



# Étude expérimentale et intégrative des coûts et bénéfices de la viviparité chez le lézard vivipare

Josefa Bleu

## ► To cite this version:

Josefa Bleu. Étude expérimentale et intégrative des coûts et bénéfices de la viviparité chez le lézard vivipare. Populations and Evolution. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. French. <tel-00687672>

**HAL Id: tel-00687672**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00687672>**

Submitted on 13 Apr 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

**Écologie**

École doctorale Diversité du vivant

Présentée par

**Josefa Bleu**

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

---

**Étude expérimentale et intégrative des coûts et bénéfices de la viviparité  
chez le lézard vivipare**

---

soutenue le 2 novembre 2011

devant le jury composé de :

Donald Miles	Professor, Ohio University	Rapporteur
Tobias Uller	Lecturer, Oxford University	Rapporteur
François Sarrazin	Professeur, Université UPMC	Examinateur
Barbara Tschirren	Assistant Professor, University of Zurich	Examinatrice
Yann Voituren	Professeur, Université Lyon 1	Examinateur
Manuel Massot	Chargé de recherche, CNRS	Directeur de thèse
Sandrine Meylan	Maitre de conférences, IUFM	Directrice de thèse



**PhD THESIS**

Major

**Ecology**

École doctorale Diversité du vivant

Presented by

**Josefa Bleu**

To become a

DOCTOR from the UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

---

**Integrative and experimental study of the costs and benefits of viviparity  
in the common lizard**

---

Defended on the November 2, 2011

Jury:

Donald Miles	Professor, Ohio University	Reviewer
Tobias Uller	Lecturer, Oxford University	Reviewer
François Sarrazin	Professeur, Université UPMC	Examiner
Barbara Tschirren	Assistant Professor, University of Zurich	Examiner
Yann Voituron	Professeur, Université Lyon 1	Examiner
Manuel Massot	Chargé de recherche, CNRS	Advisor
Sandrine Meylan	Maitre de conférences, IUFM	Advisor



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Manuel Massot et Sandrine Meylan pour la qualité de leur encadrement scientifique et humain. Ils m'ont initiée à la capture des lézards sur le Mont Lozère et épaulée et conseillée tout au long de ma thèse, pendant les périodes de terrain, d'analyses de données et de rédaction. J'ai apprécié leur grande disponibilité ainsi que l'autonomie et la confiance qu'ils m'ont accordées.

Je suis très reconnaissante à Donald Miles, Tobias Uller, François Sarrazin, Barbara Tschirren et Yann Voituron d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci aux membres de mon comité de thèse pour les discussions et les conseils avisés : Benoit Heulin, Olivier Lourdais et Yann Voituron. Je remercie aussi Benoit pour la collaboration à Paimpont et pour m'avoir fait profiter de sa connaissance des lézards vivipares ovipares (!). J'en profite également pour remercier les gens de la station biologique de Paimpont pour leur accueil chaleureux pendant ces deux mois. Un grand merci à Olivier pour sa visite à Paimpont et le prêt de l'appareil d'échographie. Au cours de ma thèse, j'ai également eu le plaisir de collaborer avec Patrick Fitze, Jean-François Le Galliard, James Stewart et Claudy Haussy. Travailler avec Jean-François fut très instructif et je le remercie pour sa connaissance de la biblio, de R et des statistiques bien utile pour travailler sur des grands jeux de données. Les discussions avec James ont été essentielles pour le développement de la technique d'incubation des œufs. Merci à Claudy pour son investissement lors de l'adaptation de différents dosages au lézard vivipare et aussi pour son aide à Paimpont. J'espère que la mise au point des anticorps spécifiques aboutira prochainement ! Je remercie également Pierre Fédérici pour les discussions sur la chirurgie et l'incubation des œufs.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans l'implication de nombreux stagiaires pendant le terrain à Villefort. C'est avec grand plaisir que j'ai travaillé avec Carole, Lydie, Adélaïde, Mélodie, Lucille et Nastasia. Leur aide et leur motivation m'ont été fort précieuses. De plus, je n'oublierai pas les baignades dans les eaux fraîches du Mont Lozère ! J'ai aussi partagé de très bons moments avec les autres personnes présentes sur le terrain : Manuel Massot, Sandrine Meylan, Jean Clobert, Virginie Stevens, Murielle Richard, Virginie Lepetz, qui m'a

montré les secrets de Villefort au début de ma thèse, et Sylvain Moulherat, qui a maintenant pris la relève.

Je remercie aussi les « stagiaires de Paimpont » : Marion et Louis. J'ai apprécié leur sérieux et leur implication dans ce projet, ainsi que les échanges culinaires.

J'ai également passé de très bons moments au labo à Paris. Je remercie tous les membres de l'UMR pour les discussions diverses et variées et les conseils en tout genre, et en particulier : Adrien, Claudie, Clotilde, David, Julien, Nathalie, Nicolas, Paulina et Thibaud. Merci à Thierry pour m'avoir fait confiance pour mes premières vacances. Les autres étudiants sont aussi devenus des amis au fil des pots de labo : Lisa, Marianne, Robin, Simon (le parasite :) et Blandine, et aussi plus récemment : Mélissa, Claudia, Julia et Anaïs. En plus des bons moments partagés autour d'une bière, je remercie Marianne et Robin pour la redécouverte de l'escalade à Jussieu et les sorties blocs à Fontainebleau. J'espère profiter des falaises près de Montpellier bientôt ! Merci à Lisa pour avoir fait sa thèse en même temps que moi et pour les discussions dans le bureau et pendant les pauses goûter.

