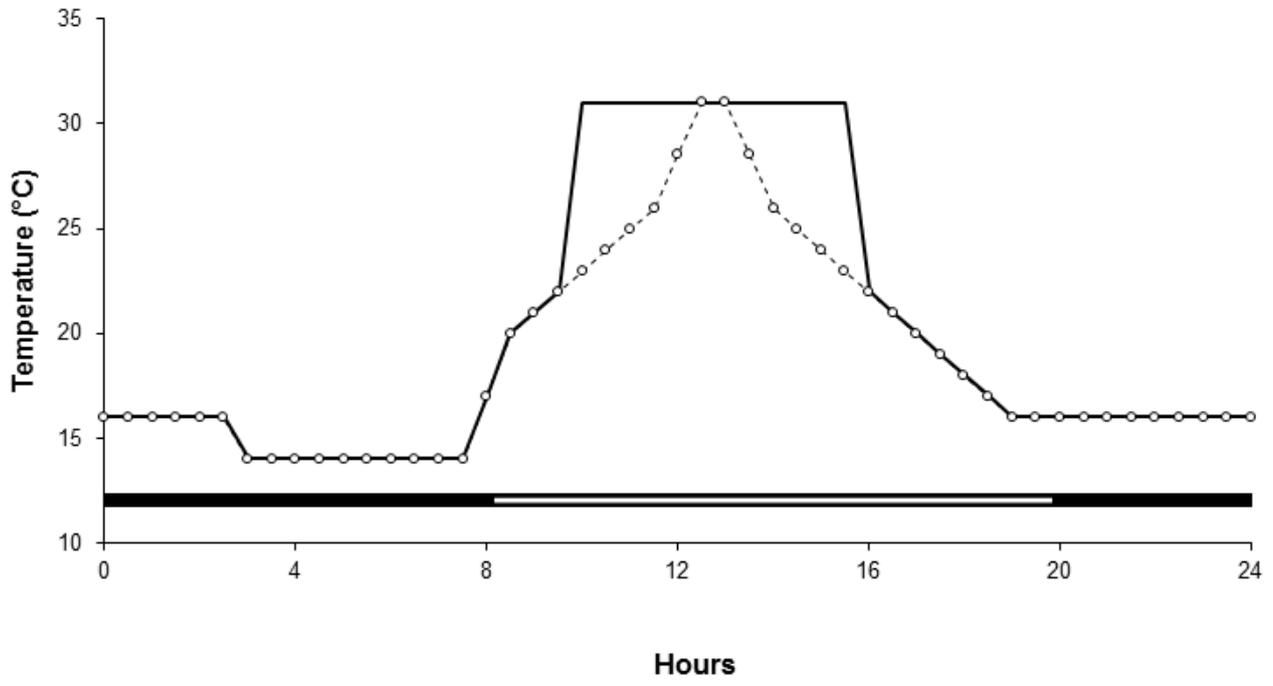


Figure 2

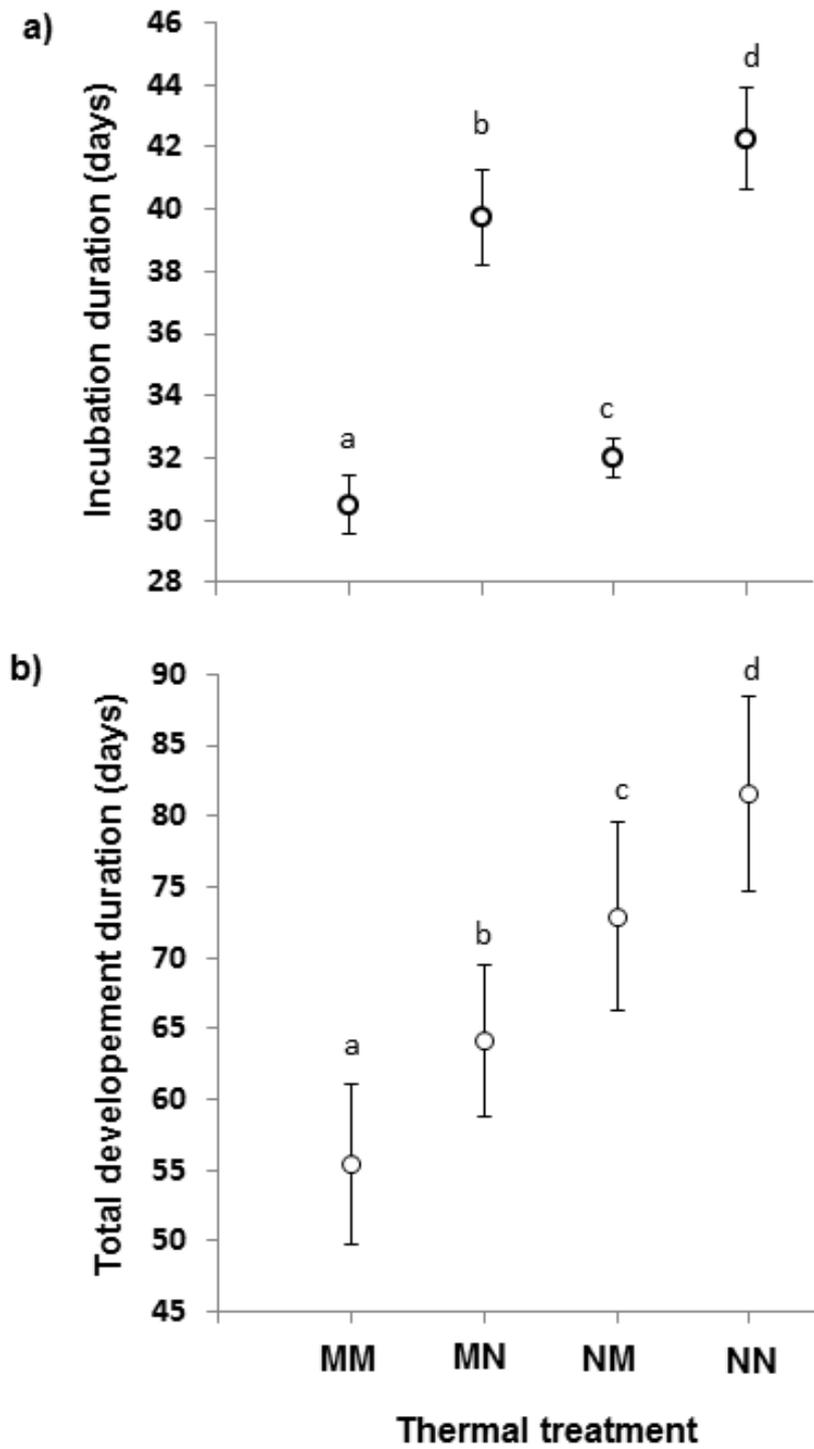
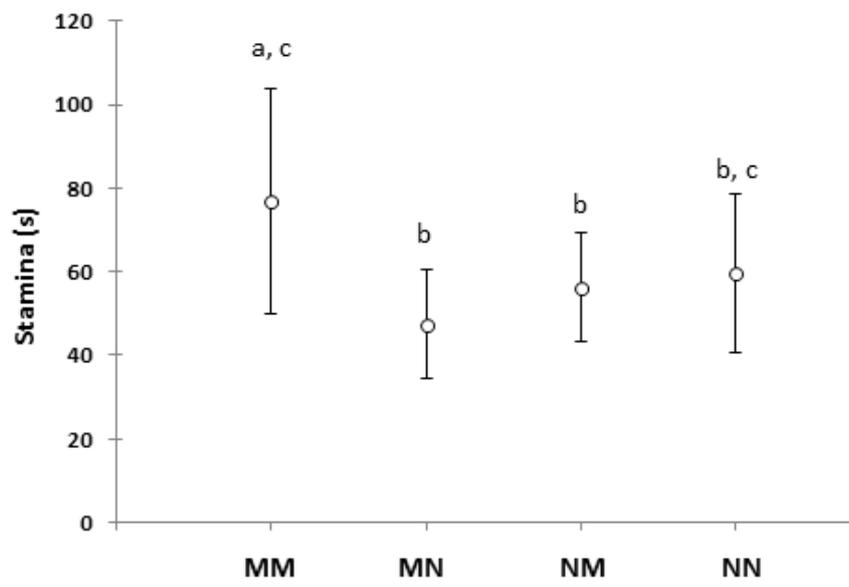


Figure 3



Effets du mode de reproduction et des cycles thermiques de développement sur la phénologie reproductive, le succès reproducteur et les traits des nouveau-nés chez la forme ovipare et la forme vivipare de *Zootoca vivipara*.

Thomas Foucart^{1,2}, Sandrine Meylan^{4,5}, Benoit Heulin¹, Olivier Lourdais^{2,3}.

¹ Station Biologique de Paimpont. UMR 6553 CNRS, F-35380, Paimpont, France

² Centre d'étude biologique de Chizé CNRS, F-79360, Villiers en Bois, France

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

⁴ Laboratoire d'Ecologie, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7625 CNRS, F-75252, Paris, France

⁵ IUFM Paris – Institut Universitaire de Formation des Maîtres de Paris

Manuscrit en préparation

Résumé de l'article

Les fluctuations thermiques environnementales et la forte sensibilité thermique lors de l'embryogenèse sont susceptibles de fortement affecter la vitesse et la qualité de développement des animaux ectothermes. Chez les squamates, la viviparité et la thermorégulation comportementale maternelle permettent d'offrir aux embryons un accès prolongé et plus stable à leur température optimale de développement, à l'inverse, des conditions thermiques des sites de pontes des espèces ovipares. Le développement dans la cavité abdominale maternelle induit cependant des contraintes développementales particulières (*e.g.* volume disponible, condition hypoxique, limitation d'absorption hydrique) qui pourraient contrebalancer les bénéfices thermiques procurés par la viviparité. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une étude de l'effet du mode de reproduction (ovipare *vs.* vivipare) et de l'effet du cycle thermique journalier sur la phénologie et les performances reproductives (*i.e.* survie embryonnaire, morphologie des nouveau-nés, leurs performances locomotrices, exploratoires et leur survie sur deux périodes successives) d'un lézard à reproduction bimodale : *Zootoca vivipara*. Les femelles (et pontes) ont été réparties dans deux traitements thermiques contrastés avec soit un accès long à la température optimale de développement (régime M) soit un accès beaucoup plus court à cette température optimale (régime N). Le développement a été plus rapide en régime M indépendamment du mode reproducteur. La survie embryonnaire a été influencée par le traitement thermique ainsi que par le mode reproducteur (respectivement dans les régimes N et M : 33% *vs.* 60% chez vivipares ; 85% *vs.* 100% chez ovipares). Les principales différences des caractères des nouveau-nés étaient liées au mode de reproduction. Nous avons observé une réduction de la taille (-2,2mm soit -8%), du poids (-37 mg, soit -20%), de la condition corporelle, de l'endurance (-27s soit -34%) et du temps avant premier arrêt (-1,4s soit -27%) des nouveau-nés vivipares par rapport aux nouveau-nés ovipares. En dépit des dates de naissance différentes qu'ils ont induites, les différents traitements thermiques n'ont pas affecté la survie postnatale des individus. Cependant, une corrélation positive a été identifiée entre le taux de survie des juvéniles et leur poids à la naissance lors de la première période. Selon les critères examinés, la viviparité semble donc induire une augmentation des contraintes de développement des embryons induisant une réduction de la qualité des nouveau-nés.

Introduction

L'existence d'une forte sensibilité thermique des individus au cours de l'embryogenèse est une contrainte caractéristique commune à tous les vertébrés. Si l'évolution de l'endothermie a permis aux mammifères et aux oiseaux de s'affranchir de cette contrainte (Farmer 2000), les vertébrés ectothermes restent au contraire fortement dépendants des fluctuations thermiques environnementales au cours de leur embryogenèse. Chez les squamates la température durant l'embryogenèse peut affecter non seulement le succès et la durée du développement embryonnaire (*e.g.* Van Damme *et al.* 1992) mais aussi de très nombreux traits phénotypiques (*e.g.* taille, proportions corporelles, caractéristiques morphologiques, anomalies d'écaillage) et comportementaux (performances locomotrices, comportements alimentaires et anti-prédateurs) des nouveau-nés (*e.g.* Osgood 1978, Beuchat 1988, Burger 1990, Shine 1995, 2014, Qualls et Andrews 1999a, Rodriguez-Diaz et Brana 2011a,b) ainsi que leur probabilité de survie postnatale (Shine et Harlow 1993, Wapstra *et al.* 2010, LeHenanff *et al.* 2013).

Les squamates sont des animaux ectothermes qui ne disposent pas ou peu de processus métaboliques de thermogénèse. C'est essentiellement par des processus de thermorégulation comportementale (*i.e.* ajustements posturaux, captation de chaleur du substrat et/ou du rayonnement solaire) qu'ils parviennent à réguler temporairement leur température corporelle. Ainsi, les individus tendent à maintenir leur température le plus longtemps possible à un niveau compatible à la réalisation de l'ensemble de leurs fonctions éco-éthologiques (*i.e.* recherche de nourriture ou de partenaires, évitement des prédateurs) et physiologiques (*i.e.* digestion, croissance, reproduction) (Rodriguez Diaz et Brana 2011a). Il en résulte que, dans le cadre de la reproduction, la période de rétention intra-utérine des œufs (gestation vivipare, gravidité ovipare) permet aux embryons et fœtus de bénéficier d'un accès prolongé et plus stable à leur température optimale de développement via la thermorégulation maternelle qui peut notamment contribuer à raccourcir la durée de la période de développement (Shine

2014). Le contrôle thermique maternel de l'embryogenèse est donc un processus qui, selon qu'il soit complet (*i.e.* toute la gestation chez les espèces vivipares) ou seulement partiel (*i.e.* rétention des œufs plus courte chez les espèces ovipares), est susceptible d'occasionner des différences de performances reproductrices (*i.e.* durée et succès de développement, qualité et probabilité de survie des nouveau-nés produits) entre les espèces ovipares et vivipares chez les squamates (Shine 1995, 2014).

Néanmoins, les bénéfices de la thermorégulation maternelle (*e.g.* raccourcissement de la durée de développement des embryons), peuvent cependant entraîner des coûts particuliers pour la femelle et ses descendants lors de l'allongement de la période de rétention intra-utérine des œufs. Le développement dans la cavité abdominale maternelle est en effet soumis à des contraintes physico-chimiques différentes de celles existant dans le milieu extérieur et ces contraintes particulières sont susceptibles d'affecter les échanges nécessaires au bon développement des embryons (*e.g.* respiratoire et hydrique). Certains auteurs ont montré notamment que la faible disponibilité en oxygène et la lente diffusion des gaz dissous dans l'environnement aqueux utérin sont susceptibles de générer des conditions hypoxiques de développement (Bird *et al.* 1960 ; Parker *et al.* 2004) pouvant donc affecter le métabolisme énergétique embryonnaire, en particulier durant la période de croissance exponentielle (*i.e.* augmentation exponentielle de la consommation d'oxygène) des fœtus (Clark 1953, Clark et Sissen 1956, Dmi'el 1970, Thompson et Russel 1999).

Par ailleurs, la croissance des fœtus et l'expansion volumique des œufs dans la cavité abdominale maternelle entraînent une contrainte d'encombrement pouvant occasionner une réduction de l'aptitude locomotrice (Miles *et al.* 2000, Le Galliard *et al.* 2003, Shine 2003, Chi-Xian, Ling et Xiang 2008), de l'alimentation (Shine 1980, Qualls et Shine 1998, Chi-Xian, Ling et Xiang 2008, Brischoux *et al.* 2011), et de la capacité pulmonaire de la mère (Munns 2013). Ceci peut générer des coûts d'ordre énergétique (*e.g.* altération du stock de

réserves et de la condition corporelle post-reproductive, Olsson *et al.* 2000, Lourdais *et al.* 2002, Bleu *et al.* 2011) plus important chez les femelles d'espèces vivipares (*i.e.* encombrement accru et prolongé pendant la longue gestation) que chez les femelles d'espèces ovipares (*i.e.* moindre encombrement pendant une rétention courte). L'expansion volumique de l'œuf en développement est en fait essentiellement lié à une incorporation d'eau dans ses compartiments embryonnaires et extra-embryonnaires. Ceci se produit principalement durant la phase de croissance exponentielle fœtale, c'est-à-dire pendant la deuxième moitié de la gestation chez les espèces vivipares, et après la ponte chez la plupart des espèces ovipares (Qualls et Andrews 1999b). Cette absorption d'eau durant la phase fœtale est d'une part, un processus indispensable au bon déroulement du développement embryonnaire (Packard et Packard 1988, Andrews 1997, Lourdais *et al.* 2015) et, d'autre part, est restreinte dans l'environnement utérin en raison de la limite d'expansion imposée par le volume abdominal maternel (Qualls et Andrew 1999). Cette limitation de l'approvisionnement hydrique des œufs dans l'environnement utérin pourrait donc avoir des conséquences développementales et, ainsi, constituer l'un des coûts associés à l'évolution de la viviparité chez les squamates (Qualls et Andrews 1999b). Les deux corrélats physiologiques de la viviparité évoqués ci-dessus : environnement utérin i) hypoxique et ii) limitant l'expansion volumique et l'approvisionnement hydrique des œufs et fœtus, apparaissent donc comme des contraintes supplémentaires susceptibles de moduler les effets des conditions thermiques de développement.

Nous avons mis ici à profit l'existence d'une bimodalité de reproduction chez *Zootoca vivipara* pour réaliser une étude simultanée de l'effet du mode de reproduction et de l'effet des cycles thermiques de développement sur la phénologie reproductive et les performances reproductives maternelles (*i.e.* date de parition, succès reproducteur, condition corporelle et physiologique post-reproductive) ainsi que sur les traits phénotypiques (*i.e.* taille, poids et

condition corporelle de naissance), et les performances des nouveau-nés (*i.e.* aptitude locomotrice, comportement exploratoire, survie postnatale) chez la forme ovipare et la forme vivipare de cette espèce. Dans cette étude, un lot de femelles ovipares (et pontes) et un lot de femelles vivipares ont chacun été répartis dans deux sous-lots soumis à des cycles thermiques contrastés, l'un permettant un long accès à la température optimale de développement (régime M mimant la thermorégulation maternelle lors d'une journée ensoleillée) et l'autre correspondant à un accès beaucoup plus court à cette température optimale (régime N mimant des conditions thermiques rencontrées dans des sites naturels de ponte). Cette approche vise à évaluer i) si les bénéfices reproducteurs procurés par un accès long à la température optimale de développement sont identiques chez les formes ovipares et vivipares de *Zootoca vivipara*, et ii) si certains de ces bénéfices sont amoindris dans la forme vivipare en raison des contraintes additionnelles propres à ce mode de reproduction.

Matériel et méthodes

Présentation de l'espèce et origine des échantillons

Zootoca vivipara est un petit lézard (adultes mesurant 45 à 75 mm de longueur entre museau et cloaque), de la famille des lacertidés vivant généralement dans les habitats humides. Cette espèce présente des populations vivipares réparties dans toute l'Eurasie septentrionale, ainsi que des populations ovipares exclusivement localisées en bordure méridionale de l'aire de répartition (Surget-Groba *et al.* 2001). Dans la forme vivipare comme dans la forme ovipare, l'essentiel du développement embryonnaire se fait par assimilation du vitellus (approvisionnement lécithotrophique) qui a été incorporé aux ovocytes avant ovulation (Panigel 1956). Les femelles vivipares réalisent une gestation (jusqu'au stade embryonnaire terminal 40 : nomenclature de Dufaure et Hubert 1961) tandis que la ponte des femelles ovipares intervient entre les stades embryonnaires 30-35 ce qui correspond

approximativement à la moitié du développement (Brana *et al.* 1991 ; Heulin *et al.* 1991,2002 ; Andrew 2004).

Les animaux utilisés dans notre étude proviennent de la population ovipare de Louvie, (Pyrénées-Atlantiques, France, 43° 06' N, 0° 23' W, alt. 370 m) et de la population vivipare de Paimpont (Bretagne, France, 48°01'N, 2°10'W, alt. 155 m). Ces populations ont précédemment fait l'objet de nombreuses investigations reproductives, développementales et démographiques (Heulin 1985,1988, Heulin *et al.*1991, 1994, 1997, Stewart *et al.* 2004, 2009). Dans ces populations, 20 mâles et 30 femelles ont été capturés en août 2013. Les individus ont ensuite été transportés au laboratoire où ils ont été maintenus en condition standard d'élevage pendant 6 mois (voir ci-dessous). Afin d'évaluer les effets d'un accès long *vs.* court à la température optimale de développement, les femelles ont ensuite été transférées dans des enceintes thermorégulées en mars 2014.

Maintien en captivité et initiation de la reproduction avant l'expérimentation

Les lézards ont été élevés individuellement dans des terrariums en plastique transparent. Chaque terrarium (30x20x20 cm) était équipé d'un abri, d'une coupelle de nourriture et d'eau *ad libitum*. Une ampoule à incandescence de 40W permettait de procurer au lézard une zone de thermorégulation comportementale durant 6h/Jours. Une large fenêtre permettait en outre de maintenir un éclairage naturel dans la salle d'élevage. Pour obtenir et synchroniser la reproduction des femelles (*i.e.* émergence, vitellogénèse et ovulation), les lézards ont été mis en hibernation au laboratoire selon un protocole standard (Gavaud 1983, résumé dans Foucart *et al.* 2014). Les femelles ont été sorties d'hibernation le 4 février 2014. Durant la troisième semaine post hibernation elles ont été accouplées avec les mâles puis ont été transférées le 3 mars 2014 dans les enceintes climatiques expérimentales.

Détermination de la date d'ovulation

Un examen échographique (Sonosite microMaxx, Inc., Bothell, WA, USA) a été réalisé lors du transfert des femelles dans les enceintes climatiques expérimentales puis tous les 7 jours jusqu'à ovulation. L'échographie permet de distinguer les femelles vittélogéniques (*i.e.* follicules sphériques en grappe au milieu de la cavité cœlomique) des femelles ayant ovulé (*i.e.* ovules ellipsoïdes alignés dans les oviductes) (Gilman et Wolf, 2007). Une majorité de femelles (n=36) présentaient des œufs très récemment ovulés dès le 4 mars 2014, alors que d'autres femelles (n=14) ont ovulé entre 1 et 7 jours plus tard.

Définition des traitements thermiques expérimentaux

Deux traitements thermiques expérimentaux qui ont été conçus de façon à procurer un accès plus ou moins long à une température (31°C) optimale en termes de vitesse et de qualité du développement embryonnaire chez *Zootoca vivipara* (Rodriguez Diaz *et al.* 2010, Rodriguez Diaz et Bana 2011a). Cette valeur de 31°C correspond en effet au seuil thermique au-delà duquel apparaissent une diminution du succès et de la qualité de développement (Rodriguez Diaz *et al.* 2010, Rodriguez Diaz et Bana 2011a et b). Cette température correspond aussi à la température corporelle préférée des femelles ovipares gravides (Rodriguez-Diaz *et al.*, 2010) et des femelles vivipares gestantes (Le Galliard *et al.* 2003). Les cycles journaliers des traitements thermiques expérimentaux « M » (moyenne journalière \pm ES : $20.1 \pm 6.6^\circ\text{C}$) et « N » (moyenne \pm ES $18.9 \pm 4.9^\circ\text{C}$) comportent une très large portion commune et diffèrent essentiellement par la durée d'accès à la température de 31°C qui est atteinte dans la partie médiane du cycle pendant 6 heures pour le régime « M » et pendant seulement 1 heure pour le régime « N » (Figure 1). D'un point de vue éco-éthologique, le régime « M » (abréviation de Mère ou Mother) a été conçu pour mimer le cycle de température corporelle d'une femelle en phase de rétention intra-utérine des œufs durant une

journée bien ensoleillée permettant une thermorégulation comportementale optimale et prolongée. Le traitement thermique « N » (abréviation de Nid ou Nest) se rapproche d'une situation réaliste d'incubation des œufs dans un site naturel de ponte. Ce régime « N » a été établi en fonction d'un enregistrement précédemment réalisé pendant 86 jours (thermistance à 1 mesure/heure du 20 juin au 4 septembre 1992) dans la population ovipare de Louvie, à 2cm de profondeur dans un bombement de sphaignes exposé au sud (*i.e.* localisation typique d'un site de ponte dans cette population : voir Heulin *et al.* 1994).

Traitement expérimental des femelles et des pontes

Les terrariums des femelles effectivement accouplées dans notre élevage (n=28 ovipares et n=24 vivipares) ont été transférés le 3 mars dans des enceintes climatiques thermorégulées. Dans ce contexte, ces femelles ne disposaient d'aucune possibilité de thermorégulation comportementale par exposition à un rayonnement (pas de lampes chauffantes) et leurs températures corporelles étaient donc déterminées par les traitements thermiques expérimentaux (soit M soit N). Un tube fluorescent fixé à l'extérieur de la porte vitrée de chaque enceinte a permis un éclairage (sans émission de chaleur) des terrariums avec une photopériode de 12 heures de nuit/12 heures de jour. Les femelles ont été équitablement exposées soit au traitement thermique M (n=14 ovipares et n=13 vivipares) soit au traitement thermique N (n=14 ovipares et n=12 vivipares) pendant la totalité de leur période de rétention intra-utérine des œufs. Chez la forme ovipare la moitié des œufs de chaque ponte a été utilisée pour une autre expérimentation. Les œufs conservés pour l'étude présentée ici ont été maintenus dans le même traitement thermique (soit N soit M) que celui de la femelle qui les avait pondus. Les œufs ont été incubés sur du sable saturé d'eau, selon la procédure habituellement utilisée dans notre laboratoire (Heulin 1988, Heulin *et al.* 2000, 2002).

Condition corporelle et Taux de corticostérone post-reproductif des femelles

Pour évaluer d'éventuelles variations des coûts maternels de reproduction entre les lots expérimentaux, la condition corporelle (relation poids-taille) post-reproductive des femelles, ainsi que leurs taux de corticostérone plasmatique (pouvant refléter leur niveau de stress chronique) ont été mesurés. Le dosage de corticostérone a été réalisé via un prélèvement sanguin par voie infra-orbitale, d'une quantité maximale de 60µl à la parition puis à 30 jours post-parition. Notre procédure de prélèvement a été conforme à ce qui est employé par d'autres auteurs pour caractériser le stress chronique par dosage de la corticostérone de *Zootoca vivipara* (Meylan *et al.* 2003). Les dosages de corticostérone de nos prélèvements sanguins ont été effectués par Sandrine Meylan (UMR n°7625, Université Pierre et Marie Curie, Paris) selon la procédure utilisée en routine dans son laboratoire (Wingfield *et al.* 1992, Meylan *et al.* 2003).