Je n'oublie pas toutes les personnes qui me font sortir du monde de la recherche (et heureusement !) et en particulier la bande des Crochux toujours présente pour un barbecue ou des vacances au ski : Hugo, Yawo, Geoffrey, Stéphane, Deng, mon cher camarade, Jan le chef cuistot (et surtout des cocktails !) et Théo, à qui je souhaite beaucoup de succès. J'ai évidemment une pensée spéciale pour Peter. Merci à Sépho, Aurore et Zita, pour votre amitié qui dure depuis de nombreuses années.

Je termine ces remerciements par les personnes qui me sont les plus chères : mes parents, Gabi et Géraldine, Brigitte et Jean-Paul, et Arthur.

## Résumé

La viviparité, qui consiste à mettre au monde directement des jeunes vivants, a évolué de nombreuses fois à partir de l'oviparité, qui consiste à pondre des œufs, en particulier chez les lézards et les serpents (les squamates). Ce groupe est celui où l'on observe le plus grand nombre d'évolutions indépendantes de la viviparité, ainsi que des évolutions récentes et à des niveaux taxonomiques faibles. Le lézard vivipare est une des rares espèces au sein de laquelle l'oviparité et la viviparité coexistent. J'ai donc utilisé cette espèce pour mon étude sur les coûts et les bénéfices de la viviparité. Je me suis d'abord intéressée aux ajustements de l'investissement dans la reproduction ainsi qu'aux coûts de la gestation. J'ai observé une absence d'ajustement post-ovulatoire de la taille de portée, de la masse de portée et de la masse du jeune. Cependant, j'ai montré que les femelles ajustent ces paramètres en fonction de leur environnement pendant la vitellogenèse, ainsi qu'en fonction de leur corpulence et de leur date de mise bas de l'année passée. J'ai ensuite étudié les coûts de la gestation de manière expérimentale, en contrôlant les accouplements, en manipulant la taille de portée, et en comparant des femelles ovipares à des femelles vivipares. Ces études ont mis en évidence, selon le contexte, des effets de la gestation sur le système immunitaire, sur le comportement de thermorégulation, sur l'endurance, et sur la perte de poids des femelles ; mais pas d'effet sur leur survie après la mise bas. L'étude comparative a montré que les coûts de la reproduction sont plus importants pour les femelles ovipares que les vivipares avant la gestation. Par ailleurs, la gestation est une période non seulement associée à des coûts mais aussi à des effets maternels. J'ai montré que la croissance des jeunes après la naissance dépend de la taille de portée pendant la gestation. Cependant, comme c'est souvent le cas, le mécanisme de cet effet maternel n'est pas connu. Afin de mettre en évidence les facteurs à l'origine des effets maternels, j'ai développé une approche expérimentale qui repose sur l'incubation *in vitro* d'embryons de lézards vivipares. Les résultats préliminaires sont prometteurs étant donné que ce processus permet d'obtenir des jeunes vivants. Finalement, j'ai montré l'existence d'effets de l'âge grand-maternel chez les lézards vivipares. Il s'agit de la première mise en évidence d'effets de l'âge grand-maternel en populations naturelles.

**Mots-clés** : mode de reproduction, coûts de la reproduction, gestation, effets maternels, effets grand-maternels, âge, incubation *in vitro*, ingénierie phénotypique, compromis évolutif, *Zootoca vivipara*



## Abstract

Viviparity (*i.e.* live-bearing) has evolved many times from oviparity (*i.e.* egg-laying), especially in squamates (*i.e.* lizards and snakes). This group is the one that has undergone the highest number of independent evolution of viviparity. Moreover, squamates have evolved viviparity in geologically-recent times and at low taxonomic levels. The common lizard is one of the rare species that exhibits both viviparity and oviparity. I thus used this species for my study on the costs and benefits of viviparity. I first studied adjustments of reproductive investment and gestation costs. I observed the absence of post-ovulatory adjustments of litter size, litter mass and offspring mass. However, I observed that females can adjust these parameters in response to the environmental conditions during vitellogenesis, to their body condition and to their parturition date of the previous year. Then, in order to study gestation costs, I used experimental approaches based on a manipulation of mating opportunity, on two manipulations of litter size, and on a comparison between oviparous and viviparous females. These studies highlighted context-dependent effects of gestation on the immune system, on the thermoregulatory behavior, on the endurance capacity and on the loss of mass of females; however, no effect on survival after parturition was observed. The comparative study showed that reproductive costs were higher for oviparous females than viviparous females before gestation. Furthermore, gestation is a period associated not only with costs but also with maternal effects. I have shown that offspring growth after birth depends on litter size during gestation. However, as often, the underlying mechanism of this maternal effect is not known. To investigate the underlying factors of maternal effects, I have developed an experimental approach based on the *in vitro* incubation of viviparous lizard embryos. Preliminary results are promising as I have managed to obtain live juveniles by this process. Finally, I have shown effects of grand-maternal age in viviparous lizards. This study gives the first evidence of grand-maternal age effects in a wild population.

**Key-words:** reproductive mode, costs of reproduction, gestation, maternal effects, grandmaternal effects, age, *in vitro* incubation, phenotypic engineering, trade-off, *Zootoca vivipara*

# Table des matières

Chapitre 1. Introduction générale.....	11
1.1. Évolution de la viviparité .....	11
1.2. Contexte de l'étude en écologie évolutive .....	15
1.3. Approches utilisées et questions abordées .....	19
Chapitre 2. Ajustement de la reproduction .....	23
2.1. Déterminants de l'investissement reproducteur .....	23
2.2. Étude menée chez le lézard vivipare .....	25
2.3. Synthèse .....	29
Chapitre 3. Coûts de la gestation.....	31
3.1. Coûts de la gestation chez les squamates .....	31
3.2. Étude expérimentale et comparative chez le lézard vivipare .....	34
3.3. Synthèse .....	43
Chapitre 4. Effets maternels.....	45
4.1. Effets maternels et viviparité.....	45
4.2. Tests expérimentaux sur les effets maternels chez le lézard vivipare.....	46
4.3. Effets de l'âge grand-maternel .....	51
4.4. Synthèse .....	56
Chapitre 5. Conclusions .....	59
5.1. Chez le lézard vivipare et les squamates .....	59
5.2. Perspectives .....	60
Bibliographie.....	63
Annexe 1 : L'accouplement n'influence pas l'investissement dans la reproduction, chez un lézard vivipare.....	77
Annexe 2 : Les précipitations actuelles et la corpulence passée affectent l'investissement dans la reproduction chez un lézard vivipare .....	85
Annexe 3 : Une réduction expérimentale de la taille de portée révèle des coûts de la gestation et des effets décalés sur les descendants chez un lézard vivipare.....	109
Annexe 4 : Méthodes et résultats d'une diminution expérimentale de la taille de portée pendant la gestation à l'aide d'une manipulation hormonale.....	123
Annexe 5 : Coûts du début de la reproduction chez des lézards ovipares et vivipares consécifs : une étude expérimentale.....	133
Annexe 6 : Incubations <i>in vitro</i> d'embryons vivipares de lézards .....	157

Thèse préparée au  
**Laboratoire Écologie et Évolution, UMR 7625**  
Université Pierre et Marie Curie  
7 Quai Saint Bernard  
Bâtiment A 7ème étage  
75005 Paris, France

# Chapitre 1. Introduction générale

## 1.1. Évolution de la viviparité

### a. Définitions

Dans le règne animal, les stratégies de reproduction prédominantes sont l'oviparité et la viviparité. Chez les animaux ovipares, le développement embryonnaire a lieu dans l'œuf pondu à l'extérieur de l'organisme maternel, alors que chez les animaux vivipares, les femelles portent leurs œufs jusqu'au terme du développement et donnent naissance à des jeunes vivants (Blackburn 1994). Cependant, l'existence de différentes sources de nutriments pour assurer le développement des jeunes avant la naissance a compliqué la distinction entre les modes de reproduction. On peut distinguer les espèces lécithotrophes, où les nutriments proviennent du vitellus, et les espèces matrotrophes, où les nutriments proviennent directement de la mère (souvent via un placenta). Lécithotrophie et matrotrophie sont des extrêmes d'un continuum, à part pour les mammifères euthériens, et donc les espèces sont classifiées selon la source prédominante des nutriments (Stewart 1992; Blackburn 1999). Toutes les combinaisons entre mode de développement embryonnaire et origine des nutriments existent et les espèces vivipares ne sont pas toujours matrotrophiques (**Encadré 1**).

**Encadré 1.** Les stratégies de reproduction dépendent du mode de développement et du mode d'apport en nutriments aux jeunes. Ce tableau montre leur répartition chez les vertébrés (adaptation à partir de Blackburn 1999). En particulier le terme « ovovivipare » n'est pas utile pour les décrire (Blackburn 1994).

	<b>oviparité</b>	<b>viviparité</b>
<b>lécithotrophie</b>	Tous les crocodiliens, chéloniens (tortues) et oiseaux ; de nombreuses espèces chez les amphibiens, squamates, poissons osseux et cartilagineux	La plupart des espèces vivipares chez les amphibiens, squamates, poissons osseux et cartilagineux
<b>matrotrophie</b>	Tous les mammifères monotrèmes	Tous les mammifères euthériens et quelques espèces chez les amphibiens, squamates, poissons osseux et cartilagineux

La viviparité est le mode de reproduction quasi-exclusif des mammifères (seules les quelques espèces de mammifères monotrèmes, comme l'ornithorynque, sont ovipares) mais d'autres organismes sont également concernés (Blackburn 1999) : il existe des espèces vivipares parmi les arthropodes, les mollusques, les échinodermes et les tuniciers (voir les références dans Lombardi 1996), chez les vertébrés, quelques espèces d'amphibiens (Wake 1993) et de poissons osseux (Dulvy & Reynolds 1997) sont vivipares (2-3%), alors que c'est le cas chez la majorité (environ 60%) des poissons cartilagineux (requins et raies) (Goodwin et al. 2002) et beaucoup (environ 20%) de squamates (lézards et serpents) (Blackburn 2006).

Le modèle squamate est utilisé depuis de nombreuses années pour l'étude de l'évolution de la viviparité. À part des avantages pratiques, tels qu'une facilité de capture et de mise en élevage, ce modèle est intéressant pour plusieurs raisons (Blackburn 2006) : (i) les origines indépendantes de la viviparité sont extrêmement nombreuses (> 100), ce qui représentent 76% des origines de la viviparité chez les vertébrés, (ii) avec 20% d'espèces vivipares, ce groupe est le deuxième en nombre d'espèces, (iii) la viviparité a souvent évolué récemment (Pléistocène : 0,1-2,5 Ma), (iv) la viviparité est apparue à des niveaux taxonomiques faibles (au niveau du genre ou même de l'espèce) et il existe au moins trois espèces avec une bimodalité reproductrice : *Lerista Bougainvillii* (Qualls & Shine 1998a) et *Saiphos equalis* (Smith & Shine 1997) en Australie et *Zootoca vivipara* (Surget-Groba et al. 2006) en Europe (voir aussi Tinkle & Gibbons 1977 pour d'autres exemples possibles). L'utilisation des squamates dans de nombreuses études a abouti à un cadre conceptuel solide sur l'évolution de la viviparité chez les squamates.