Phénologie et succès reproducteur

La durée totale de développement correspond à la période comprise entre la date d'ovulation et la date de naissance (*i.e.* éclosion des œufs ovipares, mise bas des femelles vivipares). En outre nous avons distingué chez les ovipares la période de rétention intra-utérine (de l'ovulation à la ponte) et la période d'incubation externe des œufs (de la ponte à l'éclosion).

Le succès reproducteur a été défini comme le nombre de nouveau-nés vivants sur le nombre total des ovules produits (*i.e.* incluant les œufs non fertilisés, les embryons morts, les mort-nés et les nouveau-nés viables). Ne pouvant pas distinguer visuellement les œufs non fertilisés et les embryons morts précocement, nous les avons regroupés dans une même catégorie nommée « ovules non développés ».

Caractéristiques corporelles et sexage à la naissance

Les nouveau-nés ont été pesés (± 1 mg) et mesurés à J0. Les variables biométriques de longueur de la partie céphalo-cervicale, de la longueur museau-cloaque (SVL) et de la longueur totale du museau au bout de la queue (TL) ont été mesurées ($\pm 0,01$ mm) en utilisant les images numériques (scan) de la face ventrale des individus. Les scans des nouveau-nés ont été réalisés avec une résolution de 600 Dpi (scan de la face ventrale des lézards, CanoScan 8800F, Canon) et les mesures ont été réalisées sous le logiciel Inkscape (logiciel libre, sous licence GPL, version 0.48.5).

Les nouveau-nés ont été sexés par un comptage des écailles ventrales des deux séries médio-ventrales, entre la plaque anale et le collier. Cette technique de sexage, qui nécessite un calibrage pour chaque population, est utilisée en routine dans de nombreux suivis démographiques (en Bretagne - Heulin 1985 -, dans les Cévennes - Lecomte *et al.* 1992 - et dans les Pyrénées - Heulin *et al.* 1997). Dans notre étude le taux d'assignement correct a été évalué à 97% grâce à la possibilité d'un nouveau sexage visuel des individus maintenus en enclos et re-capturés en juillet-septembre (n=37). Nos comptages ont également permis de dénombrer les anomalies d'écaillage (dissymétries entre la série gauche/série droite) afin d'évaluer si nos traitements expérimentaux avaient pu en modifier la fréquence.

Performances d'endurance

Les tests d'endurance ont été effectués pour tous les nouveau-nés à J+1 dans une pièce stabilisée thermiquement entre 25° et 28°C (moyenne 26.91°C \pm 0.83). Avant chaque test, les individus ont été acclimatés pendant 1h à la température de la pièce dans un conteneur opaque disposé au centre du dispositif. Les tests d'endurance ont été effectués sur une piste circulaire inspirée du dispositif utilisé par Clobert *et al.* (2000). La piste (diamètres extérieur/intérieur : 60cm/50cm) était délimitée par des parois de plexiglas opaques de 15cm de haut et comportait

un support enduit de sable fin collé, procurant une bonne adhérence lors des déplacements des lézards.

Lors du test, le lézard est placé sur la piste, puis stimulé par de légers coups de pinceau sur la queue au départ de la course, puis à chaque arrêt. L'endurance a été définie comme le temps total de course effectué jusqu'à ce que l'individu s'arrête et refuse de reprendre sa course malgré 10 nouvelles stimulations successives (Clobert *et al.* 2000). La durée de course jusqu'au premier arrêt (latence de premier arrêt) ainsi que le nombre d'arrêts intervenus au cours du test ont par ailleurs été relevés.

Performance exploratoire

Des mesures de l'activité locomotrice et exploratoire des nouveau-nés ont été réalisées à J+2 dans un espace ouvert de 365 x 207 mm pourvu d'un revêtement (bulgomme) facilitant les déplacements des individus. Un abri (H 30 x L 100 x l 60 mm) a été placé à chaque extrémité du dispositif. Ce dispositif était installé dans une pièce calme et stabilisée thermiquement entre 23 et 30°C ($26 \pm 0,86$). Les tests ont été réalisés après une période d'acclimatation d'1h, durant laquelle l'individu est placé dans un contenant opaque disposé au centre du dispositif. Le test consiste à placer un nouveau-né au centre du dispositif et à enregistrer son comportement durant l'heure qui suit (caméra vidéo SONY Handycam Xr100/101). Pour éliminer toute odeur résiduelle, l'ensemble du dispositif a été nettoyé à l'éthanol 70% après chaque test.

Nous avons caractérisé le comportement exploratoire (logiciel Avidemux 2.6) en comptant le nombre de secteurs visités (l'espace disponible étant subdivisé en six secteurs d'égales surfaces), le nombre de visites des abris et en quantifiant le temps total passé sous ces abris.

Survie en enclos semi-naturels et croissance

Tous les nouveau-nés ont été identifiés individuellement par amputation de phalanges et placés en enclos semi-naturels à J+3 après leur naissance. Les enclos (4m x 4m) contenaient une végétation bien développée et un abondant peuplement d'arthropodes (*i.e.* la nourriture de nos lézards) dès le début de notre expérimentation. Un arrosage quotidien entre 16h00 et 17h00, un entretien régulier de la végétation des enclos et un apport alimentaire additionnel (en grillons juvéniles) ont permis de maintenir de bonnes conditions de développement des juvéniles tout au long de notre suivi. Les enclos étaient équipés d'abris et de divers substrats de thermorégulation (plaque en caoutchouc, dalle de béton, graviers, briques alvéolaires).

Les nouveau-nés ont été distribués dans 10 enclos différents, en fonction de la portée, du mode de reproduction ainsi que du traitement thermique duquel ils étaient issus. Ainsi, les variations inter-enclos par rapport à l'exposition solaire, aux communautés animales et végétales, etc étaient distribuées de façon homogène pour tous les sous-groupes issus de notre expérimentation. Cette répartition a été faite progressivement, en fonction du flux de naissances : l'effectif introduit s'accroît donc au cours du temps, mais n'est jamais différent d'un enclos à l'autre reflétant ainsi une situation « naturelle » réaliste où les naissances s'étaleraient dans le temps.

Deux périodes de recaptures (du 1er au 15 juillet et du 1er au 15 septembre 2014) ont permis de réaliser un suivi de survie des juvéniles dans les enclos. Ces recaptures ont été effectuées par un piégeage passif (contenant enterré) complété par des captures manuelles.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont toutes été réalisées à l'aide du logiciel R (The R foundation for statistical computing, version 3.0.1) à l'exception des analyses de survie (cf plus bas). Tous les modèles linéaires ou modèles linéaires mixtes ont été réalisés grâce aux packages

lme4, car et multcomp. Pour les variables maternelles, nous avons utilisé des modèles linéaires généralisés GLM avec le mode reproducteur et le traitement thermique comme facteurs fixes. Pour tous les traits juvéniles, nous avons utilisé des modèles linéaires mixtes généralisés GLMM en utilisant le sexe, le mode reproducteur et le traitement thermique comme facteurs fixes, et en ajoutant l'identité de la mère en facteur aléatoire. Certains de nos modèles comportent en outre une co-variable permettant une pondération adaptée à la mesure. Les lois de probabilité appliquées à nos modèles correspondaient à une loi gaussienne pour les variables continues, une loi de Poisson pour les données de comptage et une loi binomiale pour les données de présence/absence. Dans tous les cas, le modèle général de départ a été simplifié en utilisant la procédure de sélection de modèles selon leurs AIC fournie par la fonction Dredge du Package MuMIn. Les tests statistiques ont exclusivement été appliqués aux facteurs (ou interactions) retenus dans le modèle simplifié. Les tests post-hocs ont été réalisés en utilisant un test HSD Tuckey. La normalité des données (test de Shapiro-Wilk) et l'homogénéité des variances (test F) ont été testées avant chaque analyse statistique. Certaines de nos données ont dû subir une transformation Log pour satisfaire aux critères d'utilisation des tests paramétriques, tandis que d'autres données ont nécessité l'emploi de tests non paramétriques. Les degrés de liberté des F-statistiques utilisés dans les tests portant sur des modèles linéaires mixtes ont été calculés avec la correction de Kenward–Roger (Bolker *et al.* 2009).

Les données de captures-recaptures des juvéniles en enclos, permettant de distinguer la survie S1 entre la naissance et juillet et la survie S2 de juillet à septembre, ont été modélisées à l'aide des logiciels MSURGE 1.8 (Choquet *et al.* 2004, 2006) et MARK 7.1 en suivant la méthodologie préconisée par Le breton *et al.* (1992), permettant de tester les effets généraux (différences entre sous-groupes ou périodes) et de sélectionner le meilleur modèle simplifié (de moindre AICc). Nous avons ensuite testé la possibilité d'amélioration du modèle simplifié

sélectionné, en incorporant à la modélisation des covariables individuelles de naissance (date de naissance, poids à la naissance, condition corporelle et endurance à la naissance). En plus de la procédure de sélection des modèles de capturabilité et survie par les AICc, nous avons systématiquement effectué des tests de comparaisons permettant de vérifier que toutes les sélections-simplifications envisagées étaient bien statistiquement acceptables (Log likelihood ratio test LRT: valeur de χ^2 calculée comme la différence de déviance entre deux modèles emboîtés).

Résultats

Condition corporelle et taux de corticostérone post-reproductifs des femelles

L'analyse de la relation entre log (poids) et log (taille) met en évidence une interaction avec le stade reproducteur (différence significative de pentes avant vs. après reproduction des femelles ; ANCOVA $F_{1,25}=6.62$, $P=0.01$) (Figure 2). L'étude de la condition corporelle nécessite donc de considérer séparément ces deux stades phénologiques.

Avant la reproduction, plus les femelles sont grandes, plus leur poids est important (ANCOVA $F_{1,25}=31.59$, $P<0.001$; $R^2=0.63$) sans effets d'interaction significatifs avec les autres facteurs. A ce stade pré-reproducteur aucune différence de condition corporelle n'a été observée ni entre les femelles vivipares et ovipares, (comparaison d'ordonnées à l'origine : ANCOVA $F_{1,25}=0.57$, $P=0.45$), ni entre les futures assignations aux traitements thermiques (ANCOVA $F_{1,25}=0.43$, $P=0.51$).

Après la reproduction, les femelles les plus grandes ont un poids plus important (ANCOVA $F_{1,25}=20.25$, $P<0.001$; $R^2=0.74$) sans effet d'interaction significatif avec les autres facteurs. A ce stade post-reproducteur, la condition corporelle des femelles est meilleure chez les femelles vivipares que chez les femelles ovipares (comparaison d'ordonnées à l'origine :

ANCOVA, $F_{1,25}=16.71$, $P<0.001$), mais aucun effet des traitements thermiques n'a été observé (ANOVA $F_{1,25}=0.07$, $P=0.80$).

Les taux de corticostérone plasmatique des femelles augmentent significativement entre le jour 1 et le jour 30 de la période post-reproductive (à J+1 : 118.19 ± 90.53 ng.mL⁻¹ ; à J+30 : 150.35 ± 69.85 ng.mL⁻¹ ; ANOVA, $F_{1,37.21}=8.33$, $P=0.006$) mais il n'y a pas d'effet du mode de reproduction des femelles ($F_{1,37.34}=0.39$, $P=0.53$), ni d'effet du traitement thermique précédemment subi par les femelles ($F_{1,37.36}=0.87$, $P=0.36$).

Succès de la reproduction

Parmi les femelles ovipares la majorité d'entre elles ont produit des pontes dont tous les œufs ont pu être incubés jusqu'à l'éclosion de nouveau-nés en bonne santé ($n=9/14$ en N et $n=10/14$ en M). Les autres femelles ont soit produit des pontes totalement stériles, soit n'étaient pas reproductrices et n'ont pas été intégrées dans le calcul du succès reproducteur. Le succès reproducteur des femelles ovipares a été de 85% en régime N et de 100% en régime M (Tableau 1). Les femelles vivipares ayant produites des portées complètes de nouveau-nés en bonne santé sont peu nombreuses (0/12 en traitement thermique N et 2/13 en traitement thermique M). Les femelles vivipares ayant produites des portées partielles de nouveau-nés en bonne santé sont plus nombreuses (8/12 en N et 9/13 en M). Les échecs partiels de leur reproduction sont relatifs à la présence d'œufs non fécondés ou, plus fréquemment, à la présence d'embryons morts en fin de développement (stade embryonnaire 39-40). Les autres femelles ont soit produit des pontes totalement stériles ou n'étaient pas reproductrices et, comme pour les femelles ovipares, n'ont pas été incluses dans le calcul du succès reproducteur. Le succès reproducteur des femelles vivipares a été de 33% en régime N et de 60% en régime M (Tableau 1). Ces données révèlent un effet significatif du traitement

thermique ($\text{Chisq}=10.43$, $\text{df}=1$, $\text{P}=0.001$) et du mode de reproduction ($\text{Chisq}=33.54$, $\text{P}<0.001$) sur le succès reproducteur (Tableau 1).

Phénologie de la reproduction

Avant la phase expérimentale, les femelles présentaient une phénologie de leur reproduction synchrone. Leurs dates moyennes d'ovulation se situaient entre 28 et 30 jours post-hibernation sans différences significatives entre les groupes de femelles (traitement thermique : ANOVA, $F_{1,30}=0.20$, $\text{P}=0.65$; Mode reproducteur : ANOVA, $F_{1,30}=0.12$, $\text{P}=0.73$). Lors de l'expérimentation, les quatre lots expérimentaux ont présenté des différences de phénologie reproductive (Tableau 1). Chez la forme ovipare, le traitement thermique M a réduit la durée de rétention intra-utérine (ANOVA $F_{1,16}=24.47$, $\text{P}<0.001$) ainsi que la durée d'incubation externe des œufs (test t, $t=24.89$, $\text{df}=19.95$, $\text{P}<0.001$). La durée totale de développement embryonnaire (de l'ovulation à la naissance) est également diminuée pour les individus issus du traitement thermique M (ANOVA, $F_{1,29,01}=80.43$, $\text{P}<0.001$) sans différence entre les modes reproducteurs (ANOVA, $F_{1,29}=0.07$, $\text{P}=0.79$).

Sex-ratio

La modélisation des données (GLMM) ne révèle pas d'effet des traitements thermiques ou du mode reproducteur sur le sex-ratio des nouveau-nés. Les valeurs ne s'écartent pas de l'équilibre (50% mâles, 50% femelles : test $\chi^2=2.46$, $\text{df}=1$, $\text{P}=0.125$).

Effets du traitement thermique sur les nouveau-nés

Les modélisations des caractéristiques à la naissance et leurs simplifications (Tableau 2) n'ont conduit à retenir un effet significatif du traitement thermique que sur trois variables, ainsi qu'un effet marginalement significatif sur le nombre d'anomalies d'écaillage ($\text{N}<\text{M}$,

Wald $\chi^2=3.59$, $df=1$, $P=0.058$). La longueur tête-cou des nouveau-nés est significativement plus petite pour les individus issus du régime N que pour ceux issus du régime M (ANOVA, $F_{1,30.58}=7.01$, $P=0.01$) mais l'écart entre les valeurs reste très faible (Tableau 2). Le traitement thermique influence également certaines performances locomotrices et exploratoires des nouveau-nés. L'endurance des mâles est ainsi plus grande pour les individus issus du traitement M (Tukey HSD post-hoc test, $P<0.001$) et nous observons un effet d'interaction entre le traitement thermique et le sexe sur le nombre d'abris visités (Wald $\chi^2=204752$, $df=1$, $P<0.001$), le traitement M induisant une augmentation de la fréquentation des abris chez les femelles et une réduction de la fréquentation des abris chez les mâles (tous les tests post-hoc Tukey HSD $P<0.001$).

Effets du mode reproducteur sur les nouveau-nés

Des différences morphologiques très nettes ont été identifiées entre les nouveau-nés ovipares et vivipares (Tableau 2). Il apparaît notamment que les nouveau-nés ovipares sont plus lourds (ovipares : 228 ± 28 mg ; vivipare : 180 ± 25 mg ; ANOVA, $F_{1,31.77}=77.67$, $P<0.001$) et plus grands (*i.e.* TL) que les nouveau-nés vivipares (ANOVA $F_{1,31.38}=47.46$, $P<0.001$). L'étude de la relation log (poids)-log (taille) indique aussi que la condition corporelle des nouveau-nés ovipares est meilleure que celle des nouveau-nés vivipares (comparaison d'ordonnées à l'origine ANCOVA, $F_{1,43.65}=52.14$, $P<0.001$).

Cette différence entre les modes reproducteurs se manifeste aussi pour certaines caractéristiques locomotrices des nouveau-nés. Les ovipares ont une meilleure endurance que les vivipares (68.40 ± 24.58 sec pour les ovipares ; 54.06 ± 22.40 sec pour les vivipares, ANOVA $F_{1,25.98}=12.29$, $P=0.002$). Le premier arrêt intervient plus tardivement durant la course chez les ovipares que chez les vivipares (4.67 ± 1.45 sec pour les ovipares/ $3,73\pm 1,78$ sec pour les vivipares, ANOVA, $F_{1,27.68}=5.93$, $P=0.022$). Par ailleurs, les comportements de visite

d'abris ont été moins observés chez les ovipares que chez les vivipares (Wald $\chi^2=49113$, $df=1$, $P<0.001$).

Modélisation des survies en enclos

La procédure de simplification des paramètres de capturabilité permet de retenir un modèle (AICc=206) correspondant à une capturabilité constante de 0.88 (intervalle de confiance : 0.71 à 0.96), sans différence entre les modes de reproduction (LRT $\chi^2=0.040$, $df=1$, $P=0.8416$), ni entre les sexes (LRT $\chi^2 =1.344$, $df=1$, $P=0.25$), ni entre les deux traitements thermiques (LRT $\chi^2=0.035$, $df=1$, $P=0.85$). Avec cette capturabilité constante, la modélisation des paramètres de survie (voir Tableau d'Annexe 1) conduit à retenir un modèle simplifié (AICc=186) sans différence de survie entre les sexes (LRT $\chi^2=4.338$, $df=4$, $P=0.36$), ni entre les deux traitements thermiques (test LRT $\chi^2=2.398$, $df=4$, $P=0.63$) mais qui comporte en revanche une variation significative de survie entre les deux périodes considérées (LRT $\chi^2=15.997$, $df=2$, $P<0.001$) ainsi qu'entre les deux modes de reproduction (LRT $\chi^2=6.796$, $df=2$, $P=0.03$). Les estimations de survie (et leur IC=intervalle de confiance à 95%) issues de ce modèle simplifié sont : pour la période 1 de la naissance à juillet $S1=0.55$ (IC : 0.39-0.70) chez les ovipares et $S1=0.33$ (IC : 0.21-0.48) chez les vivipares. Pour la période 2 de juillet à septembre $S2=0.66$ (IC : 0.40-0.86) chez les ovipares et $S2=0.97$ (IC : 0.62-1.00) chez les vivipares. L'adjonction de covariables individuelles de naissance à ce modèle simplifié révèle que, parmi les covariables testées (voir Tableau d'Annexe 2), seul l'effet du poids à la naissance sur la survie pendant la première période a permis d'améliorer la modélisation (AICc=182). Une relation commune aux ovipares et vivipares (Figure 4) permet de rendre compte de leur différence de survie $S1$ entre la naissance et juillet (0.33 pour vivipares vs. 0.55 pour ovipares).

Discussion

Les effets de la simulation d'une thermorégulation maternelle

La température est susceptible d'influencer fortement l'intensité des processus métaboliques et la vitesse des processus développementaux des animaux ectothermes (Anguiletta 2002). Notre étude a effectivement révélé qu'un accroissement du temps d'accès à la température optimale de développement (*i.e.* notre régime M) entraîne une accélération importante du développement à la fois lors de la période de rétention des femelles ovipares, lors de la période d'incubation des œufs et lors de la gestation des femelles vivipares. Le succès reproducteur des femelles était plus élevé en condition chaude M qu'en condition froide N aussi bien chez les vivipares (60% vs. 33%) que chez les ovipares (100% vs. 85%).

Comparativement aux caractéristiques observées lors du développement dans un traitement thermique simulant celui d'un site de ponte (régime N), notre simulation d'une thermorégulation maternelle (régime M) durant l'ensemble du développement n'a pas occasionné de modifications importantes du phénotype ou des performances des juvéniles ovipares et vivipares.

En dépit des dates de naissance différentes qu'ils ont induites, les différents traitements thermiques expérimentaux n'ont pas affecté la survie postnatale des individus dans les enclos semi-naturels. Ainsi, bien qu'une naissance plus précoce semble pouvoir influencer favorablement la probabilité de survie des nouveau-nés chez certaines espèces (LeHenanff *et al.* 2013, Shine et Harlow 1993, Wapstra *et al.* 2010), nous n'avons pas mis en évidence une telle relation dans le cadre de notre expérimentation sur *Z. vivipara*. Cette absence d'influence de la date de naissance sur la survie néonatale dans nos enclos doit néanmoins être considérée avec précaution, dans la mesure où nos conditions expérimentales très particulières (femelles sorties d'hibernation artificielle dès février) ont induit des dates de naissance anormalement précoces (de fin avril à fin mai) par rapport à la phénologie des populations naturelles de

l'espèce (naissances les plus précoces début juillet les années chaudes). On ne peut donc pas totalement exclure qu'un tel décalage saisonnier artificiel (uniquement dû à notre expérimentation) ait pu placer les nouveau-nés dans des conditions écoclimatiques anormales, empêchant éventuellement l'expression de performances de survie qui se seraient manifestées lors d'un cycle naturel (naissances plus tardives dans la saison).

Performances ovipares vs. vivipares

L'accélération du développement des individus exposés au régime « M » par rapport à ceux exposés au régime « N » a été identique chez la forme ovipare et la forme vivipare. Il n'existerait donc pas de différence de sensibilité thermique de la vitesse de développement entre les populations ovipares et vivipares utilisées dans notre étude (et voir aussi Heulin *et al.* 1991). De manière générale, le succès reproducteur des femelles vivipares était inférieur à celui des femelles ovipares, aussi bien dans notre condition expérimentale froide N (33% vs. 85%) que dans notre condition expérimentale chaude M (60% vs. 100%). Le faible succès reproducteur des individus vivipares observé dans notre expérimentation contraste avec les valeurs beaucoup plus élevées (de l'ordre 90% dans un régime de type M) observées lors d'études de femelles gestantes vivipares maintenues en laboratoire lors de courtes périodes (2 à 6 semaines, *e.g.* Meylan *et al.* 2010). De précédentes études ont établi que chez les femelles vivipares de *Z. vivipara* le taux plasmatique de corticostérone est maximal pendant l'hibernation (67ng/ml), il chute à une valeur minimale à la sortie d'hibernation et pendant la vitellogénèse (13ng/ml), il réaugmente jusqu'à la fin de gestation (45ng/ml), il chute à nouveau au moment de la parturition (24ng/ml) et enfin réaugmente graduellement (33ng/ml) durant la période post-reproductive pré-hivernale (Dauphin-Villemant 1987). L'augmentation post-reproductive que nous avons observée dans nos lots expérimentaux concorde donc avec celle mentionnée par Dauphin-Villemant (1987), mais les taux que nous avons mesurés sont 4

à 5 fois plus élevés que ceux mentionnés par cet auteur. Dauphin-Villemant (1987) a par ailleurs signalé que, comparativement à des femelles captives depuis une dizaine de jours, des taux de corticostérone deux fois plus élevés chez des femelles captives depuis 3 mois ont été observés, suggérant un état de stress chronique accru par la captivité. Il se pourrait donc que la très longue période de captivité (9mois) et nos conditions expérimentales aient généré des contraintes particulières et soient à l'origine des taux élevés de corticostérone observés dans notre étude.

La différence de succès reproducteur entre nos lots expérimentaux ovipares et vivipares pourrait être liée à leur différence de durée de rétention intra-utérine des œufs (courte chez ovipares / longue chez vivipares). Les travaux expérimentaux de Meylan *et al.* (2010) ont en effet montré qu'une élévation artificielle du taux de corticostérone maternel pendant la gestation (provoquée par administration transdermique) induisait une diminution significative du succès reproducteur (% de nouveau-nés viables) chez les femelles vivipares de *Zootoca vivipara*. Il se pourrait donc que le taux élevé de corticostérone observé chez nos femelles expérimentales ait, selon la durée d'exposition des embryons à cette hormone ait été courte (rétention ovipare) ou longue (gestation vivipare), constitué l'une des causes de différence de succès reproducteur observée entre les deux formes reproductrices durant notre expérimentation. Nos conditions expérimentales, même si elles ont été potentiellement stressantes, n'ont en revanche pas affecté la condition corporelle post-reproductive des femelles dans le sens prédit. L'hypothèse d'une moins bonne condition corporelle post-reproductive des femelles vivipares (*i.e.* en raison de leur longue gestation et de leur encombrement abdominal accru) est en effet contredite par nos données. Il se peut que la présence de nourriture *ad libitum* dans les terrariums ait permis une amélioration de la condition corporelle maternelle pendant la reproduction (*e.g.* par accumulation de réserves

adipeuses) plus prononcée chez les femelles vivipares (période d'expérimentation plus longue donc augmentation de la possibilité d'acquisition énergétique) que chez les femelles ovipares. De précédentes études ont révélé que, chez *Zootoca vivipara*, les nouveau-nés vivipares étaient en moyenne moins lourds que les nouveau-nés ovipares (Michel 1995, Stewart *et al.* 2009, Roitberg *et al.* 2013). Dans notre étude, les nouveau-nés vivipares obtenus étaient significativement moins grands (-2,2mm soit -8%), moins lourds (-37 mg, soit -20%) et finalement en moins bonne condition corporelle que les nouveau-nés ovipares. Or, dans les populations que nous avons étudiées, l'investissement unitaire initial (quantité de vitellus par ovule) est identique chez les femelles ovipares et vivipares (Stewart *et al.* 2009). L'impact de certaines contraintes propres à gestation, telles que des conditions hypoxiques de développement (Parker *et al.* 2004) et une limitation de l'approvisionnement hydrique des œufs dans l'environnement utérin (Qualls et Andrew 1999) pourrait donc affecter l'assimilation du vitellus et la croissance fœtale et, ainsi, contribuer à expliquer le moindre poids et la moins bonne condition corporelle des nouveau-nés vivipares. La condition corporelle plus chétive des nouveau-nés vivipares contribue vraisemblablement à expliquer leur moindre endurance (-27s soit -34%) et leur premier arrêt de course intervenant plus précocement (-1,4s soit -27%) par rapport aux nouveau-nés ovipares.