#### b. Théories sur l'évolution de la viviparité chez les squamates

La viviparité est une stratégie de reproduction à laquelle est associée différents avantages et inconvénients (**Encadré 2**). Néanmoins, le climat et les effets maternels sont reconnus comme étant les forces évolutives majeures de la viviparité. Ces deux hypothèses (et les autres présentées dans l'encadré) ne sont pas incompatibles entre elles, et ce qui est déterminant pour comprendre l'évolution de la viviparité est leur importance relative, qui peut d'ailleurs varier selon la biologie des espèces et les conditions environnementales (latitude, taux de prédation, etc...). Il faut rappeler que les lézards, comme tous les squamates, sont des animaux ectothermes. Ils ne régulent pas eux-mêmes leur température interne qui dépend de la température du milieu (Huey 1982). Leur comportement de thermorégulation actif leur permet néanmoins de maintenir une température donnée pour optimiser les différents

processus physiologiques, par exemple digestion ou vitesse de course (Van Damme et al. 1991).

**Encadré 2.** Avantages et inconvénients de la viviparité chez les squamates

Avantages	Principales références
<b>Hypothèse des climats froids :</b> accélération du développement embryonnaire grâce à la thermorégulation maternelle	(Tinkle & Gibbons 1977) ; (Packard et al. 1977) et (Shine 1983)
<b>Hypothèse de manipulation maternelle :</b> optimisation du développement des jeunes grâce à la thermorégulation maternelle et à l'existence d'autres effets maternels pendant la gestation	(Shine 1995) et (Webb et al. 2006) <b>voir chapitres 2 et 4</b>
Étalement de l'investissement maternel dans la reproduction	(Tinkle & Gibbons 1977) <b>voir chapitre 2</b>
Protection des œufs ( <i>e.g.</i> prédation), diminution de l'investissement dans la coquille et absence de recherche de site de nidification	(Tinkle & Gibbons 1977) ; (Packard et al. 1977) et (Andrews 2000)
Choix d'un environnement optimal facilité par une plus grande prédictibilité de l'environnement de naissance des jeunes	(Tinkle & Gibbons 1977) mais voir aussi (Shine 2002)
Inconvénients	
<b>Coûts de la reproduction</b> plus importants (gestation, masse des œufs plus importante en fin de développement)	(Tinkle & Gibbons 1977) ; (Qualls & Shine 1995) <b>voir chapitre 3</b>
Possibilité réduite de produire plusieurs portées par saison	(Tinkle & Gibbons 1977)
Mortalité de la femelle et des œufs liées	(Tinkle & Gibbons 1977)
Nécessité de développer des structures pour les échanges gazeux et aqueux pendant la gestation	(Guillette 1993) ; (Andrews 2002)
Possibilité accrue d'influence hormonale entre embryons pouvant aboutir à des contraintes sur l'évolution du sex-ratio	(Uller 2003)

L'**hypothèse des climats froids** soutient que la viviparité a évolué suite aux avantages conférés par un temps de développement embryonnaire réduit (Shine 1983) : les jeunes incubés dans l'organisme maternel à des températures élevées se développent plus rapidement que les jeunes incubés à l'extérieur. Un temps de développement plus court limite le risque d'un échec de développement du à des conditions climatiques délétères, et aussi procure une saison d'activité plus longue, ce qui confère des avantages sur la croissance et la survie des jeunes après la naissance. Cette hypothèse est soutenue par de nombreux résultats expérimentaux (*e.g.* Braña & Ji 2007; Radder et al. 2008; Wapstra et al. 2010; Rodríguez-Díaz & Braña 2011) et l'observation que les espèces vivipares sont souvent dans des endroits plus froids, à des latitudes ou à des altitudes plus élevées (Shine 1983; mais voir aussi Tinkle & Gibbons 1977; Guillette 1993). Néanmoins, la distribution actuelle des espèces vivipares peut refléter la nécessité de la viviparité pour coloniser des habitats plus rudes et non pas l'importance de la sélection liée au climat pour son apparition (Tinkle & Gibbons 1977). De plus, l'hypothèse des climats froids ne s'applique pas aux espèces vivipares dans les tropiques.

L'**hypothèse de manipulation maternelle** soutient que la thermorégulation active des femelles pendant la gestation peut conférer un avantage lors du développement embryonnaire non pas parce que le développement est accéléré mais parce qu'il est amélioré. En fournissant une température plus optimale aux jeunes, les femelles produisent des jeunes avec un meilleur phénotype (Shine 1995). Cette hypothèse est également supportée par des résultats expérimentaux (*e.g.* Qualls & Andrews 1999; Ji et al. 2007; Li et al. 2008), et d'ailleurs n'est pas opposée à l'hypothèse des climats froids : les femelles peuvent sélectionner des températures qui à la fois accélèrent et améliorent le développement des jeunes (*e.g.* Rodríguez-Díaz et al. 2010). Cette hypothèse est plus générale, et souligne aussi un possible effet de la variance de la température d'incubation plutôt que de la moyenne (Shine 2004; Webb et al. 2006). D'autre part, la manipulation maternelle n'est pas limitée aux effets liés au climat. Il existe d'autres effets maternels pendant la gestation qui augmentent la valeur sélective des jeunes produits, *e.g.* préadaptation à la présence d'un prédateur (Downes & Shine 1999). L'existence d'effets maternels plus importants pourrait ainsi être un avantage majeur de la viviparité.

Lors de cette thèse, je me suis basée sur ce cadre conceptuel pour étudier plus précisément certains des inconvénients et avantages principaux liés à la viviparité au sein d'une espèce de lézard. J'ai utilisé le lézard vivipare, *Zootoca vivipara*, pour ce travail car la

viviparité a évolué récemment dans cette espèce et c'est une des rares espèces au sein de laquelle on peut trouver à la fois des femelles ovipares et vivipares. Une grande partie de mon travail est basée sur l'étude des coûts de la reproduction et des effets maternels. Ces deux aspects reposent sur des concepts clés qui sont largement utilisés en écologie évolutive et que je présente dans la section suivante.

## **1.2. Contexte de l'étude en écologie évolutive**

### a. Les coûts de la reproduction

La valeur sélective d'un individu peut être approximée par son succès reproducteur total (sur l'ensemble de sa vie) et peut être maximisée par différentes stratégies. Effectivement, il existe des compromis entre les différents traits d'histoire de vie, par exemple, un individu ne peut pas investir indépendamment et sans limite dans sa croissance et sa production de descendants. Ces compromis sont liés au fait qu'il existe des corrélations génétiques et/ou physiologiques entre l'expression de plusieurs traits (Stearns 1992; Roff 2002). L'étude de ces compromis évolutifs a mis en évidence que l'investissement dans la reproduction peut résulter en une diminution de la survie ou de la fécondité future des individus reproducteurs (diminution de leur valeur reproductrice résiduelle (Fisher 1930; Williams 1966)). L'existence de tels coûts relève de **coûts de reproduction intra-générationnels**. Ces coûts de reproduction intra-générationnels ont souvent été mis en évidence grâce à des manipulations expérimentales de l'effort reproducteur, et en particulier avec des manipulations de la taille de portée/ponte (souvent augmentation mais parfois diminution ou élimination de la reproduction) : chez les oiseaux (*e.g.* Dijkstra et al. 1990; Golet et al. 1998; Visser & Lessells 2001; Hanssen et al. 2005), mammifères (*e.g.* Oksanen et al. 2002; Koivula et al. 2003; Bårdsen et al. 2009), insectes (*e.g.* Maynard Smith 1958; Buzatto et al. 2007) et squamates (*e.g.* Landwer 1994; Miles et al. 2000; Cox & Calsbeek 2010). Les approches non-expérimentales reposent sur des corrélations entre effort reproducteur et survie ou fécondité future, par exemple à l'aide de suivis individuels en conditions naturelles (*e.g.* Clutton-Brock et al. 1983; Zink 2003; Descamps et al. 2009a; Massot et al. 2011).

L'intérêt porté à l'existence des coûts de reproduction s'est accompagné de l'étude des **mécanismes sous-jacents** et des bases physiologiques de ces coûts (voir la revue de Zera & Harshman 2001). Cependant notre connaissance est encore très incomplète, même sur des espèces de laboratoire (revue chez la drosophile Flatt 2011) Les coûts liés à la reproduction



sont certainement dus à plusieurs mécanismes. Tout d'abord la perte de poids et des réserves lipidiques suite à la reproduction, peut expliquer la réduction de la survie (Ellers 1995; Golet et al. 1998) ou de la fécondité à la saison suivante, en particulier chez les espèces qui utilisent de l'énergie capitalisée sur de longues périodes (Doughty & Shine 1997; Festa-Bianchet et al. 1998). D'autres études suggèrent aussi que la diminution de la réponse immunitaire et de la résistance aux infections (Gustafsson et al. 1994; Hanssen et al. 2005; French & Moore 2008; Cox et al. 2010) ou l'augmentation du stress oxydatif (Alonso-Alvarez et al. 2004; Wiersma et al. 2004; Garratt et al. 2011) pourraient expliquer la baisse de survie. Plus spécifiquement, chez les oiseaux la diminution de la qualité de la mue (Nilsson & Svensson 1996), ou chez les lézards, la baisse des capacités locomotrices après la reproduction (Miles et al. 2000) peuvent aussi être des facteurs proximaux des coûts de la reproduction. Les exemples sont nombreux, mais il n'existe pas d'étude intégrative qui permettrait de comparer l'importance relative de ces différents facteurs entre eux. Il convient de noter que souvent le terme « coût » est appliqué lors de l'étude de ces facteurs proximaux. Cette appellation n'est correcte que si un lien sur la valeur sélective a été mis en évidence, par exemple la baisse de la réponse immunitaire est un coût de la reproduction si elle diminue la survie. Par extension, le terme est souvent appliqué même quand ce lien n'a pas été mis en évidence. Par la suite, on se permettra aussi de faire ce raccourci.

Il existe aussi des **coûts de reproduction inter-générationnels**, quand la valeur sélective des descendants est affectée, par exemple par une diminution de leur survie. Les coûts inter-générationnels sont classiquement expliqués par l'existence d'un compromis entre la qualité et le nombre de jeunes produits (*e.g.* Roff 2002). Notamment, la taille et la corpulence à la naissance peuvent être négativement corrélées à la taille de ponte (allocation de l'énergie pendant la vitellogenèse et/ou gestation) et cette taille peut déterminer le taux de survie ou la taille à maturité (Bernardo 1991; Sinervo et al. 1992; Holbrook & Schal 2004; Oksanen et al. 2007). Dans certains cas une croissance accélérée peut compenser la faible taille initiale mais peut aussi avoir des coûts à long terme et diminuer la longévité (Metcalf & Monaghan 2003). De plus, lorsque l'effort reproducteur est augmenté, les ressources peuvent simplement être limitées au début du développement car les parents n'ont pas la capacité de nourrir des portées trop grandes (Dijkstra et al. 1990; Burness et al. 2000; Oksanen et al. 2007), ou bien à cause de la compétition locale, par exemple chez les insectes où les larves se développent au sein d'un hôte de taille donné (Hardy et al. 1992; Fox et al.