Les analyses de survie postnatale en enclos ont également révélé une meilleure survie chez les juvéniles ovipares en début de période (de la naissance au mois de juillet), et une inversion de cette tendance en faveur des juvéniles vivipares en deuxième période (juillet à septembre). Parmi les caractéristiques individuelles à la naissance testées dans les modélisations, le poids à la naissance semble effectivement avoir affecté significativement la survie initiale (naissance à juillet) des nouveau-nés. Le poids moyen de naissance beaucoup plus élevé des nouveau-nés ovipares (+25% par rapport à celui des vivipares) a donc très vraisemblablement contribué à la meilleure survie observée chez les ovipares durant les premières semaines de

vie (naissance à juillet). Inversement, la survie ultérieure (juillet à septembre) a été meilleure chez les juvéniles vivipares et ne semble pas avoir été influencée par le poids à la naissance.

Effets thermiques vs. Effets des modes de reproduction

De manière générale les effets de notre manipulation des cycles thermiques n'ont pas été notablement différents pour les individus de la forme ovipare et ceux de la forme vivipare de *Zootoca vivipara*. Lors de la conception de cette expérimentation, nous nous sommes volontairement astreints à un choix de cycles thermiques restant dans une gamme biologiquement réaliste par rapport aux situations naturelles (M = thermorégulation maternelle par beau temps / N = températures horaires moyennes dans un site de ponte). Ce choix, qui ne comporte donc pas de températures véritablement « extrêmes » pour l'espèce, est vraisemblablement à l'origine du peu d'effets thermiques constatés dans notre étude. Cependant, notre régime N ne simule que les conditions thermiques moyennes d'un site de ponte, et ceci supprime donc artificiellement l'occurrence possible d'épisodes extrêmes (e.g. températures pouvant occasionnellement dépasser l'optimum pour atteindre plus de 35°C), susceptibles d'affecter la survie embryonnaire et/ou la qualité du développement des individus. Ces possibles effets délétères de températures dépassant l'optimum (e.g. Anguiletta 2002, Rodriguez et Brana 2010 et 2011b) sont surtout plus fréquents dans les sites de pontes ovipares. En effet la thermorégulation maternelle des femelles vivipares contribue non seulement à une meilleure stabilité des cycles thermiques moyens de développement (e.g. Lourdaï et al. 2008, Rodriguez et Brana 2011b), mais permet aussi d'éviter beaucoup plus efficacement (i.e. retrait dans abris frais) les épisodes de trop hautes températures. Chez *Zootoca vivipara* les femelles ovipares en phase de rétention et les femelles vivipares gestantes ont des températures corporelles préférées significativement inférieures à celles des mâles et des femelles non-reproductives (Le Galliard et al. 2003, Rodriguez-Diaz et al. 2010).

Ceci corrobore l'hypothèse d'un évitement de températures plus élevées potentiellement délétères pour les embryons (Maderson et Bellairs 1962, Patterson et Davies 1978, Rodriguez Diaz *et al.* 2010, Rodriguez Diaz et Brana 2011b).

L'effet phénologique constaté dans notre étude (régime M chaud induisant des naissances plus précoces que dans le régime N plus froid) a également été identique chez les ovipares et les vivipares et n'a pas affecté la survie postnatale. Il faut cependant considérer, en terme de bénéfices potentiels, qu'un développement embryonnaire accéléré durant la phase de rétention utérine, permettant donc une parturition (ou ponte) plus précoce, est aussi susceptible de conférer des avantages énergétiques et de budget-temps à la mère. Celle-ci pourra ainsi se réinvestir plus rapidement dans des activités de préparation de sa prochaine reproduction (*e.g.* recherche de nourriture, accumulation de réserves). Lorsque les circonstances le permettent (principalement en conditions climatiques favorables de plaine), les femelles ovipares de *Zootoca vivipara* ont la faculté de se réaccoupler et de réaliser 2 pontes successives (à environ 1 mois d'intervalle) au cours de la même année, alors que les femelles vivipares ne réalisent qu'une seule gestation annuelle (Heulin *et al.* 1991, 1994, 1997). L'avantage potentiel conféré par une ponte (ou parturition) précoce semble donc principalement correspondre à une opportunité de réinvestissement reproductif immédiat dans le cas de la forme ovipare (stratégie de type Income-Breeder) et à une possibilité d'anticipation énergétique de la prochaine reproduction (stratégie de type Capital-breeder) chez la forme vivipare. Le plus grand intervalle de temps séparant deux reproductions successives est d'ailleurs considéré comme un des coûts majeurs de la viviparité par rapport à l'oviparité qui permet généralement une fréquence de ponte plus élevée (Fitch 1970, Tinkle *et al.* 1970, Tinkle et Gibbons 1977, Pilorge et Barbault 1981, et voir Heulin *et al.* 1994, 1997 pour *Zootoca vivipara*).

Bibliographie

- Andrews, R.M.** (2004). Patterns of embryonic development, in: Deeming, D.C. (Ed.), *Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 75–102.
- Andrews, R.M.** (1997). Evolution of viviparity: variation between two sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. *Journal of Zoology*. **243** : 579–595.
- Angilletta, M.J.Jr., Niewiarowski, P.H. et Navas, C.A.** (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*. **27**: 249–268
- Beuchat, C.A.** (1988). Temperatures effect during gestation in a viviparous lizard. *Journal of Thermal Biology*. **13** :135-142.
- Bird, R.B., Stewart, W.E. et Lightfoot, E.N.** (1960). *Transport phenomena*. John Wiley, New York.
- Bleu, J., Massot, M., Haussy, C. et 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 – Biological science*. **279** : 489-498.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H. et White, J.-S. S.** (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. **24** : 127-135.
- Brischoux, F., Bonnet, X. et Shine, R.** (2011). Conflicts between feeding and reproduction in amphibious snakes (sea kraits, *Laticauda spp.*). *Austral ecology*. **36** : 46-52.
- Brana, F., Bea, A et Arrayago, J.** (1991). Egg retention in lacertid lizards : relationships with reproductive ecology and evolution of viviparity. *Herpetological*. **47- 2** : 218-226.
- Burger, J.** (1990). Effects of incubation temperature on behavior of young black racers (*Coluber constrictor*) and kingsnakes (*Lampropeltis getulus*). *Journal of Herpetology*. **24** :158-163.
- Choquet, R., Reboulet, A.M., Pradel, R., Gimenez, O. et LeBreton, J. D.** (2004). M-SURGE : new software specifically designed for multistate capture-recapture models. *Animals Biodiversity and conservation*. **27-1** : 2017-215.
- Choquet, R. et al.** (2006). M-SURGE 1.8 user’s manual. CEFE, Montpellier, France.
- Clark, H.** (1953). Metabolism of the Black Snake Embryo II. Respiratory Exchange. *Journal of Experimental Biology*. **30** : 502–505.
- Clark, H. et Sisken, B. F.** 1956. Nitrogenous excretion by embryos of the viviparous snake *Thamnophis s. sirtalis*. *Journal of Experimental Biology*. **33**:384–393.
- Clobert, J., Oppliger, A., Sorci, G., Ernande, B., Swallow, J. G. et Graland, T.** (2000). Trade-offs in phenotypic traits: endurance at birth, growth, survival, predation and susceptibility to parasitism in a lizard, *Lacerta vivipara*. *Functional Ecology*. **14** : 675-684.
- Dauphin-Villemant, C.** (1987). *Etude du fonctionnement de l'interrénale (corticosurrénale) chez la femelle du lézard vivipare- Evolution au cours du cycle annuel d'activité et de reproduction*. Thèse de doctorat d'état de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 171p.
- Dmi'el, R.** (1970). Growth and metabolism in snake embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. **23** : 761–772.

- Dufaure, J.P et Hubert, J.** (1961). Table de développement du lézard vivipare : *Lacerta (Zootoca) vivipara* . *Archive Anatomie et Microscopie Expérimentale*. **50**: 309-328.
- Farmer, C.G.** (2000). Parental care: the key to understanding endothermy and other convergent features in birds and mammals. *The American Naturalist*. **155** : 326–334.
- Fitch, H.S.** (1970). Reproductive cycles in lizards and snakes. *Univesity of Kansas Publction of Museum of Natural History, Miscealeous Publication*. **52** : 1-247.
- Foucart, T., Lourdais, O., DeNardo, D. et Heulin, B.** (2014). Influence of reproductive mode on metabolic costs of reproduction : insight from the bimodal lizard *Zootoca vivipara*. *Journal of Experimental Biology*. **217** : 4049-4056.
- Gavaud, G.** (1983). Obligatory hibernation for completion of vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology*. **225**: 397-405.
- Gilman, C.A. et Wolf, B.O.** (2007). Use of portable ultrasonography as a non destructive method for estimating reproductive effort in lizards. *Journal of Experimental Biology*. **210**: 1859-1867.
- Heulin, B.** (1985). Démographie d'une population de *Lacerta vivipara* de basse altitude. *Acta Oecologica*. **6** : 261-280.
- Heulin, B.** (1988). Observations sur l'organisation de la reproduction et sur les comportements sexuels et agonistiques chez *Lacerta vivipara*. *Vie et Milieu*. **38** : 177-187.
- Heulin, B., Oseneegg, K. et Lebouvier, M.** (1991). Timing of embryonic development and birth dates in oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara* : testing the predictions of an evolutionary hypothesis. *Acta oecologica*. **12-4** : 517-528.
- Heulin, B., Oseneegg, K. et Michel, D.** (1994). Survie et incubation des œufs dans deux populations ovipares de *Lacerta vivipara* . *Amphibia-Reptilia*. **15** : 199-219.
- Heulin, B., Oseneegg, K. et Michel, D.** (1997). Demography of a bimodal reproductive species of lizard (*Lacerta vivipara*) : survival and density characteristics of oviparous populations. *Herpetologica*. **53-4** : 432-444.
- Heulin, B., Guillaume, C.P., Vogrin, N., Surget-Groba, Y et Tadic, Z.** (2000). Further evidence of the existence of oviparous population of *Lacerta(Zootoca) vivipara* in the NW of the Balkan Peninsula. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie*. **323** : 461-468.
- Heulin, B., Ghielmi, S., Vogrin, N., Surget-Groba, Y. et Guillaume, C.P.** (2002). Variation in eggshell characteristics and in intra-uterine 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.
- Le Breton, J. D., Burnham, K., Clobert, J. et Anderson, D.** (1992). Modeling survival and testing biological hypothesis using marked animals : a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*. **62** : 67-118.
- Le Galliard, J.F., Le Bris, M. et Clobert, J.** (2003). Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology*. **17** : 1-9.
- Le Henanff, M., Meylan, S. et Lourdais, O.** (2013). The sooner the better: reproductive phenology drives ontogenetic trajectories in a temperate squamate (*Podarcis muralis*). *Biological Journal of Linnean Society*. **108** : 384-395.

- Lecomte, J., Clobert, J. et Massot, M.** (1992). Sex identification in juveniles of *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia*. **13** : 21-25.
- Lin, C. X., Zhang, L. et Ji, X.** (2008). Influence of pregnancy on locomotor and feeding performances of the skink, *Mabuya multifasciata*: why do females shift thermal preferences when pregnant? *Zoology*. **111** : 188-195.
- Lourdais, O., Bonnet, X. et Doughty, P.** (2002). Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal Of Experimental Zoology*. **29** : 487-493.
- Lourdais, O., Heulin, B. et DeNardo, D.F.** (2008). Thermoregulation during gravidity in the children's python (*Antaresia childreni*) : a test of the preadaptation hypothesis for maternal thermophily in snakes. *Biological Journal of Linnean Society*. **93** : 499-508.
- Lourdais, O., Lorioux, S., Dupoué, A., Wright, C. et DeNardo, D.F.** (2015). Embryonic water uptake during pregnancy during pregnancy is stage and fecundity dependant in the snake *Vipera aspis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **189** : 102-106.
- Maderson, P.F.A. et Bellairs, A. d'A.** (1962). Culture methods as an aid to experiment on reptile embryos. *Nature*. **195** : 401-402.
- Meylan, S., Dufty, A. M. et Clobert, J.** (2003). The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone level in pregnant *Lacerta vivipara*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. **134** : 497-503.
- Meylan, S., Haussy, C. et Voituron, Y.** (2000). Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *General and comparative endocrinology*. **169** : 158-166.
- Michel, D.** (1995). Influence des conditions d'incubation des œufs sur le développement embryonnaire et les caractéristiques à la naissance de la souche ovipare de *Lacerta vivipara*. D.E ; A de Biologie et des Populations de L'Université de Rennes 1. 29p.
- Munns, S.** (2013). Gestation increase the energetic cost of breathing in lizard, *Tiliqua rugosa*. *Journal of Experimental Biology*. **218** : 931-939.
- Olsson, M., Shine, R. et Bak-Olsson, E.** (2000). Locomotor impairment of gravid lizards : is the burden physical or physiological ? *Journal of Evolutionary Biology*. **13** : 263-268.
- Osgood, D.W.** (1978). Effects of temperature on the development of meristic characters in *Natrix fasciata*. *Copeia*. **1978** : 33-47.
- Packard, G.C. et Packard, M.J.** (1988). *The physiological ecology of reptilian eggs and embryos*. In: Gans C, Huey RB, editors. *Biology of the Reptilia*, vol. 16. New York: A. Liss, 1988:523-605.
- Panigel, M.** 1956. Contribution à l'étude de l'ovoviviparité chez les reptiles : gestation et parturition chez le lézard vivipare *Zootoca vivipara*. *Annales des sciences naturelles*. **18** : 569-668.
- Parker, S.L., Andrews, R.M. et Mathies, T.** (2004). Embryonic responses to variation in oviductal oxygen in the lizard *Sceloporus undulatus* from New Jersey and South Carolina, USA. *Biological Journal of Linnean Society*. **83** : 289-299.
- Patterson, J.W. et Davies, P.M.C.** (1978). Preferred body temperature : seasonal and sexual differences in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Thermal Biology*. **3** : 39-41.

- Pilorge, T. et Barbault, R.** (1981). La viviparité chez les lézards : évolution et adaptation. *Acta Oecologica*. **2** : 387-397.
- Qualls, C.P. et Andrew, R.M.** (1999b). Maternal body volume constrains water uptake by lizard eggs *in utero*. *Functional Ecology*. **13** : 845-851.
- Qualls, C.P. et Shine, R.** (1998). Costs of reproduction in conspecific oviparous and viviparous lizards, *Lerista bougainvilli*. *Oikos*. **82** : 539-552
- Rodriguez Diaz, T., Gonzalez, F. Ji, X. et Brana, 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.
- Rodriguez Diaz, T. et Brana, F.** (2011a). Plasticity and limitations of extended egg retention in oviparous *Zootoca vivipara* (Reptilia: *Lacertidae*). *Biological Journal of Linnean Society*. **102** : 75-82.
- Rodriguez Diaz, T. et Brana, F.** (2011b). Shift in thermal preferences of female oviparous common lizards during egg retention : insights into the evolution of reptilian viviparity. *Evolutionary Biology*. **38** : 352-359.
- Roitberg, E.S., Kuranova, V.N., Bulakhova, N.A., Orlova, V.F., Eplanova, G.V., Zinenko, O.I., Shamgunova, R.R., Hofmann, S. et Yakovlev, V.A.** (2013). Variation of reproductive traits and female body size in the most widely-ranging terrestrial Reptile : testing the effect of reproductive mode, lineage and climate. *Evolutionary Biology*. **40** : 420-438.
- Shine, R.** (1980). Costs of reproduction in reptiles. *Oecologia*. **46** : 92-100.
- Shine, R.** (1995). A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *American Naturalist*. **145** : 809-823.
- Shine, R.** (2003). Effects of pregnancy on locomotor performance: an experimental study on lizards. *Oecologia*. **13** : 450-456.
- Shine, R.** (2014). Evolution of an evolutionary hypothesis : a history of changing ideas about the adaptive significance of viviparity in Reptiles. *Journal of Herpetology*. **48** : 147-161.
- Shine, R. et Harlow, P.** (1993). Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia*. **96** : 122-127.
- Stewart, J.R, Heulin, B. et Surget-Groba Y.** (2004). Extraembryonic membrane development in a reproductively bimodal lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Zoology*. **107**: 289-314.
- Stewart, J.R., Ecaj, T.W., Heulin, B.** (2009). Calcium provision to oviparous and viviparous embryos of the reproductively bimodal lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Journal of Experimental Biology*. **212-16** : 2520-2524.
- Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C.P., Thorpe, R.S., Kupriyanova, L.M.S., Vogrin, N., Maslak, R., Mazzotti, S., Venczel, M., Ghira, I., Odierna, G., Leontyeva, O., Monney, J.C., Smith, N.D.** (2001). Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **18-3** : 449-459.
- Tinkle, D.W. et Gibbons, J.W.** (1977). The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous Publication of Museum of Zoology. Univiversity of Michigan*. **154** : 1-55.
- Tinkle, D., Wilbur, H.M. et Tilley, S.G.** (1970). Evolutionary strategies in lizard reproduction. *Evolution*. **24** : 55-74.

- Thompson, M.B. et Russel, K.J.** (1999). Growth and energetic of embryos of the gecko *Phyllodactylus marmoratus*, a species with hard shells eggs. *Herpetological Journal*. **9** : 37–42.
- Van Damme, R., Bauwens, D., Brana, F. et Verheyen, R.** (1992). Incubation temperature differentially affects hatching time, egg survival and sprint speed in the lizard *Podarcis muralis*. *Herpetologica* . **48** : 220-228.
- Wapstra, E., Uller, T., While, G.M., Olsson, M. et 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.
- Wingfield, J. C. et Vlek, C. M.** (1992). Seasonal changes of adrenocortical response to stress in birds of sonoran desert. *Journal of Experimental Zoology*. **264** : 419-428.

Tableau 1 : Effets du traitement thermique et du mode reproducteur sur la phénologie et le succès reproducteur. Lots expérimentaux décrits selon le mode reproducteur (O pour ovipare et V pour vivipare) et le traitement thermique expérimental dans lequel la reproduction a eu lieu (N pour nids ou nest et M pour mère ou mother).

	Lots expérimentaux				Test statistique ^a	
	O-N	O-M	V-N	V-M	Effet du traitement thermique	Effet du mode reproducteur
Nb femelles fertilisées	9	10	8	11	-	-
Nombre d'ovules produits	20	23	46	57	-	-
Nombre de Nouveau-nés viables	17	23	15	34	-	-
Date d'ovulation (J. post-hibernation)	28.63 ± 2.62	28.9 ± 3.25	30.33 ± 5.92	28.33 ± 2.55	NS	NS
Durée rétention des ovipares (J.)	40.88 ± 6.45	25.4 ± 5.93	-	-	F _{1,16} =24.47, P<0.001	-
Durée incubation des ovipares (J.)	41.29 ± 3.16	30.48 ± 0.95	-	-	test t, t=24.89, df=19.95, P<0.001	-
Durée totale de développement (J.)	81.59 ± 6.88	55.39 ± 5.66	81.73 ± 9.38	59.00 ± 5.08	F _{1,29.01} = 80.43, P<0.001	NS
Succès reproducteur	85%	100%	33 %	60 %	$\chi^2 = 10.43$, df=1, P=0.001	$\chi^2 = 33.54$, P<0.001

^a NS : test non significatif

Note : les valeurs représentées dans le tableau sont exprimées en moyenne ± écart type

Tableau 2 : Analyses GLMM des caractéristiques des nouveau-nés (Morphologie). Sélection du meilleur modèle (moindre AIC) par la procédure Dredge. Les P-values présentées dans le tableau correspondent aux analyses statistiques exclusivement effectuées sur les facteurs (ou interactions) retenus dans le meilleur modèle. Les facteurs non-inclus sont représentés par un « n.a. » et les facteurs non retenus par la procédure de simplification sont représentés par un « / ». En cas d'interactions significatives entre facteurs les P-values mentionnées correspondent à celles des tests Post hocs.

Variable Y (X= covariable)	Meilleur modele	Effet de la Covariable (X)	Effet du Traitement (T)		Effet du Sexe (S)		Effet du mode repro (R)		Effets d'interaction
			M	N	♂	♀	Ovipare	Vivipare	
Sexe ratio (Males/Femelles)	Y~T	n.a.	$\chi^2 = 2.46, df=1, P=0.125$ 33/24 13/19		n.a.		/		/
Nb d'anomalies d'écaillure ventrale	Y~R+T+S	n.a.	Wald $\chi^2 = 3.59, df=1, P=0.058$ 1.18 ± 0.82 0.64 ± 0.83		Wald $\chi^2 = 7.00, df=1, P=0.008$ 0.54 ± 0.72 1.16 ± 0.90		Wald $\chi^2 = 3.73, df=1, P=0.053$ 1.1 ± 0.93 0.63 ± 0.75		/
Poids (mg) (X = SVL maternel)	Y~X+R+T+S	F_{1,31.08} = 20.42, P<0.001 Coef de pente : 5.13	F _{1,30.36} = 2.23, P=0.15 201.07 ± 35.41 202.75 ± 35.97		F _{1,72.67} = 2.68, P=0.10 191.78 ± 33.48 212.25 ± 34.72		F_{1,31.77}=77.67, P<0.001 227.7 ± 28.22 180.43 ± 25.05		/
Tête-cou (mm) (X = SVL maternel)	Y~X+R+T	F _{1,28.43} = 2.94, P = 0.10 Coef de pente : 0.03	F_{1,30.58} = 7.01, P=0.01 7.77 ± 0.48 7.57 ± 0.52		/		F_{1,31.06}=23.25, P<0.001 7.97 ± 0.45 7.48 ± 0.44		/
Longueur totale (mm) (X = SVL maternel)	Y~X+R	F_{1,30.44} = 8.03, P=0.008 Coef de pente : 0.35	/		/		F_{1,31.38} = 47.46, P<0.001 46.37 ± 2.48 41.90 ± 2.57		/
SVL (mm) (X = SVL maternel)	Y~X+R*S	F_{1,31.35} = 8.00 , P = 0.008 Coef de pente : 0.12	/		Ovip: Tuckey HSD, P=0.14 Vivip: Tuckey HSD, P<0.001		♂ : Tuckey HSD, P<0.001 ♀ : Tuckey HSD, P<0.002		R:S ; F_{1,84.00} = 4.98, P=0.03 ♂ Ovip 19.53 ± 2.62 ♂ Vivip 18.11 ± 2.99 ♀ Ovip 20.66 ± 2.34 ♀ Vivip 19.73 ± 1.88
Log Poids (mg) (X1=log SVL) (X2=log SVL maternel)	Y~X1+X2+R	X1 : F _{1,76.45} = 27.79, P<0.001 Coef de pente : 0.84 X2 : F _{1,34.88} = 15.29, P<0.001 Coef de pente : 1.09	/		/		F_{1,43.65}=52.14, P<0.001 Ordonnées à l'origine : -1.51 -1.77		/

Tableau 2 (suite): Analyses GLMM des caractéristiques des nouveau-nés (Performances locomotrices et exploratoires). Sélection du meilleur modèle (moindre AIC) par la procédure Dredge. Les P-values présentées dans le tableau correspondent aux analyses statistiques exclusivement effectuées sur les facteurs (ou interactions) retenus dans le meilleur modèle. Les facteurs non-inclus sont représentés par un « n.a. » et les facteurs non retenus par la procédure de simplification sont représenté par un « / ». En cas d'interactions significatives entre facteurs les P-values mentionnées correspondent à celles des Post hocs.

Variable Y (X= covariable)	Meilleur modele	Effet de la Covariable (X)	Effet du Traitement (T)		Effet du Sexe (S)		Effet du mode repro (R)		Effets d'interaction
			M	N	♂	♀	Ovipare	Vivipare	
Endurance (sec) (X=poids)	Y~R+T*S	/	♂ : Tuckey HSD, P<0.001		M : Tuckey HSD, P=0.95		F_{1,25,98}=12.29, P=0.002		T:S ; F_{1,72}=4.37, P=0.04
			♀ : Tuckey HSD, P=0.71		N : Tuckey HSD, P=0.072		68.40 ± 24.58	54.06 ± 22.40	♂ M 66.80 ± 26.27
									♂ N 41.20 ± 18.12
									♀ M 63.10 ± 23.89
									♀ N 59.15 ± 19.04
Latence d'arrêt (sec) (X=poids)	Y ~ R	/	/	/	/	/	F_{1,27,68} = 5.93, P=0.022		/
							4.67 ± 1.45	3.73 ± 1.78	
Nb d'arrêts (X=Endurance)	Y ~ X + S	Wald $\chi^2 = 344.13$, df= 1, P<0.001 Coef de pente : 0.018	/	/	Wald $\chi^2 = 2.58$, df=1, P=0.11 20.14 ± 10.91 22.51 ± 9.64		/	/	/
Exploration (Nb carrés)	Y ~ R + S	n.a.	/	/	Wald $\chi^2 = 6.82$, df=1, P=0.009 46.43 ± 36.08 37.95 ± 26.28		Wald $\chi^2 = 2.53$, df=1, P=0.11 33.98 ± 21.90 49.16 ± 36.91		/
Nb d'abris visités	Y ~ R + T * S	n.a.	♂ : Tuckey HSD, P<0.001		M : Tuckey HSD, P<0.001		Wald $\chi^2 = 49113$, df=1, P<0.001		T:S ; Wald $\chi^2 = 204752$, df=1, P<0.001
			♀ : Tuckey HSD, P<0.001		N : Tuckey HSD, P<0.001		3.05 ± 4.64	3.42 ± 3.00	♂ M 2.67 ± 2.63
									♂ N 3.08 ± 2.75
									♀ M 4.92 ± 5.66
									♀ N 2.16 ± 2.57
Temps sous abris (sec)	Y ~ T	n.a.	F _{1,32,53} = 2.99, P=0.093 502 ± 751 942 ± 1195		/	/	/	/	/

Figure 1 : Cycles journaliers des deux traitements thermiques expérimentaux. régime M (trait plein) ; régime N (trait pointillé et cercles vides). La photopériode est indiquée en deuxième abscisse (lampes néons : éclairage en blanc / extinction en noir).

Figure 2 : Relation entre log (poids) et log (SVL) des femelles pré-reproductives et post-reproductives. Les femelles pré-reproductives (vivipares : ronds pleins gris ● ; ovipares : ronds vides gris ○) ne présentent pas de différence de relation (droite de régression commune grise). Les femelles post reproductives (vivipares : cercles pleins noirs ● et droite de régression en trait plein ; ovipares : cercles vides noirs ○ et droite de régression en pointillés) présentent deux relations distinctes (différence significative d'ordonnées à l'origine : voir texte).

Figure 3: Relation entre le poids à la naissance des juvéniles ovipares et vivipares et leur probabilité de survie S1 entre la naissance et juillet.

Figure 1

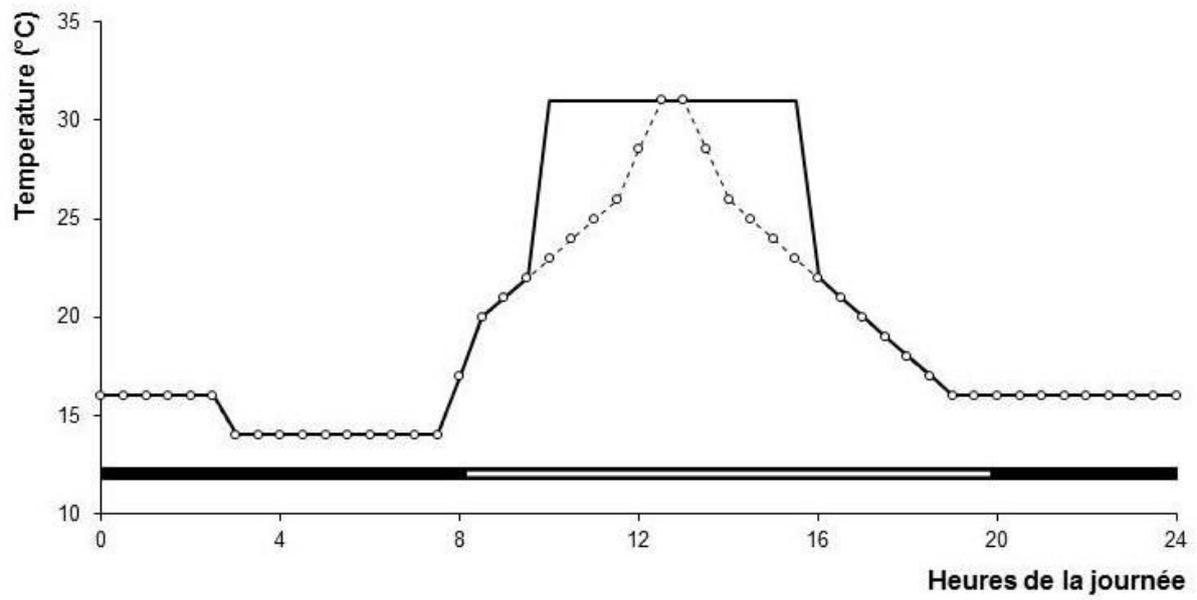


Figure 2

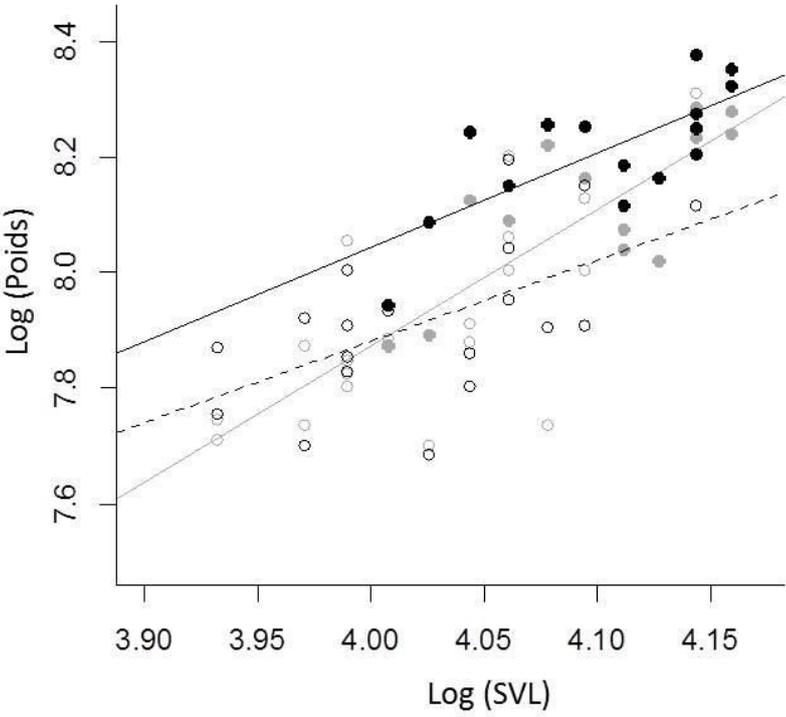
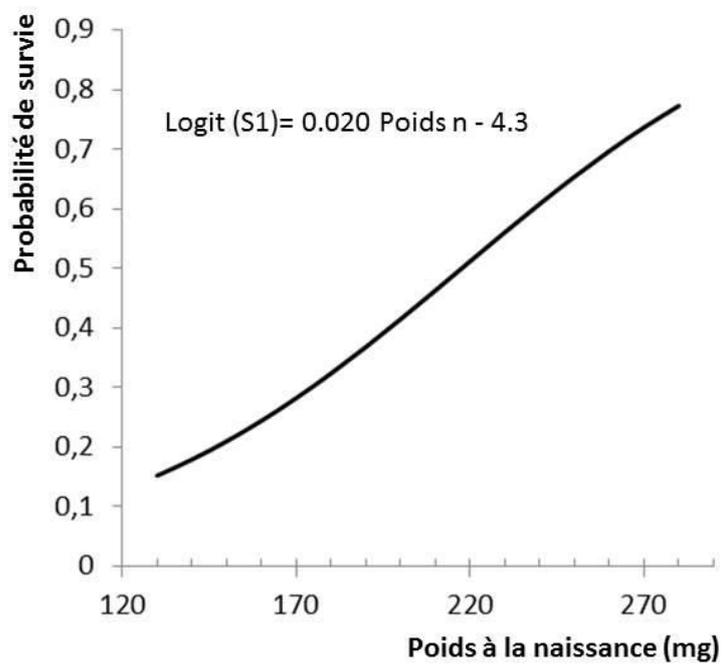


Figure 3



Annexes

Sélection du meilleur modèle de survie des juvéniles ovipares et vivipares issus des 2 traitements thermiques expérimentaux communs (CC, HH). Modélisation des effets groupes et périodes par le software MSurge 1.8. Les effets modélisés sont : le traitement thermique TTH subi pendant le développement embryonnaire, le sexe, et la période de survie considérée (période 1 = naissance à Juillet, ou Période 2= Juillet à Septembre). Np=nombre de paramètres du modèle; Classement des modèles par ordre décroissant d'AICc (Akaike information criterion).

	effets Groupes et Période sur SURVIE	Np	AICc	Δ AICc
modele 1	Mode repro x Sexe x TTH x Période	17	206,4	19,8
modele 2	Mode repro x Sexe x TTH	9	206,2	19,6
modele 3	Mode repro x TTH	5	202,1	15,5
modele 4	Mode repro x Sexe	5	201,1	14,5
modele 5	TTH	3	199,4	12,8
modele 6	Sexe x TTH	5	199,3	12,7
modele 7	Mode repro	3	198,3	11,7
modele 8	Sexe	3	198,0	11,4
modele 9	survie constante (aucun effet)	2	197,5	10,9
modele 10	Sexe x TTH x Période	9	195,7	9,1
modele 11	Mode repro x TTH x Période	9	193,3	6,7
modele 12	Sexe x Période	5	191,5	4,9
modele 13	Mode repro x Sexe x Période	9	191,3	4,7
modele 14	TTH x Période	5	190,5	3,9
modele 15	Période	3	189,1	2,5
modele 16	Mode repro x Période	5	186,6	0,0

Effet de l'adjonction de covariables individuelles de naissance sur la modélisation des survies S1 et S2 des juvéniles ovipares et vivipares en enclos. Les covariables individuelles sont la date de naissance ($Date_n$) le poids ($Poids_n$), l'endurance ($Endu_n$) et la condition corporelle ($CCOR_n$): résidu de la relation $Poids=f(taille)$ des nouveau-nés. Le modèle ne comportant aucun effet de covariables sur S1 et S2 correspond au modele 16 issu de la modélisation présentée dans le tableau ci-dessus.

	Survie S1 de la naissance à Juillet (modélisations avec ou sans COVARIABLES)	Survie S2 de Juillet à septembre (modélisations avec ou sans COVARIABLES)	Np	AICc	Δ AICc
modele 16-A	Mode repro x ENDUn	+ Mode repro x ENDUn	9	194,5	12,5
modele 16-B	Mode repro x CCORn	+ Mode repro x CCORn	9	193,5	11,5
modele 16-C	Mode repro x DATEn	+ Mode repro x DATEn	9	193,2	11,2
modele 16-D	Mode repro	+ Mode repro x ENDUn	7	190,9	8,9
modele 16-E	Mode repro x CCORn	+ Mode repro	7	190,8	8,8
modele 16-F	Mode repro	+ Mode repro x POIDSn	7	190,6	8,6
modele 16-G	Mode repro x DATEn	+ Mode repro	7	190,3	8,3
modele 16-H	Mode repro x POIDSn	+ Mode repro x POIDSn	9	190,3	8,3
modele 16-I	Mode repro x ENDUn	+ Mode repro	7	190,0	8,0
modele 16-J	Mode repro	+ Mode repro x DATEn	7	189,3	7,3
modele 16-K	Mode repro	+ Mode repro x CCORn	7	189,1	7,1
sans covariable	Mode repro	+ Mode repro	5	186,6	4,6
modele 16-L	Mode repro x POIDSn	+ Mode repro	7	186,4	4,4
modele 16-M	POIDSn	+ Mode repro	5	182,0	0,0

- CHAPITRE VI - RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR LES CONSTRAINTES VOLUMIQUES D'ENCOMBREMENT

Sommaire du chapitre

<u>VI-1) Contraintes volumiques d'encombrement liées à l'accroissement de poids des œufs au cours du développement embryonnaire : comparaison des formes ovipares et vivipares de <i>Zootoca vivipara</i></u>	151
---	-----



Contraintes d'encombrement liées à l'accroissement volumique des œufs au cours du développement embryonnaire : comparaison des formes ovipares et vivipares de *Zootoca vivipara*

Introduction

Comprendre l'évolution des stratégies de reproduction passe avant tout par la compréhension des enjeux, des mécanismes et des compromis qui leurs sont liés. L'enjeu principal de la reproduction réside en la maximisation de la fitness d'un individu qui passe, entre autres, par un équilibre entre la quantité (nombre et poids total) de descendants produite (reproductive output) et leurs possibilités de reproduction future. Dans la littérature le nombre de jeunes produits est classiquement considéré comme la résultante de deux processus qui sont i) la quantité totale d'énergie investie dans la reproduction et ii) le compromis entre le nombre de descendants et la quantité d'énergie allouée à chacun d'entre eux (Du et al. 2005).

Au-delà de la disponibilité trophique environnementale modulant les possibilités d'acquisition énergétique des femelles, il apparaît primordial de considérer que des contraintes morpho-anatomiques pourraient aussi contribuer à fortement limiter l'investissement total dans la reproduction et sa répartition entre un nombre plus moins important de descendants. Chez les reptiles le nombre de juvéniles produits peut non seulement dépendre de l'énergie disponible (Olsson et Shine 1996 ; Bonnet et al., 2001) mais également de la taille de la femelle (Fitch 1970 ; Olsson et Shine 1996 ; Du *et al.* 2005), ce qui laisse supposer que la contrainte volumique abdominale (*i.e.* le volume disponible pour les œufs fécondés) devrait théoriquement fortement influencer sur la fécondité maximale des femelles (Qualls & Shine 1995, Du *et al.* 2005, Goodman *et al.* 2009). Cependant, en contradiction avec cette hypothèse d'une limitation volumique, il apparaît que ni l'augmentation expérimentale de la charge reproductrice (*i.e.* insertion chirurgicale de faux œufs dans l'abdomen (Du *et al.* 2005), ni la morphologie des espèces (Goodman *et al.* 2009) ne semblent affecter la quantité (nombre et poids total) de descendants produite (reproductive output) par les femelles. Les auteurs s'accordent ainsi à dire que les femelles ne présentent pas une charge reproductrice maximale (relativement à leur taille) mais plutôt optimale et aussi que la contrainte d'encombrement volumique de l'abdomen pendant la reproduction peut vraisemblablement être partiellement compensée par les capacités de modification de la silhouette des femelles (expansion du volume abdominal). Concernant ce dernier point, on connaît notamment un mécanisme plastique, mettant vraisemblablement en jeu une souplesse

de certaines structures squelettiques, et contribuant à un allongement flexible (*i.e.* suivi ultérieurement de rétraction) de partie thoraco-abdominale du corps durant la période de rétention intra-utérine des œufs (Bulakhova 2013).

La compréhension de la notion de contraintes liées à l'expansion volumique intra-utérine des œufs chez les squamates nécessite de considérer un certain nombre de particularités biologiques développementales de ce groupe zoologique. Les œufs de la majorité des squamates sont enveloppés d'une coquille souple et extensible (coquille parcheminée des espèces ovipares ou membrane coquillière résiduelle des espèces vivipares), qui est secrétée juste après ovulation, et qui autorise ensuite un accroissement important du volume de l'œuf au cours du développement. Chez les squamates ovipares et les squamates vivipares lécithotrophiques (*i.e.* sans transferts placentaires de nutriments) il n'y a pas d'accroissement du poids sec total de l'œuf entre l'ovulation et la naissance (Stewart 2013) et les accroissements de poids frais et de volume intervenant pendant le développement sont donc essentiellement liés à une absorption d'eau par les compartiments embryonnaire et extra-embryonnaire de l'œuf (Gutzke et Packard 1987; Phillips *et al.* 1990, Ji et Brana 1999). Cet accroissement volumique et pondéral des œufs, effectivement observé chez de nombreuses espèces, est plus particulièrement marqué en fin de développement (phase fœtale) en raison de la croissance exponentielle du fœtus et, surtout, de l'absorption considérable d'eau (provenant de l'utérus ou du substrat des œufs) se produisant souvent durant cette phase finale du développement (Xavier et Gavaud 1986, Vleck 1991, Qualls et Andrews 1999b, Ji et Brana 1999, Lourdaï 2015). Cette phase fœtale du développement, et l'absorption massive d'eau qui l'accompagne, interviennent généralement après la ponte chez les espèces ovipares de squamates (Qualls et Andrews 1999). On peut donc supposer que pour, un même investissement reproducteur initial (nombre d'ovules et quantité de vitellus par ovule), le changement volumique des œufs en cours de développement est susceptible d'occasionner une contrainte d'encombrement de l'abdomen beaucoup plus marquée chez les femelles d'espèces vivipares (rétention jusqu'à la fin du développement fœtale) que chez les femelles d'espèces ovipares (rétention intra-utérine réduite au début du développement embryonnaire). Il semble donc intéressant de vérifier dans quelle mesure le mécanisme plastique décrit ci-dessus (encombrement reproducteur entraînant un allongement flexible de la zone thoraco-abdominale) pourrait s'exprimer avec une plus forte amplitude chez les femelles vivipares que chez les femelles ovipares de squamates. Par ailleurs, il faut aussi considérer que l'absorption d'eau durant la phase fœtale, si elle entraîne effectivement des contraintes en termes d'encombrement volumique maternel, est en fait un processus indispensable au bon

déroulement du développement embryonnaire (Packard et Packard 1988, Andrews 1997) qui peut notamment affecter la taille et/ou le poids des nouveau-nés chez certaines espèces (Packard et Boardman 1980, Snell et Tracy 1985, Tracy et Snell 1985, Gutzke et Packard 1987, Ferguson *et al.* 1990, Shine et Brown 2002, Warner et Andrews 2002).

On notera enfin que les données de la littérature suggèrent que l'environnement utérin restreint nettement les capacités d'absorption d'eau des œufs, en raison de la limite d'expansion imposée par le volume abdominal maternel, alors qu'au contraire l'environnement des sites de pontes n'impose pas une telle limite d'expansion volumique et d'absorption d'eau par les œufs (Andrews et Rose 1994, Mathies et Andrews 1996, Andrews 1997, Qualls et Andrews 1999). Cette limitation de l'absorption hydrique des œufs durant la phase de rétention intra-utérine et ses éventuelles conséquences développementales (*e.g.* réduction de fécondité ou du poids des nouveau-nés) apparaissent donc comme un coût potentiel important associé à l'évolution de la viviparité chez les squamates (Qualls et Andrews 1999).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous utiliserons les possibilités d'approches comparatives (ovipares/vivipares) offertes par notre espèce modèle pour mieux évaluer certains des aspects de la problématique évoqués ci-dessus.

1) Nous utiliserons deux indices d'évaluation de la contrainte d'encombrement reproductif imposée à l'organisme maternel et de l'évolution de cette contrainte entre le début (ovipares) et la fin (vivipares) de la période de développement. Nous testerons la prédiction d'un poids relatif de ponte (*i.e.* corrigé pour la taille maternelle) plus élevé et de l'existence d'une plus forte amplitude de changement de taille des femelles (allongement-rétractation avant/ après parition) chez la forme vivipare que chez la forme ovipare de *Zootoca vivipara*.

2) Concernant les changements pondéraux durant le développement, nous évaluerons l'hypothèse de l'existence d'une limitation de l'expansion des œufs dans l'utérus vivipare et de l'absence d'une telle limitation pendant l'incubation externe des œufs ovipares. Pour ce faire nous testerons la prédiction que l'accroissement du poids moyen des œufs au cours du développement devrait être plus important chez les ovipares que chez les vivipares. Nous prédisons également que si une contrainte volumique existe dans le tractus génital femelle, alors le poids atteint en fin de développement de l'œuf devrait être indépendant de la fécondité relative (corrigée par la taille) maternelle chez les ovipares et devrait en revanche être inversement corrélé à la fécondité relative maternelle chez les vivipares.

Matériel et méthode

Mesures effectuées

Pour mesurer la contrainte d'encombrement et l'extension thoraco-abdominale des femelles reproductrices, nous avons réalisé un suivi de la longueur (SVL, mesurée par imagerie numérique) et du poids (P) des femelles ovipares et vivipares. Ce suivi comprenait une mesure avant parition et une mesure post-parition dans les 3 jours suivant la parition. Ces mesures ont été réalisées pour les années 2013 (19 femelles ovipares, 25 femelles vivipares), 2014 (17 femelles ovipares et 19 femelles vivipares) et 2015 (20 femelles ovipares et 19 femelles vivipares). L'analyse des régressions entre le ΔP (différence de poids avant vs. après parition) et le poids post-parition chez les femelles ovipares et les femelles vivipares a permis de comparer le poids relatif de ponte (*i.e.* corrigé pour le poids maternel post-reproductif) des deux modes reproducteurs.

Des mesures de poids individuel des œufs ovipares en début et en fin d'incubation (en incubateur humide, cf chapitre III-1.2) ont été réalisées en 2013 (n=25 pontes) et 2014 (n=14 pontes). Nous avons ainsi pu calculer le poids moyen des œufs de chaque ponte. Le poids moyen des œufs vivipares, calculé comme le ΔP (perte de poids maternel lors de la mise bas) divisé par la fécondité de la femelle, a été estimé pour les années 2013 (n=17 portées), 2014 (n=3portées) et 2015 (n=8portées). Nous n'avons retenu pour ces analyses que les portées sans œufs stériles. Pour les ovipares, la différence entre le poids moyen des œufs à la ponte et le poids moyen des œufs en fin d'incubation, a constitué une estimation de la prise d'eau moyenne d'un œuf pendant cette période. Le même principe d'estimation n'a pas directement été applicable aux vivipares : nous ne disposons pas pour ceux-ci de mesures de poids des œufs au stade initial (*i.e.* équivalent au stade à la ponte des ovipares), car il aurait fallu pour cela disséquer des femelles en début de gestation. Pour estimer la prise d'eau moyenne des œufs vivipares nous avons donc dû admettre que le poids de leurs œufs au stade initial était vraisemblablement proche de celui qui avait été calculé pour les ovipares au moment de la ponte. Cette approximation semble raisonnable dans la mesure où l'on sait que dans les deux populations considérées (vivipares de Paimpont, ovipares de Louvie) il n'y a pas de différence d'investissement énergétique (poids du vitellus de l'œuf) au moment de l'ovulation (Stewart *et al.* 2009) et que le début de développement embryonnaire dans les œufs vivipares est très similaire à celui observé dans les œufs ovipares en phase de rétention intra-utérine (Stewart *et al.* 2004)

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont toutes été réalisées à l'aide du logiciel R (The R foundation for statistical computing, version 3.0.1). Toutes les analyses ont été réalisées par des modèles linéaires et des modèles linéaires mixtes grâce aux packages lme4, car et multcomp. La normalité et l'homogénéité de la variance des résidus du modèle ont été testées graphiquement.

L'analyse des régressions entre le ΔP (différence de poids avant vs. après partion) et le poids post-partition (covariable) a été réalisée grâce à un modèle linéaire avec le mode reproducteur et l'année d'expérimentation en facteur fixe. Nous avons analysé les variations de taille des femelles (SVL) grâce à un modèle linéaire mixte avec le mode reproducteur, le stade reproducteur et l'année d'expérimentation en facteurs fixes, l'identité de la femelle étant en facteur aléatoire. Le ΔSVL a été analysé en utilisant un modèle linéaire avec la SVL post partion, le mode reproducteur, la fécondité relative et l'année d'expérimentation en facteurs fixes. La fécondité relative est exprimé en résidus de la régression significative entre fécondité absolue et SVL post partion (ANCOVA, $F_{1,107}=28.78$; $P<0.001$) sans différence significative entre les modes reproducteurs, les années d'expérimentation et sans effet d'interaction entre ces différents facteurs.

Nous avons comparé le poids moyen des œufs (ANOVA) entre nos trois lots (ovipare à la ponte, ovipares et vivipares en fin de développement) avec le lot en facteur fixe et l'identité de la mère en facteur aléatoire. Puis nous avons testé l'hypothèse d'une contrainte volumique dans l'abdomen des femelles en testant, dans les deux lots en fin de développement, la corrélation entre poids des œufs et fécondité relative. La fécondité relative est exprimée ici aussi en résidus de la régression significative entre fécondité absolue et SVL ($F_{1,60}=7.60$; $P=0,008$).

Résultats

Caractéristiques des femelles

Les femelles vivipares sont plus grandes et plus lourdes que les femelles ovipares (taille SVL : ANOVA, $F_{1,117}=77.83$; $P < 0,001$; Poids P:ANOVA $F_{1,107}=36.15$, $P<0.001$). Le ΔP (poids avant-après partion) est significativement corrélé au poids des femelles post partion (ANCOVA, $F_{1,99}=4.30$, $P=0.016$), sans différences de pentes entre modes reproducteurs (ANCOVA, $F_{1,99}=0.05$, $P=0.82$) mais avec une différence significative d'ordonnées à l'origine entre les deux modes reproducteurs (ANCOVA, $F_{1,99}=12.10$, $P<0.001$). L'écart entre les deux droites parallèles (*i.e.* leur différence d'ordonnées à l'origine) révèle que le poids relatif de

ponte est plus élevé de 304% chez les ovipares que chez les vivipares. Le ΔP varie significativement entre les années d'expérimentation (ANCOVA, $F_{1,99}=4.63$, $P=0.003$) sans interaction significative avec les autres facteurs et covariables de l'analyse. La taille (SVL) moyenne des femelles de chaque mode reproducteur diminue à la parition (ANOVA, $F_{2,115}=56.66$; $P < 0,001$; Tableau 1) sans variation significative entre les années d'expérimentation. Le ΔSVL est plus important pour les plus petites femelles (ANCOVA, $F_{4,99}=13.67$; $P<0,006$), augmente avec la fécondité relative (ANCOVA; $F_{4,99}=2.69$; $P=0.03$) et est plus important chez les femelles vivipares que chez les femelles ovipares (ANCOVA; $F_{1,99}=5.58$; $P<0.001$), sans variation significative entre les années d'expérimentation ni interactions significatives entre les différents facteurs et covariables.

Poids des œufs

Le poids des œufs augmente significativement entre la ponte et la fin de développement dans la forme ovipare (Ponte : 230.94 ± 34.69 mg ; fin de développement : 503.43 ± 57.90 mg ; ANOVA, $F_{2,65.73}=560.57$, $P<0.001$, HSD Tuckey $P<0.001$). Les œufs vivipares en fin de développement (376.15 ± 77.03 mg) sont significativement plus lourds que les œufs ovipares à la ponte (HSD Tuckey $P<0.001$) et sont moins lourds que les œufs ovipares en fin de développement (HSD Tuckey $P<0.001$). La corrélation entre le poids des œufs et la fécondité relative n'est pas significative chez les ovipares pour chacun des deux stades étudiés (ponte : $F_{1,37}=0.30$, $P=0.58$; fin de développement $F_{1,34}=0.35$, $P=0.56$), tandis qu'elle est tend à être significative chez les vivipares ($F_{1,26}=4.02$, $P=0.056$).

Discussion

Lors de la reproduction les femelles subissent de nombreuses contraintes. Dans le cas des squamates, le développement des embryons dans la cavité abdominale induit un encombrement affectant la respiration (Munns 2013), la locomotion (Le Galliard *et al.* 2003) et l'alimentation (Brischoux *et al.* 2011) de la femelle. Il apparaît donc intéressant de quantifier l'intensité et les effets de cette contrainte d'encombrement dans des situations contrastées (*e.g.* comparaison d'espèces ovipares *vs.* vivipares).