1996). Ces coûts inter-générationnels sont dus à un investissement moindre par jeune, et sont donc des effets maternels.

#### b. Les effets maternels

Les effets maternels sont toutes les modifications du phénotype des jeunes causées par le phénotype de la mère ou par l'environnement qu'elle fréquente et qu'elle fournit à ses jeunes (Mousseau & Fox 1998). Ils peuvent avoir des conséquences durables sur la morphologie, la physiologie ou le comportement des jeunes, et donc influencer leur valeur sélective. Les exemples et les mécanismes sont nombreux et de ce fait l'étude des effets maternels, ou plus largement des effets parentaux, est une question centrale en écologie évolutive (Badyaev & Uller 2009; Mousseau et al. 2009). Un exemple classique d'effet maternel est l'investissement dans la qualité des œufs qui se reflète, par exemple, par la masse des œufs (*e.g.* Ardia et al. 2006) ou les taux hormonaux dans le vitellus (*e.g.* Groothuis et al. 2005; Gil et al. 2007). Mais, par exemple, la taille de ponte en soit peut aussi être un effet maternel (Brown & Shine 2009). L'existence des effets maternels est largement démontrée, cependant leurs conséquences évolutives sont plus complexes à déterminer.

Classiquement, les effets maternels ont été considérés comme adaptatifs et permettant une adaptation des jeunes à leur environnement futur (*e.g.* Mousseau & Fox 1998). Il est clair que ce n'est pas toujours le cas et, d'après une revue récente (Marshall & Uller 2007), les effets maternels peuvent être classés en quatre catégories :

- **Effets maternels de « pré-adaptations »** : les femelles modifient le phénotype de leurs descendants en fonction des conditions locales pour les pré-adapter aux conditions qu'ils sont susceptibles de rencontrer. La valeur sélective des descendants est augmentée. Par exemple, en présence d'herbivores, des plantes de ravenelle, *Raphanus raphanistrum*, produisent des plantes plus résistantes à ce même prédateur (Agrawal 2002) ; ou encore chez deux espèces de daphnies, *Daphnia pulicaria* et *Daphnia hyalina*, les jeunes produits par des femelles maintenues en conditions limitées en nourriture sont plus résistants à la famine (Gliwicz & Guisande 1992).
- **Effets maternels « égoïstes »** : certains effets maternels peuvent entraîner une diminution de la valeur sélective des jeunes, mais être adaptatifs pour la femelle. Par exemple, il peut y avoir allocation différentielle en fonction de la qualité des mâles (Sheldon 2000), ce qui signifie que la femelle investit moins dans ses œufs quand elle s'accouple avec un mâle peu attrayant (*e.g.* Gil et al. 2004). Aussi chez le mérion

superbe, *Malurus cyaneus*, les femelles pondent des œufs plus petits en la présence d'individus coopérateurs qui vont aider à nourrir les jeunes (Russell et al. 2007). La baisse de valeur sélective des jeunes est compensée par l'augmentation de la valeur reproductive résiduelle de la femelle.

- **Effets maternels de « bet-hedging »** : les conditions locales peuvent être très fluctuantes et ne sont pas toujours des bons indicateurs des conditions dans lesquelles vont se développer les jeunes produits. Dans ce cas, la valeur sélective moyenne des femelles est augmentée en réduisant sa variance. La production de descendants avec différents phénotypes augmente les chances d'avoir quelques descendants bien adaptés et donc réduit la variance de la valeur sélective de la femelle. Par exemple, lorsque la prédictibilité de l'environnement diminue, les femelles augmentent la variance dans la taille des jeunes produits chez un acarien, *Sancassania berlesei*, et un poisson de récifs coralliens, *Pomacentrus amboinensis* (Crean & Marshall 2009).
- **Effets maternels « passifs »** : les effets sont négatifs ou neutres pour la femelle et ses descendants. Effectivement, il peut exister des contraintes physiologiques qui limitent la séparation entre ce qui est présent dans la circulation sanguine maternelle et déposé dans le vitellus, par exemple pour certaines toxines, polluants ou même certaines hormones (e.g. Groothuis & Schwabl 2008). Aussi, l'exploitation des communications entre mère et embryons par des pathogènes résultent en la transmission de maladies (Bernardo 1996). Par ailleurs, un stress peut être associé à des réponses contraintes. Par exemple, chez le bryzoaire marin, *Bugula neritina*, un événement de prédation résulte en la production de descendants plus variables sans que cela puisse être interprété comme une stratégie de bet-hedging mais plutôt comme une contrainte physiologique (Crean & Marshall 2009).

Ce dernier exemple montre la complexité d'une telle classification car elle repose à la fois sur les mécanismes sous-jacents et sur la valeur adaptative des effets maternels. Il existe certains effets maternels passifs qui sont néanmoins adaptatifs. Par exemple, la transmission d'anticorps dans le jaune d'œuf peut-être passive, reflétant les anticorps présents dans le sang maternel et néanmoins être adaptative pour protéger les jeunes produits contre les maladies qu'ils sont susceptibles de rencontrer (Hasselquist & Nilsson 2009). Il semble donc important d'augmenter notre connaissance aussi bien de la valeur adaptative que des mécanismes des effets maternels.