Une précédente étude portant sur la forme vivipare de *Zootoca vivipara* a permis de mettre en évidence une décroissance de taille des femelles de l'ordre de 3mm au moment de la mise bas (ΔSVL pré/post parturition) et qui a été interprétée comme la manifestation d'une certaine plasticité squelettique qui dépendrait de l'encombrement abdominal pendant la gestation et du relâchement de cette contrainte volumique lors de la parturition (Bulakhova

2013). Nos propres résultats révèlent aussi une diminution significative de la taille moyenne des femelles après parition chez *Z. vivipara* et indiquent en outre que le Δ SVL moyen observé chez les femelles ovipares (de l'ordre 1mm) est inférieur à celui observé chez les femelles vivipares (de l'ordre de 2mm). Nous avons également pu montrer que le poids relatif de la ponte (*i.e.* Δ P corrigé pour le poids maternel) est nettement plus élevé chez les femelles vivipares que chez les femelles ovipares. Nos mesures semblent donc bien indiquer que l'intensité de la contrainte d'encombrement reproductif imposée à l'organisme maternel s'accroît fortement entre le début (ovipares) et la fin (vivipares) de la période de développement. Comme nous n'avons pas observé de différence de fécondité relative (corrigée pour la taille) entre les femelles ovipares et vivipares, on peut considérer que la différence de contrainte d'encombrement observée entre les 2 groupes (ovipares < vivipares pour le Δ SVL et pour le poids relatif de ponte) est essentiellement la conséquence de l'expansion volumique de l'oeuf en développement, modérée durant la courte rétention intra-utérine ovipare (phase embryonnaire) et beaucoup plus importante durant la phase gestative terminale des vivipares (phase fœtale). Concernant les mécanismes mis en jeu dans le processus plastique d'étirement-rétraction du corps des femelles il a précédemment été suggéré qu'il pourrait correspondre à des déplacements des os de la ceinture pelvienne chez *Zootoca vivipara* (Bulakhova 2013), tandis qu'une autre étude a permis de mettre en relation les variations de la taille corporelle et des espaces intervertébraux chez les femelles gestantes chez *Vipera aspis* (Lourdais com. personnelle). Il est important de noter que nos résultats révèlent aussi une variabilité inter-individuelle importante et qui peut même s'exprimer dans le sens inverse de la tendance moyenne, c'est-à-dire par un accroissement de taille après parition (voir les 12 femelles ovipares et 8 femelles vivipares présentant des Δ SVL négatifs, Figure 1). De possibles imprécisions liées à notre technique de mesure (photos sur Scanner) on ne peut pas exclure non plus qu'une part de variabilité de SVL puisse être liée à la manipulation et/ou au comportement des femelles. Une analyse plus précise (*i.e.* à l'échelle des espaces intervertébraux) serait requise pour identifier la nature et quantifier l'impact de l'effet pressenti.

Il est important de discuter ici des corrélats physiologiques et développementaux associés à la contrainte d'encombrement abdominal de la femelle pendant la rétention intra-utérine. Les données présentées ici suggèrent que la prise de poids de l'œuf durant la phase de croissance exponentielle du fœtus (période d'incubation externe des ovipares et fin de gestation des vivipares) a vraisemblablement été près de deux fois plus importante chez la forme ovipare que chez la forme vivipare de *Zootoca vivipara*. Chez les squamates ovipares et chez les

squamates vivipares lécithotrophiques il n'y a pas d'accroissement du poids sec total de l'œuf entre l'ovulation et la naissance (Stewart 2013) et l'on peut donc considérer que l'accroissement de poids frais observé pendant le développement correspond à une incorporation d'eau dans les compartiments embryonnaire et extra-embryonnaire de l'œuf. Les différences (ovipares /vivipares) d'accroissement pondéral de l'œuf suggérées par nos données pourraient donc indiquer que l'absorption d'eau par les œufs a été deux fois plus importante dans la forme ovipare que dans la forme vivipare de *Zootoca vivipara*. Nos résultats montrent aussi l'existence d'une corrélation négative entre le poids frais final de l'œuf et la fécondité relative maternelle chez les vivipares. Nous n'avons pas retrouvé cette corrélation chez les ovipare. Ceci nous laisse à nouveau supposer l'existence d'une contrainte du développement des œufs dans l'environnement utérin vivipare. Une contrainte d'approvisionnement hydrique constitue une interprétation possible, parmi d'autres (e.g. trade-off nombre/poids des œufs, moindre efficacité du métabolisme embryonnaire dans les grandes portées) de la corrélation inverse que nous avons observée. L'étude de Qualls et Andrew (1999b) a effectivement montré de façon plus formelle (i.e. avec mesure de teneur hydrique des œufs) qu'il existait bien une restriction d'approvisionnement hydrique des œufs dans l'utérus, chez d'autres espèces de lézards. Or l'absorption d'eau par l'œuf est un processus nécessaire au bon développement des embryons de squamates (Packard & Packard 1988, Andrews 1997). Il est donc possible qu'une restriction de la capacité d'absorption hydrique imposée par l'environnement utérin puisse entraîner des changements de poids et/ou de qualité des nouveau-nés produits chez les espèces vivipares (Qualls et Andrews 1999a,b). C'est effectivement ce que suggèrent les données disponibles pour *Zootoca vivipara* chez lequel, malgré un investissement reproducteur unitaire initial (quantité de vitellus par ovule) identique chez les femelles ovipares et vivipares (Stewart *et al.* 2009), les nouveau-nés ovipares sont significativement plus lourds que les nouveau-nés vivipares (Michel 1995, Stewart *et al.* 2009, Roitberg *et al.* 2013). Nos propres données (mesures sur lot expérimental 2013) ont elles-mêmes aussi révélé un poids moyen à la naissance 25% fois plus élevé chez les ovipares que chez les vivipares (231±25mg chez les ovipares, chez 180±25mg les vivipares) (Foucart *et al.* 2014). Néanmoins, en l'absence de véritables mesures hydriques (e.g. teneur en eau des œufs en fin de développement), nos données ne permettent pas d'établir avec certitude un lien causal direct entre une restriction d'approvisionnement hydrique et un moindre poids des nouveau-nés vivipares chez *Zootoca vivipara*. Sans que cela soit exclusif, il se pourrait aussi que des conditions hypoxiques lors de la vie fœtale *in utero*

(Parker *et al.* 2004, Rafferty *et al.* 2013) occasionnent le même type de conséquences développementales.

En conclusion, nos investigations sur *Zootoca vivipara* ont révélé une plus forte amplitude de changement de taille (allongement-rétractation avant/après parition), et un poids relatif de ponte plus élevé chez les femelles vivipares que chez les femelles ovipares, ce qui illustre bien le fait que la contrainte d'encombrement reproductif imposée à l'organisme maternel est nettement plus prononcée chez la forme vivipare que chez la forme ovipare de cette espèce. Nous avons également pu montrer qu'en plus de ce changement de silhouette plus prononcé chez les femelles vivipares, la prolongation de la rétention intra-utérine des œufs pendant la phase fœtale a également des conséquences fonctionnelles (moindre accroissement de poids des oeufs) et très vraisemblablement développementales (*i.e.* nouveau-nés moins lourds) dans la forme vivipare. L'accroissement d'encombrement volumique gestatif de la cavité abdominale maternelle et ses conséquences fonctionnelles et développementales, pourraient donc constituer des coûts de l'évolution de la viviparité chez les squamates (Qualls et Andrews 1999b).

Bibliographie

- Andrews, R.M.** (1997). Evolution of viviparity: variation between two sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. *Journal of Zoology*. **243** :579–595.
- Andrews, R.M. et Rose, B.R.** (1994). Evolution of viviparity: constraints on egg retention. *Physiological Zoology*. **67** : 1006–1024.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R. et Lourdais, O.** (2001). Short-term versus long-term effect of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*. **92-2**, 297-308.
- Brischoux, F. Bonnet, X. et Shine, R.** (2011). Conflicts between feeding and reproduction in amphibious snakes (sea kraits, *Laticauda* spp.). *Austral Ecology*. **36-1**, 42-52.
- Bulakhova, N.A.** (2013). A possible error in determining the body length of females of the common lizard (*Zootoca vivipara*, sauria, lacertidae). *Zoolog. Zhurnal*. **92** : 962-967.
- Du, W., Ji, X. et Shine, R.** (2005). Does body-volume constrain reproductive output in lizards? *Biology letters*. **1** : 98-100.
- Ferguson, G.W., Howard, L.S. et Landwer, A.J.** (1990). Proximate control of variation of clutch, egg and body size in a west texas population of *Uta stansburiana stejnegeri* (Sauria : Iguanidae). *Herpetologica*. **46** : 227-238.
- Fitch, H. S.** (1970). Reproductive cycles in lizards and snakes. *University of Kansas, Museum of Natural History, Miscellaneous publication*. **52** : 1-247.
- Goodman, B., Hudson, S., Isaac, J. et Schwarzkopf, L.** (2009). The evolution of body shape in response to habitat : is reproductive output reduced in flat lizards? *Evolution*. **63-5** : 1279-1291.
- Gutzke, W. H. N. et Packard, G. C.** (1987). Influence of the hydric and thermal environments on eggs and hatchlings of bull snakes *Pituophis melanoleucus*. *Physiology Zoology*. **60** : 9–17.
- Ji, X. et Brana, F.** (1999). The influence of thermal and hydric environment on embryonic use of energy and nutrients and hatchling traits in the wall lizards (*Podarcis muralis*). *Comparative Biochemistry Physiology Part A*. **124** : 205-213.
- Le Galliard, J. F., Le Bris, M. et Clobert, J.** (2003). Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology*. **17** : 877-885.
- Lourdais, O. Lориoux, S. Dupoué, A. Wright, C. et DeNardo, D.F.** (2015). Embryonic water uptake during pregnancy during pregnancy is stage and fecundity dependant in the snake *Vipera aspis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **189** : 102-106.
- Mathies, T. et Andrews, R.M.** (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.
- Michel, D.** (1995). Influence des conditions d'incubation des œufs sur le développement embryonnaire et les caractéristiques à la naissance de la souche ovipare de *Lacerta vivipara*. D.E.A de Biologie et des Populations de L'Université de Rennes. 1. 29
- Munns, S.** (2013). Gestation increases the energetic cost of breathing in lizard *Tiliqua rugosa*. *Journal of Experimental Biology*. **216** : 171-180.
- Olsson, M. et Shine, R.** 1996. Does reproductive success increase with age or with size in species with indeterminate growth? A case study using sand lizards (*Lacerta agilis*). *Oecologia*. **105** : 175-178.

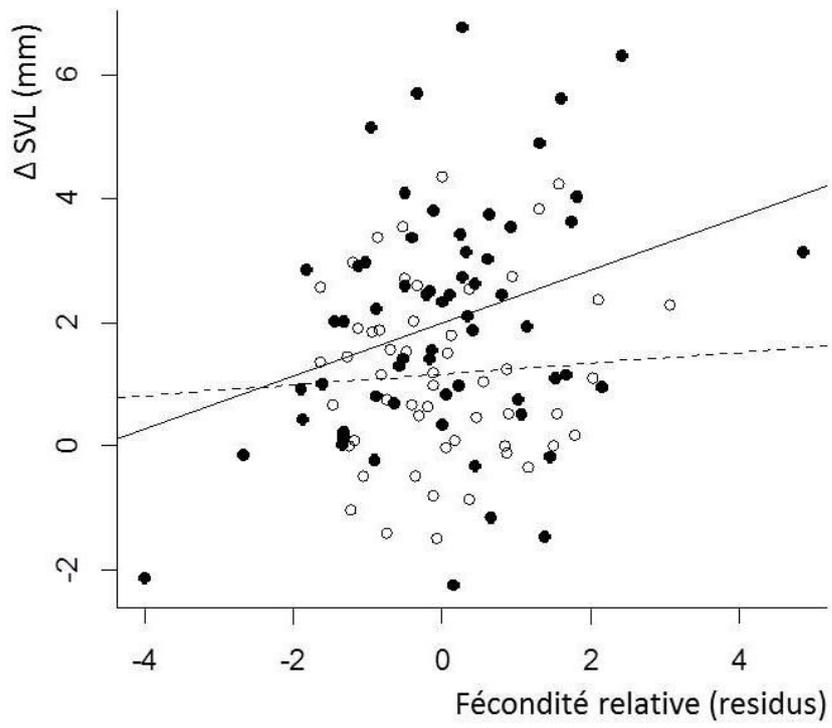
- Packard, M. J., Packard, G. C. et Boardman, T. J.** (1980). Water balance of the eggs of a desert lizard (*Callisaurus draconoides*). *Canadian Journal of Zoology*. **58** : 2051-2058.
- Packard, G. C. et Packard, M. J.** (1988). The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. In: Gans C, Huey RB, editors. *Biology of the Reptilia*, vol. 16. New York: A. Liss, 523–605.
- Parker, S.L., Andrews, R.M. et Mathies, T.** (2004). Embryonic responses to variation in oviductal oxygen in the lizard *Sceloporus undulatus* from New Jersey and South Carolina, USA. *Biological Journal of Linnean Society*. **83**: 289–299.
- Phillips, J. A., Garel, A., Packard, G.C., Packard, M. J. et Packard, M. J.** (1990). Influence of moisture and temperature on eggs and embryos of green iguanas (*Iguana iguana*). *Herpetologica*. **46** : 238-245.
- Qualls, C. P. et Andrew, R. M.** (1999b). Maternal body volume constrains water uptake by lizard eggs *in utero*. *Functional Ecology*. **13** : 845-851.
- Qualls, C.P. et Shine, R.** (1995). Maternal body volume as a constraint on reproductive output in lizards : evidence from the evolution of viviparity. *Oecologia*. **103** : 73-78.
- Roitberg, E.S., Kuranova, V.N., Bulakhova, N.A., Orlova V.F., Eplanova G.V., Zinzko O.I., Shamgunova R.R., Hofmann S. et Yakovlev V.A.** (2013). Variation of reproductive traits and female body size in the most widely-ranging terrestrial Reptile: testing the effect of reproductive mode, lineage and climate. *Evolutionary biology*. **40** : 420-438.
- Shine, R. et Brown, G. P.** (2002). Effects of seasonally varying hydric conditions on hatchling phenotypes of keelback snakes (*Tropidonophis mairii*, *Colubridae*) from the Australian wet-dry tropics. *Biology Journal of Linnean Society*. **76-3** : 339-347.
- Snell, H. L. et Tracy, C. R.** (1985). Behavioral and morphological adaptations by Galapagos land iguanas (*Conolophus subcristatus*) to water and energy requirements of eggs and neonates. *American Zoologist*. **25** : 1009–18.
- Stewart J.R.** (2013). Fetal nutrition in lecithotrophic squamate reptiles: Toward a comprehensive model for evolution of viviparity and placentation. *Journal of Morphology*. **274** : 824-843.
- Stewart, J.R., Heulin, B. et Surget-Groba, Y.** (2004). Extraembryonic membrane development in a reproductively bimodal lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Zoology*. **107**: 289-314.
- Stewart, J.R., Ecaj, T.W. et Heulin, B.** (2009). Calcium provision to oviparous and viviparous embryos of the reproductively bimodal lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Journal of Experimental Biology*. **212-16** : 2520-2524.
- Tracy, C. R. et Snell, H. L.** (1985). Interactions among water and energy relations of reptilian eggs, embryos, and hatchlings. *American Zoologist*. **25** : 999-1008.
- Vleck, D.** (1991). Water economy and solute regulation of reptilian and avian embryos. In "Egg incubation, its effect embryonic development in Reptiles and Birds", Deemming D.C. et Ferguson M.W.J. (Eds), Cambridge university press, Cambridge, 245-259.
- Warner, D.A. et Andrews, R.M.** (2002). Laboratory and field experiments identify sources of variation in phenotypes and survival of hatchling lizards. *Biological Journal of Linnean Society*. **76** : 105-124.
- Xavier, F. et Gavaud, J.** (1986). Oviparity-viviparity continuum in reptiles; physiological characteristics and relation with environment. In "Endocrine regulation as adaptive mechanisms to the environment", Assenmacher I. et Boissin J. (Eds), CNRS, Paris, pp.79-93.

Tableau 1 : Taille (SVL) moyenne des femelles autour de la parition. Date en jour par rapport à la parition, valeur en moyenne \pm écart type.

	Pré-parition		Post-parition	
	Date	SVL (mm)	Date	SVL (mm)
Vivipare (n=63)	-5.65 \pm 4.06	56.38 \pm 3.39	2.30 \pm 2.36	54.40 \pm 3.42
Ovipare (n=56)	-4.13 \pm 3.68	50.70 \pm 3.21	1.32 \pm 1.92	49.54 \pm 3.41

Figure 1 : Graphique du Δ SVL en fonction de la fécondité relative (résidus de la relation entre fécondité et SVL). En cercles noirs (●) les femelles vivipares, en cercles ouverts (○) les femelles ovipares. Droites de régression pour chaque mode reproducteur en trait plein pour les femelles vivipares et en traits pointillés pour les femelles ovipares.

Figure 1



- CHAPITRE VII - DISCUSSION ET CONCLUSION

Sommaire du chapitre

<u>VII-1) La sensibilité thermique du développement.....</u>	168
<u>VII-2) Les besoins métaboliques des embryons.....</u>	171
<u>VII-3) Les contraintes volumiques.....</u>	173
<u>VII-4) La bi-modalité de distribution des stades de développement embryonnaire à la ponte.....</u>	175
<u>VII-5) Conclusion</u>	179



L'apparition de la viviparité est l'une des transitions évolutives majeures des êtres vivants. Elle est apparue sous une grande diversité de formes et de contextes sélectifs chez des groupes aussi variés que les arthropodes (Hangan 1950), les mollusques (Kholleer *et al.* 2004), les vertébrés (Blackburn 2015), les tuniciers (Beryl et Brewin 1956). Chez les vertébrés, les dernières études dénombrent plus de 150 origines indépendantes de la viviparité, dont plus de 115 uniquement chez les reptiles squamates (Blackburn 2015). Quel que soit son histoire et le contexte de son apparition, la viviparité est toujours décrite comme un moyen de réduire ou supprimer l'exposition des embryons aux facteurs délétères pouvant exister dans l'environnement (*e.g.* hygrométrie, température, hypoxie, prédation, attaques fongiques) (Qualls et Shine 1998). Les bénéfices associés à la viviparité seront cependant dépendants de l'intensité des pressions de sélection affectant les œufs des espèces ovipares (*e.g.* pression de prédation sur les œufs, pression temporelle face à un raccourcissement de la période favorable, instabilité hydrique des sites de pontes). En dépit de ces bénéfices potentiels, la transition vers la viviparité nécessite cependant de subvenir aux besoins des embryons et fœtus tout au long de leur développement (*e.g.* échanges gazeux, hydriques et nutritifs – revues dans Andrews et Mathies 2000, Shine et Thompson 2006, Stewart 2013) induisant des coûts dont l'intensité variera également selon les pressions de sélection affectant les femelles et les juvéniles (*e.g.* pression de prédation sur les femelles gestantes, pression associée à la réduction de la quantité de descendants produits et à leur potentielle réduction de qualité).

Les squamates représentent un des meilleurs taxons pour l'étude la transition de l'oviparité à la viviparité chez les vertébrés (Blackburn 2006). Premièrement, ils présentent l'ensemble des combinaisons possibles entre mode de reproduction (oviparité et viviparité) et mode de nutrition embryonnaire (lecitotrophie et matrotrophie). Ainsi, il existe des espèces ovipares à rétention courte (quelques caméléons), prolongée (majorité des squamates ovipares) ou très prolongée (quelques exemples) ; et des espèces vivipares à nutrition lecithotrophique (majorité des squamates vivipares), matrotrophique similaire à celle de la placentation mammalienne ou intermédiaire entre ces deux extrêmes (quelques exemples). Deuxièmement, la transition de l'oviparité à la viviparité chez les squamates concerne plus des trois quarts des origines indépendantes de la viviparité identifiées chez les vertébrés. Ceci offre la possibilité d'étudier la transition de l'oviparité à la viviparité dans une très grande diversité de contextes. Cependant, après plusieurs décennies d'intérêt croissant pour l'apparition de la viviparité chez les squamates (Tinkle et Gibbons 1977, Wourms et Callard 1992, Blackburn

2015), l'histoire évolutive, les mécanismes et les facteurs sélectifs guidant cette transition majeure ne sont toujours pas totalement élucidés (Pincheira-Donoso 2013, Blackburn 2014, 2015). Si aucune des théories suggérées dans la littérature ne peut rendre compte de l'ensemble des apparitions de la viviparité chez les squamates, la théorie des climats froids est celle faisant consensus pour un grand nombre d'origines de la viviparité (Qualls et Andrews 1998, Shine 2006, Hodges 2004, Lambert et Wiens 2013, Pincheira-Donoso *et al.* 2013). Plus généralement, cette théorie peut s'intégrer dans le contexte de la théorie des manipulations maternelles de par la similitude de certains avantages accordés par la viviparité en milieu froid ou chaud (Webb *et al.* 2005).

C'est dans ce contexte que nous avons étudié certains coûts et bénéfices de la reproduction associés à la transition de l'oviparité à la viviparité, chez une espèce de zone paléarctique présentant encore des populations exclusivement vivipares ou ovipares. Nous avons ainsi pu mesurer et comparer certaines variations du coût énergétique et du coût développemental (phénotype, performance des nouveau-nés) de reproduction entre l'oviparité et la viviparité. Nous avons aussi abordé les notions de contraintes en oxygène et en espace associé au développement dans l'organisme maternel.

La sensibilité thermique du développement

La température est un élément clef du développement des embryons des vertébrés (Farmer 2000). Parmi les différents soins parentaux existants, l'évolution du contrôle de la température de développement pourrait être le moteur majeur de certaines évolutions comportementales (utilisation de nids ou terriers chez les crocodiles, oiseaux et mammifères - Lang 1987, Shine 1988, Clutton-Brock 1991), de l'évolution du mode reproducteur (hypothèse des climats froids chez les squamates, revue dans Shine 2014), et de l'évolution de caractères physiologiques majeurs (endothermie des oiseaux et mammifères, Farmer 2000). Chez les squamates, la température de développement des embryons est connue pour affecter le succès reproducteur, la durée du développement embryonnaire ou encore la qualité phénotypique des nouveau-nés (Beuchat 1988, Burger 1990, Deeming et Ferguson 1991, Shine 1995, 2012, 2014, Qualls et Andrews 1999a, Shine et Harlow 1993, Van Damme *et al.* 1992).

Lors de l'apparition de la viviparité, le premier avantage majeur, est le contrôle des températures de développement grâce à la thermorégulation comportementale maternelle dont les embryons et fœtus bénéficient à l'intérieur du tractus génital femelle. La thermorégulation maternelle permet d'abord d'éviter une exposition des embryons et des fœtus à des conditions

thermiques sous-optimales pouvant exister dans les sites de ponte. Une diminution de la température moyenne d'incubation en deçà de l'optimum thermique induit un allongement de la durée de développement et occasionne parfois une diminution du taux d'éclosion et de la qualité des nouveau-nés (Qualls et Andrews 1998, Shine 2004b, Rodriguez-Diaz *et al.* 2010). L'apparition de la viviparité est donc un événement évolutif qui, grâce à la thermorégulation maternelle, est susceptible d'accroître la température moyenne de développement et de permettre ainsi de faire face aux conditions contraignantes (*e.g.* plus courte saison d'activité) des climats froids (revue dans Shine 2014). Il est néanmoins important de considérer que l'apparition de la viviparité dans un contexte naturel influence plus fortement les cycles thermiques quotidiens expérimentés par les embryons que la température moyenne du développement (voir Shine 2004b et références incluses). Ainsi, la thermorégulation maternelle permet surtout de maximiser la durée d'accès à l'optimum thermique lors du développement des embryons. Ceci est susceptible d'affecter non seulement la vitesse de développement, mais aussi le phénotype des nouveau-nés produits (Wapstra 2000). Pour cette raison, nous avons exposé les femelles vivipares gestantes et les femelles ovipares gravides ainsi que leurs œufs, à des cycles thermiques simulant une situation naturelle dans laquelle la viviparité a pu apparaître (*i.e.* traitement thermique « site de ponte » N calqué sur des mesures en milieu naturel, traitement thermique « mère » M avec un accès au *thermopréférendum* plus long, sans différence significative de température moyenne entre les cycles N et M). Ces régimes expérimentaux ont été appliqués soit de manière homogène sur toute la période de développement (régimes MM ou NN chez ovipares et vivipares) soit, chez les ovipares uniquement, en intervertissant les régimes subis entre la phase de rétention interne *in utero* et la phase d'incubation externe des œufs (régimes MN ou NM). Nous n'avons pas mis en évidence de variations phénotypiques ou des variations de performance majeures chez les nouveau-nés, mais nous avons en revanche constaté un raccourcissement important (de l'ordre de 30%) de la durée totale de développement dans la condition thermique la plus favorable MM par rapport à la moins favorable NN (gains de 27 et 23 jours, respectivement, pour les formes ovipare et vivipare). De nombreuses autres études ont aussi permis de documenter des avantages phénologiques et/ou phénotypiques apportés par la thermorégulation maternelle, non seulement pour des espèces de climats froids, mais également pour des espèces de climats chauds (Andrews 2000, Shine 2002, 2004b, Webb *et al.* 2005, Lorigoux *et al.* 2012). Pour cette raison, l'hypothèse des climats froids est désormais considérée comme un cas particulier de l'hypothèse de manipulation maternelle qui

permet de rendre compte d'un plus grand nombre d'apparitions de la viviparité, dans une plus grande diversité de contextes climatiques (Webb *et al.* 2005).

Il convient par ailleurs de noter que les bénéfices apportés par la thermorégulation maternelle ne sont pas nécessairement linéaires au cours du développement (Lorioux *et al.* 2012, 2013a). Chez certaines espèces, la réduction de la qualité thermique lors de la période d'organogénèse peut non seulement affecter la vitesse de développement, mais aussi avoir des conséquences néfastes sur l'organisation de l'embryon, ou sur le phénotype des nouveau-nés (Lorioux *et al.* 2012, 2013a). De telles conditions thermiques lors de la croissance fœtale retardent également le développement, mais ont en revanche beaucoup moins d'effets sur le phénotype des nouveau-nés (Lorioux *et al.* 2013a). Les gains phénologiques (raccourcissement de développement) procurés par des conditions thermiques optimales tendent également à être plus importants en début qu'en fin de développement (Andrews 2004). Au cours de notre expérimentation de manipulation des cycles thermiques chez la forme ovipare, nous avons aussi testé la variation de la sensibilité thermique du développement en modifiant les conditions de thermiques au moment de la ponte (correspondant approximativement à la période de transition entre la phase d'organogénèse prédominante et la phase de croissance prédominante). L'exposition à un régime de type maternel M lors de la gravidité ovipare (première moitié du développement, régime MN) permet ainsi chez *Zootoca vivipara*, un gain phénologique de 17 jours sur le régime NN (environ 20%) contre seulement 10 jours (environ 15 %) lorsque le régime de type maternel est appliqué lors de la période d'incubation (*i.e.* comparaison des lots MN et MM). Nous n'avons en revanche pas observé de réduction importante de la qualité des nouveau-nés (phénotype, performances locomotrices ou exploratoires) induite par un développement dans la condition de type N « site de ponte », que ce soit lors d'une exposition partielle (NM ou MN) ou complète (NN) des embryons à ce traitement thermique.

Notre expérience de manipulation des cycles thermiques a donc montré que la variation du cycle thermique journalier apporté par la thermorégulation maternelle (augmentation du temps d'accès au *thermopreferendum*) a surtout permis de modifier drastiquement la phénologie de la reproduction (naissance plus précoce), sans effets notoires sur la qualité phénotypique des nouveau-nés de *Z. vivipara*. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas non plus observé de modification de la survie juvénile liée à la date de naissance, c'est-à-dire associée au bénéfice phénologique de la thermorégulation

maternelle. Nos conditions expérimentales particulières (avancement de plus d'un mois par rapport à la reproduction des populations naturelles) et le contexte sélectif particulier lié au maintien des juvéniles en enclos (peu de prédateurs, approvisionnement en nourriture) nous incitent à considérer ce dernier résultat avec précaution.

Il existe en effet d'autres études qui, contrairement à la nôtre, suggèrent que la durée de développement et donc la date de naissance sont des facteurs clés de la valeur sélective, influençant favorablement la survie et la croissance postnatale de l'individu (Shine et Harlow 1993, Warner et Shine 2007, Wapstra *et al.* 2010, Le Hennanf *et al.* 2013). Il reste donc vraisemblable qu'une sélection directionnelle, favorisant la précocité de la naissance, soit l'un des moteurs évolutifs ayant contribué à la prolongation de la rétention des œufs et ultimement, l'apparition de la viviparité chez certains squamates. Il faut néanmoins considérer le fait que les conditions physico-chimiques régnant dans le tractus génital femelle entraînent des contraintes développementales spécifiques. La nature et/ou l'intensité de ces contraintes sont susceptibles de se modifier lors de la prolongation de la rétention intra-utérine des œufs. Ces contraintes peuvent ainsi induire des forces sélectives s'opposant à celles favorisant la prolongation de la rétention.

Les besoins métaboliques des embryons

Le développement dans le tractus génital maternel est soumis à des contraintes physico-chimiques différentes de celles existant dans le milieu extérieur. Ces contraintes particulières sont susceptibles d'affecter les échanges nécessaires au bon développement des embryons (*e.g.* respiratoire et hydrique). Concernant la période de rétention de la forme ovipare de notre espèce modèle, nous avons observé une corrélation négative du stade de développement embryonnaire à la ponte avec le nombre de jeunes produits. Nous avons interprété ce résultat comme la conséquence possible d'une réduction de disponibilité d'une ressource essentielle lors du développement dans l'oviducte (*i.e.* ressource plus limitée dans les grandes que dans les petites pontes). Nous avons émis l'hypothèse que la disponibilité limitée en oxygène dans le tractus génital pourrait être à l'origine de ce résultat. En effet, la faible teneur en oxygène et la lente diffusion des gaz dissous dans l'environnement aqueux utérin (Bird *et al.* 1960) peuvent générer des conditions hypoxiques de développement (Parker *et al.* 2004, Rafferty *et al.* 2013) susceptibles d'affecter le métabolisme énergétique et la vitesse de développement embryonnaire.

La quantité d'oxygène est effectivement considérée comme une barrière potentielle à la prolongation de la rétention des œufs *in utero* et par extension, à l'émergence de la viviparité chez les squamates (revue dans Andrews 2002). Lors de la phase d'organogenèse, c'est-à-dire approximativement jusqu'à la ponte des espèces ovipares de squamates (Andrews 2004), les besoins métaboliques des embryons sont minimes. En revanche, ces besoins augmentent exponentiellement durant la seconde moitié du développement, parallèlement à la croissance des fœtus (Clark 1953, Thompson 1989, Vleck et Hoyt 1991, Andrews 2004). Le maintien de la gestation requiert donc de pouvoir subvenir à l'augmentation exponentielle des besoins métaboliques des fœtus. Cette augmentation des besoins métaboliques se traduit à la fois par la nécessité de fournir certains éléments essentiels tels que l'oxygène et l'eau et d'éliminer les déchets métaboliques produits par les fœtus (molécules azotées et dioxyde de carbone). Le maintien de la gestation nécessite donc la mise en œuvre d'ajustements physiologiques et fonctionnels permettant l'élimination des déchets métaboliques et la facilitation des échanges respiratoires et hydriques (*e.g.* réduction d'épaisseur de la coquille, différence d'affinité du sang pour l'oxygène entre mère et embryon, augmentation de la vascularisation et de la surface d'échange, augmentation de la ventilation et du rythme cardiaque maternel – Birchard *et al.* 1984 a et b, Heulin 1990, Qualls 1996, Murphy *et al.* 2010, Parker *et al.* 2010, Munns 2013). Certains de ces ajustements nécessitant une augmentation d'activité métabolique et/ou la synthèse de nouveaux tissus maternels sont susceptibles d'occasionner une augmentation importante de la dépense énergétique maternelle lors de la gestation (*metabolic cost of pregnancy* : MCP).

Le MCP maximal (*i.e.* en fin de gestation) a suscité l'intérêt des physiologistes depuis de nombreuses années (Beuchat et Vleck 1990, Demarco et Guillette 1992, Schultz *et al.* 2008, Dupoué et Lourdais 2014) car cette dépense énergétique des femelles pourrait constituer l'un des coûts majeurs de la reproduction chez les espèces vivipares. Dans notre étude, le MCP en fin de gestation de la forme vivipare de *Z. vivipara* représente une consommation d'oxygène égale à la demande des embryons eux-mêmes ; soit un quart de la demande en oxygène totale de la femelle. Toutes les études réalisées jusqu'à aujourd'hui avaient exclusivement évalué le MCP maximal, à la fin de la période de rétention des œufs (*e.g.* Demarco 1993, Robert et Thompson 2000, Van Dyke et Beaupre 2011, Yue *et al.* 2012). Il est cependant probable, compte tenu de l'accroissement des besoins embryonnaires durant le développement, que le MCP augmente durant la période de rétention et donc qu'il soit significativement moins important chez les espèces ovipares que chez les espèces vivipares. La diversité, à

la fois des méthodes employées pour étudier le MCP chez différentes espèces (*i.e.* biais de comparaisons d'espèces phylogénétiquement éloignées) ont jusqu'à présent empêché de tester rigoureusement cette dernière prédiction (MCP ovipare < vivipare). Par l'utilisation d'une espèce à reproduction bimodale, notre travail a permis de montrer la présence d'un MCP significatif uniquement chez la forme vivipare de *Z. vivipara*, c'est-à-dire uniquement lors de la croissance exponentielle des embryons (Foucart *et al.* 2014).

La littérature et nos propres données sur *Zootoca vivipara* suggèrent donc i) que la faible disponibilité en oxygène dans le tractus génital maternel pourrait constituer un obstacle à la prolongation de la rétention des œufs *in utero* (revue dans Andrews 2002) et ii) que les ajustements permettant de compenser cette faible disponibilité en oxygène sont minimes et peu coûteux (MCP proche de 0) durant la première moitié du développement et sont en revanche plus importants et coûteux (MCP significatif) durant la deuxième partie du développement (période de croissance exponentielle fœtale) (Foucart *et al.* 2014).

Les contraintes volumiques

Lors de la reproduction, la formation des œufs (vitellogenèse) et/ou leur rétention (gravidité et gestation) supposent l'occupation d'un volume plus ou moins important dans l'organisme maternel. Or, le volume disponible y est limité et selon l'importance du volume occupé par les œufs la reproduction induirait à l'apparition d'une contrainte volumique. Lorsque cette contrainte affecte le fonctionnement de l'organisme maternel, on parle de contrainte d'encombrement. Celle-ci va notamment affecter les performances, la morphologie, l'alimentation des femelles (Fitch 1970, Olsson et Shine 1996, Shine 2003, Le Galliard *et al.* 2003, Du *et al.* 2005, Brischoux *et al.* 2011, Bulakhova 2013, Munns 2013), mais également leurs comportements et leur budget temps (*e.g.* modification du comportement de thermorégulation associé à une modification du *thermopreferendum*, modification de la prise de risque, changement de la stratégie d'évitement des prédateurs – Bauwen et Thoen 1981, Lecomte *et al.* 1993). L'espace abdominal disponible pourrait également limiter la possibilité de croissance des embryons/fœtus et cette contrainte volumique influencerait leur développement.

La transition de l'oviparité à la viviparité, c'est-à-dire la prolongation de la rétention durant la phase de croissance exponentielle fœtale, est nécessairement accompagnée d'un

changement des contraintes volumique et d'encombrement pouvant nécessiter des réajustements de la fécondité maternelle (Qualls et Shine 1995, Du *et al.* 2005, Goodman *et al.* 2009), de la taille et du poids moyen des nouveau-nés (Du *et al.* 2005) ou bien encore des caractéristiques corporelles maternelles (Qualls et Shine 1995). Or, les expérimentations et observations effectuées en ce sens semblent montrer que la quantité de descendants produite (nombre et/ou poids total) n'est pas exclusivement déterminée par la contrainte volumique (Du *et al.* 2005, Goodman *et al.* 2009). Ceci suggère que les femelles reproductrices de squamates ne seraient pas « pleines d'œufs », mais présenteraient plutôt une charge reproductrice optimale. Deux études ayant permis d'évaluer les conséquences des changements de contraintes volumiques accompagnant la transition de l'oviparité à la viviparité chez des lézards à bimodalité de reproduction (*Lerista bougainvillii* et *Zootoca vivipara*), ont révélé des différences, mais aussi d'intéressantes similitudes entre les deux espèces examinées. Chez *Lerista bougainvillii*, il y a eu conservation du nombre et du poids individuel des jeunes produits lors de l'évolution de la viviparité et ceci a été en partie permis par une augmentation de taille des femelles vivipares, accompagnée cependant d'une augmentation significative de leur charge d'encombrement (poids relatif de leur ponte ou portée) (Qualls et Shine 1995). Chez *Zootoca vivipara*, les deux formes reproductrices présentent la même relation fécondité/taille (Bleu *et al.* 2012, nos données) et l'évolution de la viviparité s'est accompagnée d'une réduction de la taille et du poids des nouveau-nés (Michel 1995, Stewart *et al.* 2009, Roitberg *et al.* 2013, nos données) et d'une augmentation de l'encombrement maternel (*i.e.* d'après nos résultats, le Δ SVL à la parition et le poids relatif de la ponte/portée sont plus élevés chez les femelles vivipares que chez les femelles ovipares). Il semble donc que l'évolution de la viviparité soit bien accompagnée d'un accroissement de la contrainte d'encombrement maternel, sans cependant affecter la fécondité.

Deux hypothèses non exclusives peuvent alors être proposées pour rendre compte de la réduction de la taille et du poids des nouveau-nés vivipares observées chez *Z. vivipara* (et ce malgré un investissement initial en vitellus similaire entre les formes ovipares et vivipares - Stewart *et al.* 2009). Premièrement, comme mentionné précédemment, des conditions hypoxiques dans l'utérus maternel ont pu occasionner une diminution de l'efficacité du métabolisme embryonnaire et/ou fœtal lors de l'évolution vers la viviparité. Deuxièmement, l'augmentation de la contrainte volumique accompagnant l'évolution de la viviparité aurait aussi limité les possibilités de croissance des fœtus. La possibilité d'un simple effet mécanique direct (*i.e.* croissance

foétale limitée par manque de place), bien que théoriquement envisageable, n'a jamais été explorée. La possibilité d'un effet indirect, lié à une limitation volumique d'absorption d'eau par l'œuf dans l'utérus, a en revanche été documentée par Qualls et Andrews (1999b). Nos données sur le poids des œufs en fin de développement suggèrent aussi l'existence d'une incorporation d'eau moins importante dans les « œufs » vivipares que dans les œufs ovipares de *Zootoca vivipara*. Or, une restriction hydrique durant le développement peut effectivement occasionner une réduction de taille et/ou de poids des nouveau-nés chez certaines espèces de squamates (Packard *et al.* 1980, Snell et Tracy 1985, Tracy et Snell 1985, Gutzke et Packard 1987, Ferguson *et al.* 1990, Shine et Brown 2002, Warner et Andrews 2002). La majeure partie de l'eau nécessaire au développement est absorbée durant la seconde moitié du développement (Xavier et Gavaud 1986, Vleck 1991, Qualls et Andrews 1999b, Ji et Brana 1999, Lourdaï 2015) c'est-à-dire après la ponte de la majorité des espèces ovipares. La littérature suggère effectivement qu'en raison de la limite d'expansion imposée par le volume abdominal maternel, l'environnement utérin restreint les capacités d'absorption d'eau des œufs alors qu'au contraire, l'environnement des sites de pontes n'impose pas une telle limite d'expansion volumique et d'absorption d'eau par les œufs (Andrews et Rose 1994, Mathies et Andrews 1996, Andrews 1997, Qualls et Andrews 1999). Ainsi, la transition évolutive de l'oviparité à la viviparité pourrait induire une contrainte hydrique due à la limitation du volume disponible dans l'organisme maternel, qui ne s'appliquerait pas aux formes ovipares et qui pourrait parfois altérer le développement des fœtus des formes vivipares (*e.g.* réduction de taille, de poids, de condition corporelle) par rapport à celui des fœtus ovipares.

La bimodalité de distribution des stades de développement embryonnaire à la ponte

Une des caractéristiques de la reproduction des squamates est la distribution particulière des stades de développement des embryons à la ponte chez les différentes espèces (Blackburn 1995). La majorité des espèces ovipares réalisant une rétention partielle de leurs œufs jusqu'au premier tiers voire jusqu'à la moitié du développement embryonnaire et les espèces vivipares réalisant une gestation jusqu'à terme (Figure 1 de l'Introduction). Le caractère bimodal de cette distribution et la relative rareté des états intermédiaires de rétention (stades embryonnaires entre 35 et 39, au moment de la ponte) suscitent un certain nombre d'interrogations non seulement sur les modèles théoriques d'évolution (gradualisme ou saltationisme) pouvant s'appliquer à la situation observée (Blackburn 1995, 2006, Qualls *et al.* 1997) mais aussi sur l'éventualité d'une instabilité des étapes

intermédiaires de la transition oviparité-viviparité chez les reptiles.

La dichotomie observée suggère en effet que les squamates auraient un « choix » évolutif entre deux modalités reproductives stables et que les états intermédiaires seraient au contraire relativement instables à l'échelle des temps évolutifs (Smith et Shine 1997, Shine et Thompson 2006). Certaines de nos observations sur *Zootoca vivipara* permettent de discuter de cette hypothèse, suggérant qu'il pourrait exister une modification de la balance des coûts et bénéfices de la rétention des œufs au cours du développement (*e.g.* phase embryonnaire vs. phase fœtale) et que l'intervention de forces sélectives opposées pourrait avoir un effet stabilisant expliquant la bimodalité de la distribution observée. Nous examinerons successivement ci-après, la nature des forces sélectives favorisant potentiellement la rétention des œufs pendant la phase embryonnaire (espèces ovipares) et jusqu'à la fin de la phase fœtale (espèces vivipares) et discuterons enfin du cas particulier des états intermédiaires de rétention.

La phase embryonnaire est une phase de croissance réduite (Clark 1953, Thompson 1989, Vleck et Hot 1991, Andrews 2004) durant laquelle la majorité du développement est dédiée à la mise en place des organes et des différents tissus de l'organisme (Dufaure et Hubert 1961) et qui ne nécessite que peu de ressources (*e.g.* eau, oxygène) et d'énergie comparativement à la période fœtale (Clark 1953, Thompson 1989, Vleck et Hot 1991, Andrews 2004, Foucart *et al.* 2014). En outre, par rapport à la période fœtale, la période embryonnaire du développement semble parfois caractérisée par une plus grande sensibilité thermique (réduction de la qualité des nouveau-nés lors de conditions thermiques contraignantes - Lориoux *et al.* 2013b) et hydrique (absence des structures embryonnaires de régulation des échanges hydriques - Shine et Thompson 2006). On notera de même que les gains phénologiques (raccourcissement de développement) procurés par des conditions thermiques optimales (*e.g.* thermorégulation maternelle), tendent à être plus importants en début (phase embryonnaire) qu'en fin (phase fœtale) de développement (nos propres données sur *Zootoca vivipara* et voir revue de Andrews 2004). Nous avons constaté l'absence de surcoût métabolique de la gravidité (MCP) chez la forme ovipare de *Zootoca vivipara*, c'est-à-dire que le coût de maintien des embryons dans le tractus génital maternel est négligeable jusqu'aux stades 31-32 chez cette espèce. L'association des bénéfices apportés par la thermorégulation maternelle, par l'absence de surcoût métabolique au repos et par la protection maternelle (*e.g.* évitement des événements thermiques ou hydriques extrêmes et des menaces biotiques

existant dans les sites de ponte) constituent une force sélective qui a pu favoriser l'évolution d'une rétention intra-utérine des œufs pendant la phase embryonnaire de développement chez la majorité des espèces ovipares de squamates. Il est important de rappeler également que cette évolution est indissociable des caractéristiques particulières de l'œuf des squamates autorisant le développement dans le tractus génital maternel (coquille parcheminée et extensible facilitant les échanges respiratoires et l'incorporation d'eau, contrairement aux coquilles fortement calcifiées des crocodiliens et chéloniens - Andrews et Mathies 2000).

Nous pouvons penser que l'évolution de la viviparité, c'est-à-dire la prolongation de la rétention jusqu'à la fin de la phase fœtale, comporte le même type de bénéfices que ceux associés à la rétention pendant la phase embryonnaire (voir ci-dessus) et que ceci peut contribuer à encore accroître la vitesse de développement et la qualité et/ou la probabilité de survie des descendants. La synthèse de Pike *et al.* (2008), bien que révélant des différences de survie juvénile (ovipare < vivipare) lors de l'analyse des données brutes (76 populations de 40 espèces), ne révèle cependant pas de telles différences de survie lorsque l'analyse prend en considération la phylogénie des espèces considérées. La comparaison de quelques populations naturelles de *Zootoca vivipara* n'a pas non plus révélé de différences tranchées de survie entre les deux modalités reproductrices (Heulin *et al.* 1994, 1997). Enfin, en dépit des avantages potentiels, on constate que seulement 20% des espèces de squamates sont vivipares, les 80% d'autres espèces ne prolongeant que très rarement la rétention au-delà de la période embryonnaire. L'interprétation de ces observations nécessite de prendre en considération l'existence de contextes sélectifs variables et plus ou moins favorables à l'un ou l'autre des modes reproducteurs (*e.g.* prédation dans les sites de pontes plus ou moins forte ; saison d'activité plus ou moins courte), mais aussi de considérer l'existence d'une accentuation de certaines contraintes développementales lors de la période charnière entre la phase embryonnaire et la phase fœtale. Il s'agit notamment, comme détaillé précédemment, de l'accroissement des besoins (eau, oxygène) durant la phase fœtale, qui nécessite des ajustements physiologiques et fonctionnels entraînant un surcoût métabolique significatif (MCP) chez les femelles vivipares, alors que ce surcoût n'existe pas lors de la phase de rétention embryonnaire des ovipares (Foucart *et al.* 2014). L'apparition du MCP lors de la seconde moitié du développement constitue ainsi une force sélective potentiellement opposée à la rétention des œufs durant la phase fœtale. Outre les coûts énergétiques additionnels (MCP) qu'ils occasionnent, il se pourrait aussi que les ajustements

anatomo-physiologiques associés à la viviparité ne satisfassent que partiellement aux besoins accrus (oxygène et eau) des fœtus *in utero* et entraînent donc parfois des coûts développementaux chez certaines espèces vivipares. La persistance de conditions hypoxiques (Warner *et al.* 2004, Rafferty *et al.* 2013) et la restriction de l’approvisionnement hydrique (Qualls et Andrews 1999b) lors de la vie fœtale *in utero*, pourraient par exemple contribuer à expliquer le moindre poids des nouveau-nés vivipares par rapport aux nouveau-nés ovipares, tel que cela est observé chez *Zootoca vivipara*.

Nous avons évoqué ci-dessus 1°) des bénéfices (*e.g.* optimisation des conditions thermiques d’incubation et protection des œufs *in utero*, raccourcissement de la durée totale de développement) qui se manifestent dès la phase de rétention embryonnaire (*i.e.* chez les espèces ovipares) et qui peuvent être encore accrus par la prolongation de cette rétention à l’ensemble de la phase fœtale (chez les espèces vivipares) et 2°) un certain nombre de contraintes (*e.g.* besoins en oxygène accrus, risque d’hypoxie et de restriction d’approvisionnement hydrique) qui peuvent occasionner des coûts maternels (MCP) ou développementaux lors de la seule phase fœtale (*i.e.* chez les vivipares). Ainsi il existerait deux forces sélectives opposées, l’une favorisant la prolongation de la vie *in utero* indépendamment de la phase développementale (embryonnaire ou fœtale) tandis que l’autre tendrait à restreindre cette prolongation à la seule phase embryonnaire. Dans ce schéma, la sélection de la viviparité ne devrait finalement intervenir que dans des contextes plus sélectifs (*e.g.* plus courtes saisons d’activité ; plus forte mortalité dans les sites de pontes) procurant des gains supplémentaires compensant les coûts de prolongation de la rétention à la vie fœtale. Ainsi, selon les contextes sélectifs, il existerait chez les squamates deux modalités reproductives stables (*i.e.* deux états d’équilibre des coûts/bénéfices) correspondant respectivement à l’oviparité (avec rétention limitée à la phase embryonnaire) et à la viviparité (avec rétention étendue jusqu’à la fin de la phase fœtale). La rareté des états intermédiaires de rétention (pendant seulement une partie de la vie fœtale) serait probablement due à leur relative instabilité évolutive (équilibre coûts/bénéfices précaire dans le temps et/ou l’espace) (Smith et Shine 1997). Toujours selon Smith et Shine (1997), l’instabilité des états intermédiaires pourrait notamment être due au risque de tels états de cumuler à la fois les coûts de l’oviparité (contrôle thermique du développement incomplet, recherche de sites de pontes adéquats, phase d’incubation externe risquée) et de la viviparité (encombrement maternel et MCP accru, diminution de la fréquence de reproduction) sans bénéficier de tous les avantages de l’un et l’autre des modes reproducteurs. Dans le prolongement de cette réflexion, Shine et

Thompson (2006) ont aussi proposé une interprétation mettant en avant les risques corrélés aux caractéristiques de la coquille des œufs. Le processus de régression de la coquille, qui correspond vraisemblablement à une adaptation respiratoire (facilitation des échanges foëto-maternels *in utero*), est en effet un corollaire non seulement de l'évolution de la viviparité (très fine membrane coquillière résiduelle non calcifiée, pouvant parfois se résorber pendant la gestation), mais aussi des états intermédiaires de rétention (coquille imparfaitement calcifiée et moins épaisse que chez les ovipares) (voir revues dans Heulin *et al.* 1992, 2002, Qualls 1996). L'existence de cette coquille imparfaite pourrait constituer à la fois une nécessité (pour les échanges respiratoires *in utero*) et un coût (risques accrus de dessiccation et d'attaques de prédateurs ou de pathogènes dans les sites de pontes) ayant pour conséquences que les états intermédiaires de rétention ne pourraient être adaptés qu'à des contextes sélectifs particuliers, relativement instables dans le temps et l'espace. Cette situation pourrait en outre entraîner un effet rétroactif (*feedback*) conduisant à un emballement du processus sélectif : l'allongement de la rétention, nécessitant une régression plus poussée de la coquille, augmenterait ainsi les risques associés à la phase d'incubation externe des œufs, ce qui nécessiterait alors de prolonger davantage la rétention et donc de réduire davantage la coquille et ainsi de suite. Une fois engagé, le processus de prolongation de la rétention à la vie foëtale ne pourrait donc que se poursuivre, pour atteindre relativement rapidement (à l'échelle des temps évolutifs) son stade ultime, c'est-à-dire la viviparité (Shine et Thompson 2006).

Conclusion

Dans le cadre de cette thèse, nous avons principalement apporté de nouvelles informations sur la variation des coûts de la reproduction au cours du développement embryonnaire, qu'il s'agisse de coûts maternels (MCP, contrainte d'encombrement), ou de coûts pour la descendance (réduction de taille associée à une réduction de la survie juvénile). Nous avons également pu démontrer la variation des bénéfices phénologiques (durée de développement) associés à la thermorégulation comportementale maternelle. Que ce soit pour les coûts ou les bénéfices, nous observons que la variation est dépendante de la période de développement (phase embryonnaire avec une majorité d'organogénèse et phase foëtale avec une majorité de croissance). Or, nous observons une variation opposée, c'est-à-dire une réduction de l'intensité des bénéfices phénologiques, associée à une augmentation drastique des contraintes du maintien de la gestation au cours du développement.