L'étude des effets maternels est aussi caractérisée par la prise en compte de différentes échelles de temps. Le plus souvent, les effets maternels sont étudiés pendant les différentes

phases de l'événement de reproduction lui-même (vitellogenèse, gestation, soins parentaux, voir les exemples ci-dessus). Cependant la condition passée de la mère peut aussi influencer sa reproduction et donner lieu à des effets maternels. Par exemple, l'expérience de la femelle (*i.e.* le nombre d'événements reproducteurs passés) peut augmenter la qualité des descendants produits (*e.g.* Sydeman et al. 1991; Forslund & Pärt 1995). De plus, les conditions de développement maternelle (*in utero* ou après la naissance) peuvent aussi être importantes. Par exemple, chez le lézard vivipare, la taille de portée et la taille des jeunes produits par les femelles dépend en partie de leurs propres conditions de développement *in utero* (niveau des précipitations ou sex-ratio de la portée) (Uller et al. 2004; Marquis et al. 2008). Quand les conditions de développement maternelles sont elles-mêmes dues à des effets maternels, on parle d'effets grand-maternels.

### **1.3. Approches utilisées et questions abordées**

#### a. Espèce modèle : le lézard vivipare

Le lézard vivipare, *Zootoca vivipara* (ou anciennement *Lacerta vivipara* ou *Lacerta (Zootoca) vivipara*) est un petit lacertidae (adulte : 45 à 75 mm du museau au cloaque) qui a une très grande aire de répartition, allant du nord de l'Espagne au cercle polaire arctique et des côtes atlantiques de l'Europe Occidentale aux côtes pacifiques de la Sibérie (Surget-Groba et al. 2006). Il a une prédilection pour les lieux humides : prairies, landes et tourbières. Le lézard vivipare, une espèce assez mal nommée, est vivipare sur la majeure partie de son aire de répartition, mais ovipare en marge sud de son aire de répartition. Plus précisément, il existe deux groupes distincts de populations ovipares, l'un au nord de l'Espagne et sud-ouest de la France, l'autre au nord de l'Italie, sud de l'Autriche, en Slovénie et Croatie (Surget-Groba et al. 2006). Les populations ovipares et vivipares sont généralement allopatriques, mais une zone de contact naturelle a été mise en évidence récemment au sud de l'Autriche (Lindtke et al. 2010). Les individus ovipares et vivipares sont capables de s'hybrider expérimentalement (Arrayago et al. 1996) et naturellement (Lindtke et al. 2010).

Du fait de sa bimodalité reproductrice intraspécifique, le lézard vivipare est un modèle d'étude particulièrement adapté à l'étude de l'évolution de la viviparité. Il présente aussi des caractéristiques qui facilitent l'expérimentation, comme une facilité de capture, de mise en élevage et des fortes densités locales à certains endroits. De plus, son cycle de vie est bien connu. Le cycle du lézard vivipare est caractérisé par l'alternance d'une phase d'activité

durant laquelle a lieu la reproduction et d'une phase d'hibernation indispensable à la reprise de l'activité sexuelle au printemps suivant (Gavaud 1983). En Lozère, où j'ai réalisé les études sur la forme vivipare, les lézards hibernent dès la fin du mois de septembre pour environ 7 mois. Les mâles sont les premiers à sortir d'hibernation début avril, suivis des femelles adultes et des subadultes fin avril - début mai. Les accouplements ont lieu en mai pendant la vitellogénèse des femelles. L'ovulation s'effectue généralement fin mai. La durée de la gestation est d'environ 2 mois mais dépend beaucoup des conditions climatiques (pouvant durer jusqu'à 3 mois certaines années). Les femelles mettent bas de 1 à 12 jeunes complètement formés, qui sortent de leur fine enveloppe coquillière quelques minutes ou quelques heures après la mise bas. Les nouveau-nés mesurent 20-25 mm. Pour les femelles ovipares provenant des Pyrénées, la ponte a lieu après une période de rétention des œufs d'environ 3 semaines (Heulin et al. 1991). Les œufs sont pondus après un tiers du développement embryonnaire (aux stades 31-33 de la classification de Dufaure & Hubert (1961)), et ils ont une coquille souple, épaisse et calcifiée. L'éclosion a lieu après environ 1 mois d'incubation à 22°C. Plusieurs (2 ou 3) pontes sont possibles par an, selon les populations et les conditions climatiques (Heulin et al. 1991). Chez les formes hybrides, les œufs sont pondus à un stade intermédiaire (stades 35-36) et nécessitent seulement 2 semaines d'incubation. Leur coquille aussi est intermédiaire n'étant que partiellement calcifiée (Arrayago et al. 1996).

Finalement, une autre caractéristique intéressante du lézard vivipare est que l'existence d'effets maternels au cours de la gestation a été démontrée de nombreuses fois sur de nombreux traits, tels que la croissance, la survie ou la dispersion (Sorci et al. 1994; Massot & Clobert 1995, 2000; Meylan & Clobert 2005; Marquis et al. 2008). Le lézard vivipare est donc un modèle intéressant pour étudier la viviparité.