Ces résultats nous ont amenés à discuter de l'existence de deux situations évolutivement stables s'appliquant aux espèces de squamates (oviparité avec ponte aux stades 25 à 33 et viviparité) entre lesquelles une transition évolutive aurait été influencée par la variation de paramètres environnementaux pouvant être extrêmement divers (*e.g.* hypothèse des climats froids, possibilité de fournir un site de ponte, disponibilité en calcium). Les résultats de ce travail sont concordants avec la littérature. Ainsi, l'utilisation du modèle *Z. vivipara*, particulièrement pertinent, nous a permis de tester et apporté des éléments de réponse aux hypothèses autour de l'évolution de l'oviparité vers la viviparité au plus proche de la période de cette transition évolutive.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

- Adams, S.M., Hosie, M.J., Murphy, C.R. et Thompson, M.B.** (2004). Changes in oviductal morphology of the skink, *Lampropholis guichenoti*, associated with egg production. *Journal of Morphology*. **26**: 536–544.
- Andrews, R.M.** (1997). Evolution of viviparity: variation between two sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. *Journal of Zoology* (London). **243**: 579–595.
- 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. *Physiology and Biochemical Zoology*. **75**: 145–154.
- Andrews, R.M.** (2004). Patterns of embryonic development, in: Deeming, D.C. (Ed.), *Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 75–102.
- Andrews R.M., Mathies T., Qualls C.P. et Qualls, F.J.** (1999). Rates of embryonic development of *Sceloporus* lizards: Do cold climates favor the evolution of rapid development? *Copeia*. 692–700.
- Andrews, R.M. et Mathies, T.** (2000). Natural history of reptilian development : constraints on the evolution of viviparity. *Bioscience*. **50**: 227–238.
- Andrews, R.M. et Rose, B.** (1994). Evolution of viviparity: constraints on egg retention. *Physiological Zoology*. **67-4**:1006-1024.
- Angilletta, M.J.** (2009) *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford University press, New York.
- Angilletta, M.J.Jr., Niewiarowski, P.H. et Navas, C.A.** (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*. **27**: 249–268.
- Angilletta, M.J., Oufiero, C.E., Sears, W.S., Sears, M.W.** (2004). Thermal adaptation of maternal and embryonic phenotypes in a geographically widespread ectotherm. *International Congress Series*. **1275** : 258–266.
- Angilletta, M. J. et Sears, M.W.** (2000). The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Functional Ecology*. **14**: 39-45.
- Arnold, E.N., Burton, J.A. et Owenden, D.W.** (1978). *Tous les Reptiles et Amphibiens d'Europe*. Elsevier Sequoia, Bruxelles, 271 p.
- Arnold, E.N., Arribas, O. et Carranza, S.** (2007). Systematics of the palaeartic and oriental lizard tribe *Lacertini* (*Squamata: Lacertidae: Lacertinae*) with descriptions of eight new genera. *Zootaxa*. **143** : 1-86.
- Arrayago, M.J., Bea, A. et Heulin, B.** (1996) Hybridization experiment between oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara*: A new insight into the evolution of viviparity in reptiles. *Herpetologica*. **52**, 333–342.
- Bader, R. A., Bader, M.E. et Rose, D.J.** (1959). The oxygen cost of breathing in dyspnoeic subjects as studied in normal pregnant women. *Clinical Sciences*. **18**: 223-235.

- Bartholomew, G.A.** (1982). Physiological control of body temperature. In " Biology of the Reptilia, Vol 12, Physiology C" Gans C. et Pough H. (Eds), Academic press, New York, pp. 167-211.
- Bauwen, D. et Thoen, C.** (1981). Escape tactics and vulnerability to predation associated with reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of animal Ecology*. **50**: 733-743.
- Bea A., Guillaume C., Arrayago M.J., Heulin B., Pasteur G.** (1990). Phénotypes enzymatiques de *Lacerta vivipara* : premières données comparatives entre populations ovipares et vivipares de cette espèce. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. **310 (serIII)** : 237-243.
- Beaupre, S.J. et Duvall, D.** (1998). Variation in oxygen consumption of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): implications for sexual size dimorphism. *Journal of Comparative Physiology B*. **168**: 497–506.
- Bernard, C.** (2004). Fetal sex ratio variation in the highly polygynous Himalayan tahr : evidence for differential male mortality. *Behavioral Ecology*. **15**, 572–578.
- Beuchat, C.A.** (1988). Temperatures effect during gestation in a viviparous lizard. *Journal of Thermal Biology*. **13**:135-142.
- Beuchat, C.A. et Vleck, D.** (1990). Metabolic consequences of viviparity in a lizard *Sceloporus jarrovi*. *Physiological Zoology*. **63**: 555-571.
- Birchard, G., Black, C., Schuett, G. et Black, V.** (1984). Influence of pregnancy on oxygen consumption, heart rate and hematology in the grater snake implications for the cost of reproduction in live bearing reptiles. *Comparative Biochemistry Physiology*. **77A**: 519–523.
- Birchard, G., Black, C., Schuett, G. et Black, V.** (1984b). Foetal-maternal blood respiratory properties of an ovoviviparous snake the cottonmouth, *Akistrodon piscivorus*. *Journal of experimental biology*. **108**: 247-255.
- Bird, R.B, Stewart, W.E. et Lightfoot, E.N.** (1960). Transport phenomena. John Wiley, New York.
- Blackburn D. G.** (1982). Evolutionary origins of viviparity in the reptilia : I *Sauria*. *Amphibia-Reptilia*. **3** :185-205.
- Blackburn, D. G.** (1992). Convergent evolution of viviparity, matrotrophy and specialization for fetal nutrition in reptiles and other vertebrates. *Amercian Zoologist*. **32**: 313-321.
- Blackburn, D.G.** (1993c). Standardized criteria for the recognition of reproductive modes in squamate reptiles. *Herpetologica*. **49** : 118-132.
- Blackburn D.G.** (1994). Review : discrepant usage of the term "ovoviviparity" in the herpetological literature. *Herpetological Journal*. **4**: 65-72.
- 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). Classification of the reproductive patterns of amniotes. *Herpetological Monographs*. 371-377

- Blackburn, D.G.** (2006). Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs*. **20**: 131-146.
- Blackburn, D.G.** (2014). Evolution of vertebrate viviparity and specializations for fetal nutrition: a quantitative and qualitative analysis. *Journal of Morphology*. **276-8**: 961-990.
- Blackburn, D.G.** (2015). Evolution of vertebrate viviparity and specializations for fetal nutrition: a quantitative and qualitative Analysis. *Journal of Morphology*. **276**: 961-990.
- Bleu, J., Heulin B., Haussy S. et Massot M.** (2012). Experimental evidence of early costs of reproduction in conspecific viviparous and oviparous lizards. *Journal of Evolutionary Biology*. **25-7**: 1264-1274.
- Bleu, J., Massot, M., Haussy, C. et 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 – Biological science*. **279**: 489-498.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H. et White, J.-S. S.** (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. **24**: 127-135.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R. et Lourdais O.** (2001). Short-term versus long-term effect of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*. **92-2** : 297-308.
- Bonnet, X., Shine, R., Lourdais, O. et Naulleau, G.** (2003). Measures of reproductive allometry are sensitive to sampling bias. *Functional Ecology*. **17**: 39–49.
- Brana F. et Bea A.** (1987). Bimodalité de reproduction chez *Lacerta vivipara*. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*. **44** : 1-5.
- Brana, F., Bea, A. et Arrayago, M. J.** (1991). Egg retention in lacertid lizards: relationships with reproductive ecology and the evolution of viviparity. *Herpetologica*. **47**: 218-226.
- Brana, F., Ji, X., Brana, F. et 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.
- Brewin, B.** (1956). The growth and development of a viviparous compound ascidian, Hypsistozoa. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. **97** : 435.
- Brischoux, F., Bonnet, X. et Shine.** (2011).Conflicts between feeding and reproduction in amphibious snakes (sea kraits, *Laticauda spp.*). *Austral ecology*. **36**: 46-52.
- Brown, G.P.G. et Shine, R.** (2004) Maternal nest-site choice and offspring fitness in a tropical snake (*Tropidonophis mairii*, colubridae). *Ecology*. **85**: 1627–1634.
- Bulakhova, N.A.** (2013). A possible error in determining the body length of females of the common lizard (*Zootoca vivipara*, *sauria*, *lacertidae*). *Zoologicheskyy Zhurnal*. **92**: 962-967.
- 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.** (1990). Effects of incubation temperature on behavior of young black racers (*Coluber constrictor*) and kingsnakes (*Lampropeltis getulus*). *Journal of Herpetology*. **24** :158-163.
- Cabrera, M.P., Scrocchi, G.J. et Cruz, F.B.** (2013). Sexual size dimorphism and allometry in *Liolaemus* of the *L. laurenti* group (*Sauria: Liolaemidae*): Morphologic lability in a clade of lizards with different reproductive modes. *Zoologischer Anzeiger*. **252** : 299-306.
- Calderon-Espinosa, M.L., Andrews, R.M. et De la Cruz, F.R.M.** (2006). Evolution of egg retention in the *Sceloporus spinosus* group: Exploring the role of physiological, environmental, and phylogenetic factors. *Herpetological Monographs*. **20-1** : 147–158.
- Capula, M., Luiselli, L. et Rugiero, L.** (1995). Ecological correlates of reproductive mode in reproductively bimodal snakes of the genus *Coronella*. *Vie et Milieu*. **45** : 167-175.
- Choquet, R. et al.** (2006). M-SURGE 1.8 user's manual. CEFE, Montpellier, France.
- Choquet, R., Reboulet, A. M., Pradel, R., Gimenez, O. et LeBreton, J. D.** (2004). M-SURGE: new software specifically designed for multistate capture-recapture models. *Animals Biodiversity and conservation*. **27-1**: 2017-215.
- Clark, H.** (1953). Metabolism of the Black Snake Embryo II. Respiratory Exchange. *Journal of Experimental Biology*. **30**: 502–505.
- Clark, H. et Sisken, B. F.** (1956). Nitrogenous excretion by embryos of the viviparous snake *Thamnophis s. sirtalis*. *Journal of Experimental Biology*. **33**: 384–393.
- Clobert, J., Oppliger, A., Sorci, G., Ernande, B., Swallow, J. G. et Graland, T.** (2000). Trade-offs in phenotypic traits: endurance at birth, growth, survival, predation and susceptibility to parasitism in a lizard, *Lacerta vivipara*. *Functional Ecology*. **14**: 675-684.
- Clutton-Brock, T.H.** (1991). The evolution of parental care. Princeton University Press, Princeton.
- Courty, Y. et Dufaure, J.P.** (1979a). Androgènes testiculaires et cycles spermatogénétiques chez le lézard vivipare. *Compte Rendu de la Société de Biologie*. **173** : 1083-1088
- Courty, Y. et Dufaure, J.P.** (1979b). Levels of testosterone in the plasma and testis of the viviparous lizard (*Lacerta vivipara* jaquin) during annual cycle. General and comparative Endocrinology. **39** : 336-342.
- Courty, Y. et Dufaure, J.P.** (1980). Levels of testosterone, dihydrosterone and androstenedione in the plasma and testis of a lizard (*Lacerta vivipara*) during the annual cycle. General and Comparative Endocrinology. **42**: 325-333.
- Cragg, P.A.** (1978). Oxygen consumption in the lizard genus *Lacerta* in relation to diel variation, maximum activity and body weight. *Journal of Experimental Biology*. **77**: 33-56.
- Crespi, B. et Semeniuk, C.** (2004). Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate reproductive mode. *American Naturalist*. **163** : 635-653.
- Dauphin-Villemant C.** (1987). Etude du fonctionnement de l'interrénale (corticosurrénale) chez la femelle du lézard vivipare- Evolution au cours du cycle

annuel d'activité et de reproduction. Thèse de doctorat d'état de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 171p.

- Dauphin-Villemant, C. et Xavier, F.** (1986). Adrenal activity in the female *Lacerta vivipara*: possible involvement in the success of gestation . In "Endocrine regulation as adaptive mechanisms to the environment", Assenmacher I. et Boissin J. (Eds), CNRS, Paris, PP 241- 250.
- Deeming, D.C. et Ferguson, M.W.J.** (1991). Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds, in: Deeming, D.C., Ferguson, and M.W.J. (Eds.), *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 147–171.
- Demarco V.** (1992). Embryonic development times and egg retention in four species of sceloporine lizards. *Functional Ecology*. **6** : 436-444.
- Demarco, V.** (1993). Metabolic rates of female viviparous lizards (*Sceloporus jarrovi*) throughout the reproductive cycle : do pregnant lizards adhere to standart allometry ? *Physiological Zoology*. **66**: 166–180.
- Demarco, V. et Guilette, L. J.** (1992). Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovi*). *Journal of Experimental Zoology*. **262**: 383-390.
- DeNardo, D.F., Lourdais, O. et Stahlschmidt, Z.R.** (2012). Are females maternal manipulators, selfish, or both? Insights from Pythons. *Herpetologica*. **68**
- Dely, O.G.** (1957). Contribution à l'étude du lézard vivipare (*Lacerta vivipara*) dans la grande plaine Hongroise. *Opuscula Zoologica, Institut of Zoology. University of Budapest*. **2** :13-20
- Dmi'el, R.** (1970). Growth and metabolism in snake embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. **23**: 761–772.
- Du, W., Ji X. et Shine, R.** (2005). Does body-volume constrain reproductive output in lizards? *Biology letters*.**1**: 98-100.
- Dufaure, J.P et Hubert, J.** (1961). Table de développement du lézard vivipare : *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Archives d'Anatomie Microscopique Expérimentale*. **50**: 309-328.
- Dupoué, A. et Lourdais, O.** (2014). Relative reproductive effort drives metabolic changes and maternal emaciation during pregnancy in a viviparous snake. *Journal of Zoology*. **293-1**: 49-56.
- Elphick, M.J. et Shine, R.** (1998). Long term effects of incubation temperatures on the morphology and locomotor performance of hatchling lizards (*Bassiana duperreyi*, *Scincidae*). *Biological Journal of Linnean Society*. **63**: 429–447.
- Farmer, C.G.** (2000). Parental care: the key to understanding endothermy and other convergent features in birds and mammals. *The American Naturalist*. **155**: 326–334.
- Farmer, C.G.** (2003) Reproduction: The adaptive significance of endothermy. *American Naturalist*. **162**: 826–840.
- Ferguson, G.W., Howard, L.S. et Landwer, A.J.** (1990). Proximate control of variation of clutch, egg and body size in a west texas population of *Uta stansburiana stejnegeri* (*Sauria: Iguanidae*). *Herpetologica*. **46**: 227-238.

- Fitch, H.S.** (1970). Reproductive cycles in lizards and snakes. *University of Kansas Publication Museum of Natural History, Misc. Publ.* **52**: 1-247.
- Foucart T., Lourdais O., DeNardo D. et Heulin B.** (2014). Influence of reproductive mode on metabolic costs of reproduction: insight from the bimodal lizard *Zootoca vivipara*. *Journal of Experimental Biology.* **217**: 4049-4056.
- Gavaud, G.** (1983). Obligatory hibernation for completion of vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology.* **225** : 397-405.
- Ghielmi, S., Heulin, B., Surget-Groba, Y. et Guillaume, C.P.** (2001). Identification de populations ovipares de *Lacerta (Zootoca) vivipara* en Italie. *Bulletin de la Société Herpetologique de France.* **98** : 19-29.
- Gilman, C.A. et Wolf, B.O.** (2007). Use of portable ultrasonography as a non destructive method for estimating reproductive effort in lizards. *Journal of Experimental Biology.* **210**: 1859-1867.
- Glandt, D.** (1979). Beitrag zur habitat-okologie von *Lacerta vivipara* im Nordwestdeutschen tiefland nebst hinweisen zue sicherung von zauneigeschenbestanden. *Salamandra.* **15** : 13-30.
- Goodman, B., Hudson, S., Isaac, J. et Schwarzkopf, L.** (2009). The evolution of body shape in response to habitat: is reproductive output reduced in flat lizards? *Evolution.* **63-5**: 1279-1291.
- Gorman, H.E. et Nager R.G.** (2004) Prenatal developmental conditions have long-term effects on offspring fecundity. *The Royal Society London Proceedings B.* **271**: 1923–1928.
- Goutte, A., Antoine, E. et Chastel, O.** (2011) Experimentally delayed hatching triggers a magnified stress response in a long-lived bird. *Hormones and Behavior.* **59**: 167–173.
- Grigg, G. C. et P. Harlow.** (1981). A fetal-maternal shift of blood oxygen affinity in an Australian viviparous lizard, *Sphenomorphus quoyii* (Reptilia, Scincidae). *Journal of Comparative Physiology.* **142**: 495–500.
- Guillaume, Cl.P., Heulin, B., Pavlinov, I.Y., Semenov, D.V., Bea, A., Vogrin, N. et Surget-Groba, Y.** (2006). Morphological variations in the Common Lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Russian Journal of Herpetology.* **13-1**: 1-10.
- Guillette, L.J.** (1982). Effects of gravidity on the metabolism of the reproductively bimodal species *Sceloporus aeneus*. *Journal of Experimental Zoology.* **223**: 33-36.
- Guillette L., Jones R.E., Fitzgerald K.T. et Smith H.M.** (1980). Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. *Herpetologica.* **36** : 201-215.
- Gutzke W. H. N. et Packard G. C.** (1987). Influence of the hydric and thermal environments on eggs and hatchlings of bull snakes *Pituophis melanoleucus*. *Physiology Zoology.* **60**: 9–17.
- Gvozdík, L.** (2002). To heat or to save time? Thermoregulation in the lizard *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) in different thermal environments along an altitudinal gradient. *Canadian Journal of Zoology.* **80** : 479–492.

- Hagan, H.R.** (1950). Embryology of the Viviparous Insects. *Transactions of the New York Academy of Sciences*. **12** : 112–112.
- Heulin, B.** (1985). Démographie d'une population de *Lacerta vivipara* de basse altitude. *Acta Oecologica*. **6** : 261-280.
- Heulin, B.** (1988a) Données nouvelles sur les populations ovipares de *Lacerta vivipara*. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences de Paris*. **306** : 63–68.
- Heulin, B.** (1988b). Observations sur l'organisation de la reproduction et sur les comportements sexuels et agonistiques chez *Lacerta vivipara*. *Vie et Milieu*. **38** : 177-187.
- Heulin, B.** (1990). Etude comparative de la membrane coquillière chez les souches ovipares et vivipares de *Lacerta vivipara*. *Canadian Journal of Zoology*. **68**: 1015-1019.
- Heulin B., Arrayago M.J. et Bea A.** (1989). Expérience d'hybridation entre les souches ovipares et vivipares de *Lacerta vivipara*. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris*. **308 (serIII)** : 341-346
- Heulin, B., Arrayago, M. J., Bea A. et Brana, F.** (1992). Caractéristiques de la coquille des oeufs chez la souche hybride (ovipare X vivipare) du lézard *Lacerta vivipara*. *Canadian Journal of Zoology*. **70**: 2242-2246.
- Heulin, B., Garnier, D., Surget-Groba, Y. et Deunff J.** (2008). Plasma levels of estradiol during vitellogenesis and early gestation in oviparous and viviparous *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Amphibia Reptilia*. **29** :135-139.
- Heulin, B., Ghielmi, S., Vogrin, N., Surget-Groba, Y. et Guillaume, C.P.** (2002). Variation in eggshell characteristics and in intra-uterine 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. et Guillaume, C.** (1989). Extension géographique des populations ovipares de *Lacerta vivipara*. *Revue d'Ecologie, Terre et Vie*. **44-3** : 39-45.
- Heulin, B. et Guillaume, C.P.** (2010). Oviparité et Viviparité des Reptiles. In : ' Reptiles de France, Belgique, Luxembourg et Suisse'. Editions Biotope, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, pp 37-43
- Heulin, B., Guillaume, C. P., Bea, A. and Arrayago, M. J.** (1993). Interprétation biogéographique de la bimodalité de reproduction du lézard *Lacerta vivipara*: un modèle pour l'étude de l'évolution de la viviparité. *Biogeographica*. **69** : 1-11.
- Heulin, B., Guillaume, C.P., Vogrin, N., Surget-Groba, Y. et Tadic, Z.** (2000). Further evidence of the existence of oviparous population of *Lacerta (Zootoca) vivipara* in the NW of the Balkan Peninsula. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*. **323** : 461-468.
- Heulin, B., Osenegg, K. et Lebouvier, M.** (1991). Timing of embryonic development and birth dates in oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara*: testing the predictions of an evolutionary hypothesis. *Acta oecologica*. **12-4** : 517-528.
- Heulin, B., Osenegg, K. et Michel, D.** (1994). Survie et incubation des œufs dans deux populations ovipares de *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia*. **15**: 199-219.

- Heulin, B., Osenegg, K. et Michel, D.** (1997). Demography of a bimodal reproductive species of lizard (*Lacerta vivipara*): survival and density characteristics of oviparous populations. *Herpetologica*. **53-4** : 432-444.
- Heulin, B., Stewart, J. R., Surget-Groba, Y., Bellaud, P., Jouan, F., Lancien, G. et Deunff J.** (2005). Development of the uterine shell glands during the pre-ovulatory and early gestation periods in oviparous and viviparous *Lacerta vivipara*. *Journal of Morphology*. **266**: 80-93.
- Heulin, B., Surget-Groba, Y., Guiller, A., Guillaume, C.P. Deunff, J.** (1999). Comparisons of mtDNA sequences (16S rRNA Gene) between oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara* . *Molecular Ecology*. **8** : 1627-1631.
- Heulin, B., Surget-Groba, Y., Sinervo, B., Miles, D. et Guiller, A.** (2011). Dynamics of haplogroup frequencies and survival rates in a contact zone of two mtDNA lineages of the lizard *Lacerta vivipara*. *Ecography*. **34**: 436–447.
- Hodges, W.L.** (2004). Evolution of viviparity in horned lizards (*Phtunosoma*): testing the cold-climate hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*. **17**: 1230-1237
- Hoversland, A. S., Metcalfe, J. et Parer, J. T.** (1974). Adjustment in maternal blood gases, acid-base balance and oxygen consumption in the pregnant pygmy goat. *Biology of Reproduction*. **10**: 589-595.
- Huey R.B.** (1982). Temperature, Physiology and the ecology of Reptiles. In " Biology of the Reptilia, Vol 12, Physiology C" Gans C. et Pough H. (Eds), Academic press, New York, pp. 25-91.
- Huey, R.B., Berrigan, D., Gilchrist, G.W. et Herron, J.C.** (1999) Testing the adaptive significance of acclimation: a strong inference approach. *American Zoologist*. **39**:323.
- Hytten, F. et Leitch, I.** (1971). The Physiology of Human Pregnancy, 2nd Ed. Oxford: Blackwell Science.
- Ji, X. et Brana, 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 Physiology Part A*. **124**: 205-213.
- Joly, J. et Saint giron, H.** (1981). Influence de la température sur la vitesse de spermatogénèse de *Lacerta vivipara* et comparaison avec *Lacerta muralis*. Bulletin de la Société Zoologique de France. **106** : 337-340.
- Jones, J.C., et Reynolds, J.D.** (1999a). Oxygen and the trade-off between egg ventilation and brood protection in the common goby. *Behaviour*. **136**: 819–832.
- Jones, J.C., et Reynolds, J.D.** (1999b). Costs of egg ventilation for male common gobies breeding in conditions of low dissolved oxygen. *Animal Behavior*. **57**: 181–188.
- Jacquin J.F.** (1787). Sur la viviparité d'un lézard. *Nota Acta Helvet*. 1: 33.
- Keller-Wood, M., Richards, E.M., Scheuer, D.A. et Wood, C.E.** (2012). Effect of Increased Cortisol on Heart Rate in Pregnant Ewes. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. **26**.
- Kenward, M.G. et Roger, J.H.** (1997) Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*.**53**: 983–997.

- Köhler, F., Von Rintelen, T., Meyer, A. et Glaubrecht, M.** (2004). Multiple origin of viviparity in southern Asian gasteropods (*Cerithioidea: Pachychilidae*) and its evolutionary implication. *Evolution*. **58** : 2215-2226.
- Kratochvil, L., Fokt, M., Rehak, I. et Frynta, D.** (2003). Misinterpretation of character scaling: a tale of sexual dimorphism in body shape of common lizards. *Canadian Journal of Zoology*. **81** : 1112-1117
- Lambert, S. M. et Wiens, J. J.** (2013). Evolution of viviparity: a phylogenetic test of the cold climate hypothesis in Phrynosomatid lizards. *Evolution*. **67-9** : 2614-2630.
- Lang, J. W.** (1987). Crocodylian behavior: implications for management. Pages 273–300 in G. J. W. Webb, S. C. Manolis, and P.J.Whitehead, eds. *Wildlife management: crocodiles and alligators*. Surrey, Beatty, Chipping Norton
- Lantz, L.A.** (1927). Quelques observations nouvelles sur l'herpétologie des Pyrénées centrales. *Bulletin d'Histoire Naturelle Applic.* **8** : 54-61.
- Lardies, M.A. et Fernandez, M.** (2002). Effect of oxygen availability in determining clutch size in *Acanthina monodon*. *Marine Ecology Progress Series*. **239**: 139–146.
- Le Breton, J. D., Burnham, K., Clobert, J. et Anderson, D.** (1992). Modeling survival and testing biological hypothesis using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*. **62**: 67-118.
- Le Galliard, J. F., Le Bris, M. and Clobert, J.** (2003). Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology*. **17**: 877-885.
- Le Henanff, M., Meylan, S. and Lourdais, O.** (2013). The sooner the better: reproductive phenology drives ontogenetic trajectories in a temperate squamate (*Podarcis muralis*). *Biological Journal of Linnean Society*. **108**: 384-395.
- Lecomte, J., Clobert, J. et Massot, M.** (1992). Sex identification in juveniles of *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia*. **13**: 21-25.
- Lecomte, J., Clobert, J. et Massot, M.** (1993). Shift in Behaviour related to pregnancy in *Lacerta vivipara*. *Revue d'Ecologie (Terre Vie)*. **48** : 99-107.
- Lee, C.E. et Strathmann, R.R.** (1998). Scaling of gelatinous clutches: effects of siblings' competition for oxygen on clutch size and parental investment per offspring. *American Naturalist*. **151** : 293–310.
- Liang, L., Sun, B.-J., Ma, L., Du, W.-G.** (2015). Oxygen-dependent heat tolerance and developmental plasticity in turtle embryos. *Journal Comparative Physiology B*. **185** : 257–263.
- Lin, C. X., Zhang, L. et Ji, X.** (2008). Influence of pregnancy on locomotor and feeding performances of the skink, *Mabuya multifasciata*: why do females shift thermal preferences when pregnant? *Zoology*. **111**: 188-195.
- Lindstrom, J.** (1999). Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology and Evolution*. **14**: 343–348.

- Lorenzon, P., Clobert, J., Oppliger, A. et John-Adler, H.** (1999) - Effect of water constraint on growth rate, activity and body temperature of yearling common lizard. *Oecologia*. **118** : 423-430.
- Lorioux, S., DeNardo, D.F., Gorelick, R. et Lourdais, O.** (2012). Maternal influences on early development: preferred temperature prior to oviposition hastens embryogenesis and enhances offspring traits in the Children's python, *Antaresia childreni*. *Journal of Experimental Biology*. **215**: 1346–1353.
- Lorioux, S., Lisse, H. et Lourdais, O.** (2013b). Dedicated mothers: predation risk and physical burden do not alter thermoregulatory behaviour of pregnant vipers. *Animal Behaviour*. **86** : 401-408.
- Lorioux, S., Vaugoyeau, M., DeNardo, D.F., Clobert, J., Guillon, M. et Lourdais, O.** (2013a). Stage dependence of phenotypical and phenological maternal effects: Insight into squamate reptile reproductive strategies. *American Naturalist*. **182**: 223-233.
- Lourdais, O., Bonnet, X. et Doughty, P.** (2002). Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal of Experimental Zoology*. **29**: 487-493.
- Lourdais, O., Guillon, M., DeNardo, D.F. et Blouin-Demers, G.** (2013). Cold climate specialization: adaptive covariation between metabolic rate and thermoregulation in pregnant vipers. *Physiology and Behavior*. **119**: 149–55.
- Lourdais, O., Heulin, B. et DeNardo, D.F.** (2008). Thermoregulation during gravidity in the children's python (*Antaresia childreni*): a test of the preadaptation hypothesis for maternal thermophily in snakes. *Biological Journal of Linnean Society*. **93**: 499-508.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Naulleau, G., Guillon, M. et Naulleau, G.** (2004) Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*. **104**: 551–560.
- Lourdais, O., Lorioux, S., Dupoué, A., Wright, C. et DeNardo, D.F.** (2015). Embryonic water uptake during pregnancy during pregnancy is stage and fecundity dependant in the snake *Vipera aspis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **189** : 102-106.
- Lowenborg, K., Shine, R., Karvemo, S. et Hagman, M.** (2010). Grass snakes exploit anthropogenic heat sources to overcome distributional limits imposed by oviparity. *Functional Ecology*. **24**: 1095–1102.
- 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. et Clutton-Brock, T.** (2002). Early development, survival and reproduction in humans. *Trends in Ecology and Evolution*. **17**: 141–147.
- Maderson, P.F.A. et Bellairs, A d'A.** (1962). Culture methods as an aid to experiment on reptile embryos. *Nature*. **195**: 401-402.
- Marshall, D.J. et Uller, T.** (2009). When is maternal effect adaptive? *Oikos*. **116** : 1957-1963.
- Mathies T. et Andrews R.** (1996). Extended egg retention and its influence on embryonic development and egg water balance: implication for the evolution of viviparity. *Physiological Zoology*. **69**: 1021-1035.

- Mayer, W., Bohme, W., Tiedemann, F. et Bischoff, W.** (2000). On oviparous populations of *Zootoca vivipara* in south-eastern Central Europe and their phylogenetic relationship to neighbouring viviparous and south-west European populations. *Herpetozoa*. **13** : 59-69.
- Meylan, S., Dufty A. M. et Clobert J.** (2003). The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone level in pregnant *Lacerta vivipara*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **134**: 497-503.
- Meylan, S., Haussy, C. et Voituron, Y.** (2000). Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *General and comparative endocrinology*. **169** : 158-166.
- Michel, D.** (1995). Influence des conditions d'incubation des œufs sur le développement embryonnaire et les caractéristiques à la naissance de la souche ovipare de *Lacerta vivipara*. D.E.A de Biologie et des Populations de L'Université de Rennes. 1. 29
- Mills, N.E. et Barnhart, M.C.** (1999.) Effects of hypoxia on embryonic development in two *Ambystoma* and two *Rana* species. *Physiological and Biochemical Zoology*. **72**: 179–188.
- Morafka, D.J., Spangenberg, E.K. et Lance, V.A.** (2000). Neonatology of Reptiles. *Herpetological Monographs*. **14** : 353-370.
- Mousseau, T.A. et Fox, C.W.** (1978). Maternal effects as adaptations. Oxford university Press.
- Mousseau, T.A., Uller, T., Wapstra, E. et Badyaev, A. V.** (2009). Evolution of maternal effects: past and present. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. **364**: 1035–1038.
- Munns, S.** (2013). Gestation increase the energetic cost of breathing in lizard, *Tiliqua rugosa*. *Journal of Experimental Biology*. **218**: 931-939.
- Murphy, B.F., Parker, S.L., Murphy, C.R. et Thompson, M.B.** (2010). Angiogenesis of the uterus and chorioallantois in the eastern water skink *Eulamprus quoyii*. *Journal of Experimental Biology*. **213**: 3340–3347.
- Neill, W.T.** (1964). Viviparity in snakes: some ecological and zoogeographical considerations. *American Naturalist*. **98** : 35-55.
- Nilsson, J. et Raberg, L.** (2001). The resting metabolic cost of egg laying and nestling feeding in great tits. *Oecologia*. **128**: 187–192.
- Olsson, M. et Shine, R.** (1996). Does reproductive success increase with age or with size in species with indeterminate growth? A case study using sand lizards (*Lacerta agilis*). *Oecologia*. **105**: 175-178.
- Olsson, M., Shine, R. et Bak-Olsson, E.** (2000). Locomotor impairment of gravid lizards: is the burden physical or physiological? *Journal of Evolutionary Biology*. **13**: 263-268.
- Olsson, M., Wapstra, E. et Olofsson, C.** 2002. Offspring size-number strategies : experimental manipulation of offspring size in a viviparous lizard (*Lacerta vivipara*). *Functional Ecology*. **16** : 135 – 140.

- Osgood, D.W.** (1978). Effects of temperature on the development of meristic characters in *Natrix fasciata*. *Copeia*. **1978**: 33-47.
- Packard, G. C. et Packard, M. J.** (1988). The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. In: Gans C, Huey RB, editors. *Biology of the Reptilia*, vol. 16. New York: A. Liss, 523–605.
- Packard, M. J., Packard, G. C. et Boardman, T. J.** (1980). Water balance of the eggs of a desert lizard (*Callisaurus draconoides*). *Canadian Journal of Zoology*. **58** : 2051-2058.
- Packard, G.C., Tracy, C. et 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.
- Panigel, M.** (1956). Contribution à l'étude de l'ovoviviparité chez les reptiles : gestation et parturition chez le lézard vivipare *Zootoca vivipara*. *Annales des sciences naturelles*. **18** : 569-668.
- Parent, G.H.** (1979). Atlas provisoire commenté de l'herpétofaune de la Belgique et du Grand Duché du Luxembourg. *Les Naturaliste Belges*. **60** : 251-333.
- Parker, S.L., Andrews, R.M. et Mathies, T.** (2004). Embryonic responses to variation in oviductal oxygen in the lizard *Sceloporus undulatus* from New Jersey and South Carolina, USA. *Biological Journal of Linnean Society*. **83**: 289–299.
- Parker, S.L., Manconi, F., Murphy, C.R. et Thompson, M.B.** (2010). Uterine and placental angiogenesis in the Australian skinks, *Ctenotus taeniolatus*, and *Saiphos equalis*. *Anatomical Record*. **293**: 829–838.
- Patterson, J.W et Davies, P.M.C.** (1978). Preferred body temperature: seasonal and sexual differences in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Thermal Biology*. **3**: 39-41.
- Paulesu, L., Bigliardi, E., Paccagnini, E., Letta, F., Cateni, C., Guillaume, C.P., Heulin, B.** (2005). Cytokines in the oviparity/viviparity transition : evidence of the interleukin-1 system in a species with reproductive bimodality, the lizard *Lacerta vivipara*. *Evolution and Development*. **7**: 282-288.
- Pearson, J.T., Noma, Y., Tazawa, H.** (1999). Developmental patterns of heart rate in altricial avian embryos and hatchlings. *Journal of Experimental Biology*. **202**: 1545–1550.
- Pembrey, M.E.** (2002). Time to take epigenetic inheritance seriously. *European Journal of Human Genetics*. **44**: 669–671.
- Pernoll, M. L., Metcalfe, J., Kovach, P. A., Wachtel, R. et Dunham M.J.** (1975). Ventilation during rest and exercise in pregnancy and postpartum. *Respiratory Physiology*. **25**: 285-293.
- Phillips, J. A., Garel, A., Packard, G.C., et Packard, M. J.** (1990). Influence of moisture and temperature on eggs and embryos of green iguanas (*Iguana iguana*). *Herpetologica*. **46**, 238-245.
- Pike, D.A., Pizzatto, L., Pike, B.A. and Shine, R.** (2008). Estimating survival rates of uncatchable animals : the myth of high juvenil mortality in reptiles. *Ecology*. **89-3** : 607-611.

- Pilorge, T. et Barbault, R.** (1981). La viviparité chez les lézards : évolution et adaptation. *Acta Oecologica*. **2** : 387-397.
- Pincheira-Donoso, D., Tregenza, T., Witt M. et Hodgson, D.** (2013). The evolution of viviparity opens opportunities for lizard radiation but drives it into a climatic cul-de-sac. *Global Ecology and Biogeography*. **22**: 857-867.
- Pyron, R.A., Burbrink, F.T., et Wiens, J.J.** (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*. **13** : 93.
- Qualls, C.P.** (1996). Influence of the evolution of viviparity on eggshell morphology in the lizard *Lerista bougainvillii*. *Journal of Morphology*. **228**: 119-125.
- Qualls, C.P. et Andrews, R. M.** (1998). 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.
- Qualls, C.P. et Andrews, R.M.** (1999a). 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.
- Qualls, C. P. et Andrews, R. M.** (1999b). Maternal body volume constrains water uptake by lizard eggs *in utero*. *Functional Ecology*. **13**. 845-851.
- Qualls, C.P., Andrews, R.M. et Matthies, T.** (1997). The evolution of viviparity and placentation revisited. *Journal of Theoretical Biology*. **185** : 129-135.
- Qualls, C.P. et Shine, R.** (1995). Maternal body volume as a constraint on reproductive output in lizards: evidence from the evolution of viviparity. *Oecologia*. **103** : 73-78.
- Qualls, C.P. et Shine, R.** (1998). Costs of reproduction in conspecific oviparous and viviparous lizards, *Lerista bougainvillii*. *Oikos*. **82** : 539-552
- Qualls, C. P., Shine, R., Donnellan, S. et Hutchison, M.** (1995). The evolution of viviparity in the Australian scincid lizard *Lerista bougainvillii*. *Journal of Zoology*. **237**: 13-26.
- Rafferty, A. R., Evans, R.G., Scheelings, T.F. et Reina, R.** (2013). Limited oxygen availability *in utero* may constrain the evolution of live birth in reptiles. *The American Naturalist*. **181-2**: 245-253.
- Reichling H.** (1957). Transpiration und vorzugtemperatur Mittelueropäischer Reptilien und Amphibien. *Zoologische Jahrbücher Physiology*. **67** : 1-64.
- Ricklefs, R.E. et Wikelski, M.** (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology and Evolution*. **17**: 462–468.
- Robert, K.A. et Thompson, M.B.** (2000). Energy consumption by embryos of a viviparous lizard, *Eulamprus tympanum*, during development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A.*: 481-486.
- Rodriguez Diaz, T. et Brana, F.** (2011a). Plasticity and limitations of extended egg retention in oviparous *Zootoca vivipara* (Reptilia: Lacertidae). *Biological Journal of Linnean Society*. **102**: 75-82.

- Rodriguez Diaz, T. et Brana, F.** (2011b). Shift in thermal preferences of female oviparous common lizards during egg retention: insights into the evolution of reptilian viviparity. *Evolutionary Biology*. **38**: 352-359.
- Rodriguez-Diaz, T. et Brana, F.** (2012). Altitudinal variation in egg retention and rates of embryonic development in oviparous *Zootoca vivipara* fits predictions from the cold-climate model on the evolution of viviparity. *Journal of Evolutionary Biology*. **25**: 1877–1887.
- Rodriguez Diaz, T., Gonzalez, F., Ji, X. et Brana, 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.
- Roitberg, E.S., Kuranova, V.N., Bulakhova, N.A., Orlova, V.F., Eplanova, G.V., Zinenko, O.I., Shamgunova, R.R., Hofmann, S. et Yakovlev, V.A.** (2013). Variation of reproductive traits and female body size in the most widely-ranging terrestrial Reptile: testing the effect of reproductive mode, lineage and climate. *Evolutionary Biology*. **40**: 420-438.
- Roitberg, E.S., Orlova, V.F., Kuranova, V.N., Bulakhova, N.A., Zinenko, O.I., Ljubisavljevc K., Shamgunova, R.R., Carretero, M.A., Clasen, A., Fokt M. et Böhme W.** (2011). Inter-observer and intra-observer differences in measuring body length: a test in the common lizard, *Zootoca vivipara*. *Amphibia-Reptilia*. **32** : 477-484
- Scharf, I. et Meiri, S.** (2013). Sexual dimorphism of heads and abdomens: Different approaches to 'being large' in female and male lizards. *Biological Journal of Linnean Society*. **110** : 665-673.
- Schultz, T. J., Webb, J. K. et Christian, K. A.** (2008). The physiological cost of pregnancy in a tropical viviparous snake. *Copeia*. **2008**, 637-642.
- Schwarzkopf, L. et Andrews, R.M.** (2012a). Are moms manipulative or just selfish? evaluating the "maternal manipulation hypothesis" and implications for life-history studies of reptiles. *Herpetologica*. **68** : 147-159
- Schwarzkopf, L. et Andrews, R.M.** (2012b). "Selfish mothers" use "maternal manipulation" to maximize lifetime reproductive success. *Herpetologica*. **68** : 308-311.
- Schwarzkopf, L. et Shine,R.** (1992). Cost of reproduction in lizards : escape tactics and susceptibility to predation. *Behavioral Ecology and sociobiology*. **31** : 17-25.
- Sergeev A.M.** (1940). Researches on viviparity in Reptiles. *Moscow Society of Naturalist*. **1940** : 1-34.
- Seymour, R.S.** (1999). Respiration of aquatic and terrestrial amphibian embryos. *American Zoologist*. **39**: 261–270.
- Shine, R.** (1980). Costs of reproduction in reptiles. *Oecologia*. **46**: 92-100.
- Shine, R.** (1983). Reptilian reproductive modes: the oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica*. **39**: 1-8.
- Shine, R.** (1985). The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In *Biology of the Reptilia* (Ed C. Gans and F. Billet), vol 15, pp. 605-694. New York: Wiley Press.

- Shine, R.** (1988). Parental care in reptiles. *Biology of Reptilia*, vol. 16(ed C. et H.R.B. Gans), pp.275-329.
- Shine, R.** (1992). Relative Clutch Mass and Body Shape in Lizards and Snakes - Is Reproductive Investment Constrained or Optimized. *Evolution*. **46** : 828-833.
- Shine, R.** (1995). A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *American Naturalist*. **145**: 809-823.
- Shine, R.** (2002). Reconstructing an adaptationist scenario: What selective forces favor the evolution of viviparity in montane reptiles? *American Naturalist*. **160**: 582–593.
- Shine, R.** (2003). Effects of pregnancy on locomotor performance: an experimental study on lizards. *Oecologica*. **136**: 450-456.
- Shine, R.** (2004a). Adaptive consequences of developmental plasticity, in: Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour. pp. 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 Linnean Society*. **83**: 145–155.
- Shine, R.** (2004c). Does viviparity evolve in cold climate reptiles because pregnant females maintain stable (not high) body temperatures? *Evolution*. **58**: 1809–1818.
- Shine, R.** (2005). Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematic*. **36**: 23-46.
- Shine, R.** (2006). Is increased maternal basking an adaptation or a pre-adaptation to viviparity in lizards? *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology*. **305A**: 524–535.
- Shine, R.** (2012). Manipulative mothers and selective forces: The interplay between reproduction and thermoregulation in reptiles. *Herpetologica*. **68**: 289-298.
- Shine, R.** (2014). Evolution of an evolutionary hypothesis: a history of changing ideas about the adaptive significance of viviparity in Reptiles. *Journal of Herpetology*. **48**: 147-161.
- Shine, R. et Brown, G. P.** (2002). Effects of seasonally varying hydric conditions on hatchling phenotypes of keelback snakes *Tropidonophis mairii*, (Colubridae) from the Australian wet-dry tropics. *Biology Journal of Linnean Society*. **76-3**: 339-347.
- Shine, R. et Bull J.J.** (1979). The evolution of live-bearing in lizards and snakes. *American Naturalist*. **113** : 905-923.
- Shine, R. et Harlow, P.** (1993). Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia*. **96**: 122–127.
- Shine, R., Madsen, T.R.L., Elphick, M.J. et Harlow, P.S.** (1997). The influence of nest temperatures and maternal brooding on hatchling phenotypes in water pythons. *Ecology*. **78**: 1713–1721.
- Shine, R. et Schwarzkopf, L.** (1992). The Evolution of Reproductive Effort in Lizards and Snakes. *Evolution*. **46**: 62-75.

- Shine, R. et Thompson, M.B.** (2006). Did embryonic responses to incubation conditions drive the evolution of reproductive modes in squamate reptiles? *Herpetological Monographs*. **20**: 159-171
- Singer, D. et Muehlfeld, C.** (2007). Perinatal adaptation in mammals: The impact of metabolic rate. *Comparative Biochemistry Physiology Part A*. **148**: 780–784.
- Smith, H. M.** (1975). Grist for the mills of herpetophiles in Mexico. Bulletin of the Maryland Herpetophiles Society. **11** : 40-44.
- Smith, S. et Shine, R.** (1997). Intraspecific variation in reproductive mode within the Scincid lizard *Saiphos equalis*. *Australian Journal of Zoology*. **45**: 435-445.
- Snell, H. L. et Tracy, C. R.** (1985). Behavioral and morphological adaptations by Galapagos land iguanas (*Conolophus subcristatus*) to water and energy requirements of eggs and neonates. *American Zoologist*. **25**: 1009–18.
- Stahlschmidt, Z.R. et Denardo, D.F.** (2009). Obligate costs of parental care to offspring: egg brooding-induced hypoxia creates smaller, slower and weaker python offspring. *Biological Journal of Linnean Society*. **98**: 414–421.
- Stahlschmidt, Z.R., Heulin, B. et DeNardo, D.F.** (2010). The role of python eggshell permeability dynamics in a respiration-hydration trade-off. *Physiological and Biochemical Zoology*. **83**: 576–586.
- Stearns, S.C.** (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology*. **3**: 259–268.
- Stewart, J.R.** (1989). Facultative placentotrophy and the evolution of squamate Placentation : quality of eggs and neonates in *Virginia striulata*. *American Naturalist*. **133** : 111-137.
- Stewart, J.R.** (2013). Fetal nutrition in lecithotrophic squamate reptiles: Toward a comprehensive model for evolution of viviparity and placentation. *Journal of Morphology*. **274**: 824-843.
- Stewart J.R., Ecy T.W. et Heulin B.** (2009). Calcium provision to oviparous and viviparous embryos of the reproductively bimodal lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Journal of Experimental Biology*. **212-16** : 2520-2524.
- Stewart, J.R., Ecy, T.W., Heulin, B., Fregoso, S.P. et Linville, B.J.** (2011). Developmental expression of calcium transport proteins in extraembryonic membranes of oviparous and viviparous *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Journal of experimental Biology*. **214** : 2999-3004.
- Stewart, J.R, Heulin, B. et Surget-Groba, Y.** (2004). Extraembryonic membrane development in a reproductively bimodal lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Zoology*. **107**: 289-314.
- Stewart, J.R. et Thompson, M.B.** (1993). A novel pattern of embryonic nutrition in a viviparous reptile. *Journal of Experimental Biology*. **174** : 97-108.
- Stewart, J. R. et Thompson, M. B.** (2000). Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. *Comparative Biochemistry Physiology A*. **127**: 411-431.

- Surget-Groba Y.** (2002). Phylogéographie du lézard *Lacerta (Zootoca) vivipara* et évolution de la viviparité. Thèse de Doctorat es Sciences de l'Université de Rennes1. 167p.
- Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C.P., Puky, M., Semenov, D., Orlova, V., Kupriyanova, L., Ghira, I., Smajda, B.** (2006). Multiple origins of viviparity, or reversal from viviparity to oviparity? The European common lizard (*Zootoca vivipara*, *Lacertidae*) and the evolution of parity. *Biological Journal of the Linnean Society* . **87** : 1-11.
- Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C.P., Thorpe, R.S., Kupriyanova, L.M.S., Vogrin, N., Maslak, R., Mazzotti, S., Venczel, M., Ghira, I., Odierna, G., Leontyeva, O., Monney, J.C. et Smith, N.D.** (2001). Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **18-3**: 449-459.
- Sun, Y.Y., Du, Y., Yang, J., Fu, T.B., Lin, C.X et Ji, X.** (2012). Is the evolution of viviparity accompanied by a relative increase in maternal abdomen size in lizards? *Evolutionary Biology*. **39**: 388-399.
- Tate, K.B., Kohl, Z.F., Eme, J., Rhen, T., Crossley II, D.A.** (2015). Critical Windows of Cardiovascular Susceptibility to Developmental Hypoxia in Common Snapping Turtle (*Chelydra serpentina*) Embryos. *Physiological and Biochemical Zoology*. **88**: 103–115.
- Thompson, M.B.** (1989). Patterns of metabolism in embryonic reptiles. *Respiratory Physiology*. **76**: 243–256.
- Thompson, M.B. et Blackburn, D.G.** (2006). Evolution of viviparity in reptiles: Introduction to the symposium. *Herpetological Monographs*. **20-1**:129–130.
- Thompson, M.B. et Russel, K.J.** (1999). Growth and energetic of embryos of the gecko *Phyllodactylus marmoratus*, a species with hard shells eggs. *Herpetological Journal*. **9**: 37–42.
- Tinkle, D.W. et Gibbons, J.W.** (1977). The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous Publication of Museum of Zoology. University of Michigan*. **154**: 1-55.
- Tinkle, D.W., Wilbur, H.M. et Tilley, S.G.** (1970). Evolutionary strategies in lizard reproduction. *Evolution*. **24**: 55-74.
- Tracy, C. R. et Snell, H. L.** (1985). Interactions among water and energy relations of reptilian eggs, embryos, and hatchlings. *American Zoologist*. **25** : 999-1008.
- Van Damme, R., Bauwens, D., Brana, F. et Verheyen, R.F.** (1992). Incubation temperature differentially affects hatching time, egg survival and sprint speed in the lizard *Podarcis muralis*. *Herpetologica* . **48**: 220-228.
- Van Damme, R., Bauwens, D. et Verheyen, R.F.** (1990). Effect of relative clutch mass on sprint speed in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Herpetology*. **23**: 459-461.
- Van Dyke, J. U. et Beaupre, S. J.** (2011). Bioenergetic components of reproductive effort in viviparous snakes: Costs of vitellogenesis exceed costs of pregnancy. *Comparative Biochemistry Physiology Part A*. **160**: 504-515.

- Van Dyke, J.U., Brandley, M.C. et Thompson, M.B.** (2014). The evolution of viviparity: molecular and genomic data from squamate reptiles advance understanding of live birth in amniotes. *Reproduction*. **147**, R15-R26.
- Van Nuland, G.J. et Strijbosch H.** (1981). Annual Rythmics of *Lacerta vivipara* JACQUIN and *Lacerta agilis agilis* L. (*Sauria, Lacertidae*) in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*. **2** : 83-95
- Vezina, F. et Williams, T.D.** (2002).Metabolic costs of egg production in the European Starling (*Sturnus vulgaris*). *Physiological and Biochemical Zoology*. **75**: 377–385.
- Vitt, L.J. et Congdon, J.D.** (1978). Body shape, reproductive effort and relative clutch mass in lizards : resolution of a paradox. *American Naturalis*. **112** : 595-608.
- Vladimirova, I.G., Alekseeva, T.A. et Nechaeva, M. V.** (2005). Growth and oxygen consumption in embryonic and early postembryonic development of European pond turtle *Emys orbicularis* (*Reptilia : Emydidae*). *Biology Bulletin*. **32**: 172–178.
- Vleck, D.** (1991). Water economy and solute regulation of reptilian and avian embryos. In "Egg incubation, its effect embryonic development in Reptiles and Birds", Deemming D.C. et Ferguson M.W.J. (Eds), Cambridge university press, Cambridge, 245-259.
- Vleck, C. et Hoyt, D.** (1991). Metabolism and energetics of reptilian and avian embryos. pp. 285–306.
- Voituron, Y., Heulin, B, Surget-Groba, Y.** (2004). Comparison of the cold hardiness capacities of the oviparous and viviparous forms of *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology*. **301 A** : 367-373.
- Wang, Z., Lu, H.L., Ma, L. et Ji, X.** (2014). Viviparity in high-altitude *Phrynocephalus* lizards is adaptive because embryos cannot fully develop without maternal thermoregulation. *Oecologia*. **174**: 639–649.
- 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. et 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. et Andrews, R.M.** (2002). Laboratory and field experiments identify sources of variation in phenotypes and survival of hatchling lizards. *Biological Journal of Linnean Society*. **76**: 105-124.
- Warner D.A. et Shine R.** (2007). Fitness of juvenile lizards depends on seasonal timing of hatchling, not offspringbody size. *Oecologia*. **154**: 65-73.
- Webb, J.K., Brown, G.P. et 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., Shine, R. et Christian, K. A.** (2005). The adaptative significance of reptilian viviparity in the tropics: testing the maternal manipulation hypothesis. *Evolution*. **60-1**: 115-122.

- Weekes H.** (1933). On the distribution, habitat and reproductive habits of certain european and australian snakes and lizards, with particular regard to their adoption of viviparity. *Proceeding Linnean Society. New South Wales.* **58** : 270-274.
- Wingfield, J. C. et Vlek, C. M.** (1992). Seasonal changes of adrenocortical response to stress in birds of sonoran desert. *Journal of Experimental Zoology.* **264**: 419-428.
- Wourms, J. P. et Callard, I. P.** (1992). A retrospect to the symposium on evolution of viviparity in vertebrates. *American Zoology.* **32**: 251-255.
- Xavier, F. et Gavaud, J.** (1986). Oviparity-viviparity continuum in reptiles; physiological characteristics and relation with environment. In "Endocrine regulation as adaptive mechanisms to the environment", Assenmacher I. et Boissin J. (Eds), CNRS, Paris, PP 79-93.
- Yeong-choy, K.** (1993). Physiological effects of hypoxia on metabolism and growth of turtle embryos. *Respiration Physiology.* **92** : 127-138.
- Yue, F., Tang, X.L., Zhang, D.J., Yan, X.F., Xin, Y. et Chen, Q.** (2012). Body temperature and standard metabolic rate of the female viviparous lizard *Eremias multiocellata* during reproduction. *Canadian Journal of Zoology.* **90** : 79-84.