#### b. Approches expérimentales et corrélatives

L'expérimentation est puissante pour mettre en évidence des relations de causes à effets. En effet, l'existence de compromis, pourtant prédite par la théorie des traits d'histoire de vie, n'est pas toujours observée. Il est même possible de mesurer une corrélation positive entre deux variables, pourtant corrélées négativement, si ces deux variables sont positivement corrélées à une troisième variable non prise en compte. Par exemple, une variation trop importante dans l'acquisition des ressources peut masquer une variation dans l'allocation de ces ressources (van Noordwijk & de Jong 1986) : si l'investissement dans la reproduction est

plus important chez les femelles qui ont accumulé plus de ressources, on ne trouvera pas une relation négative entre taille de ponte et poids après la mise bas, sauf éventuellement en prenant en compte les réserves pré-reproductrices (Doughty & Shine 1997). Cependant, il est impossible d'avoir accès à toutes les variables dans les études menées en milieu naturel, et c'est très contraignant dans les études en laboratoire. Pour résoudre ce problème, depuis plusieurs décennies maintenant, les chercheurs ont utilisé des techniques d'**ingénierie phénotypique** (Sinervo & Huey 1990; Bernardo 1991; Sinervo et al. 1992). L'ingénierie phénotypique consiste à modifier expérimentalement le trait d'intérêt. Dans ce cas, il n'y a pas d'autres variables confondantes car elles sont aléatoirement distribuées dans les différents groupes expérimentaux. Un exemple historique chez les reptiles est l'utilisation de l'ingénierie phénotypique pour étudier les conséquences de la taille corporelle sur la valeur sélective et les performances. Des réductions et augmentations expérimentales de la quantité de vitellus dans les œufs ont permis la création de jeunes miniatures et géants (Sinervo & Huey 1990; Sinervo et al. 1992), et donc d'étudier l'influence de la taille sur les capacités locomotrices et la survie. Les approches d'ingénierie phénotypique peuvent en théorie être appliquées sur n'importe quel trait mais peuvent être limitées par des problèmes techniques. Je m'en suis inspirée pour plusieurs expériences.

Néanmoins, les approches expérimentales ne sont pas toujours adaptées ou réalisables. J'ai donc aussi utilisé des approches corrélatives basées sur des données d'un **suivi individuel à long terme**. Les suivis individuels à long terme sont particulièrement importants pour étudier les effets de l'âge en population naturelle ou pour mener des études longitudinales (mesures individuelles répétées) sur les relations entre différentes phases ou stades de vie d'un individu (Clutton-Brock & Sheldon 2010). La population étudiée du Mont Lozère (Cévennes) a été suivie tous les ans depuis plus de 20 ans. Les individus ont été identifiés individuellement et plusieurs paramètres (taille, poids) ont été mesurés chaque année lors de différentes sessions de capture. De plus, des femelles adultes ont été capturées en fin de gestation et maintenues temporairement en élevage pour connaître leurs performances reproductrices. Cette base de données m'a permis de tester les corrélations entre deux événements de reproduction et l'importance des facteurs climatiques sur la reproduction. De plus, j'ai aussi eu la possibilité d'étudier les effets grand-maternels de l'âge.

Finalement, comme dit précédemment, le lézard vivipare est une des rares espèces au sein de laquelle on peut trouver des femelles ovipares et des femelles vivipares. Cette caractéristique en fait une espèce idéale pour comparer les deux modes de reproduction directement en minimisant les autres facteurs confondants (*e.g.* différences phylogénétiques)

(Guillette 1993; Qualls & Shine 1998a). J'ai donc aussi effectué une **comparaison expérimentale** de femelles ovipares et vivipares conspécifiques au début de leur cycle reproducteur (période incluant la rétention des œufs jusqu'à la ponte des femelles ovipares).

Ma thèse est structurée autour de 5 expériences et 2 séries d'analyses de données. Au cours de la première expérience, je me suis intéressée aux ajustements de l'investissement reproducteur et aux coûts de la reproduction en l'absence d'accouplement avec des mâles (**annexe 1, chapitres 2 et 3**). J'ai aussi complété notre connaissance du timing de l'investissement et de l'ajustement reproducteur grâce à une analyse de données (**annexe 2, chapitre 2**). Puis, j'ai testé l'importance des coûts de la gestation et des effets maternels au cours de la gestation à l'aide de deux manipulations expérimentales de la taille de portée (**annexes 3 et 4, chapitres 3 et 4**). Ensuite, j'ai mené une comparaison expérimentale des coûts du début de la reproduction entre des femelles ovipares et vivipares (**annexe 5, chapitre 3**). La dernière approche expérimentale repose sur une méthode d'incubation *in vitro* des « œufs » de femelles vivipares pour étudier les effets maternels pendant la gestation (**annexe 6, chapitre 4**). Finalement, je me suis aussi intéressée à la persistance des effets maternels en étudiant les effets de l'âge grand-maternel (**chapitre 4**). Ce travail combine différentes approches et aussi différentes mesures. J'ai essayé d'avoir une approche **intégrative** en utilisant aussi bien des mesures comportementales, physiologiques ou démographiques en milieu naturel. J'ai décidé de présenter ce travail de manière transversale en abordant d'abord les possibilités d'ajustements de l'investissement dans la reproduction aux différentes échelles de temps testées (**chapitre 2**), puis les coûts de la gestation pour les femelles (**chapitre 3**) et finalement les effets maternels et grand-maternels mis en évidence, ainsi que la méthode développée pour les étudier (**chapitre 4**).

## Chapitre 2. Ajustement de la reproduction

J'ai d'abord étudié les possibilités d'ajustement de l'investissement reproducteur des femelles de lézards vivipares, car les coûts de reproduction dépendent en partie de la flexibilité de la reproduction et de l'échelle de temps à considérer.

### ***2.1. Déterminants de l'investissement reproducteur***

#### a. Patron temporel de l'investissement

Il existe une distinction fondamentale qui repose sur l'origine des nutriments investis dans la reproduction. On peut distinguer les espèces qui investissent dans la reproduction uniquement des ressources acquises pendant l'événement de reproduction lui-même (stratégie « income ») de celles qui utilisent des ressources emmagasinées précédemment et stockées (stratégie de capitalisation) (Stephens et al. 2009). Les squamates sont considérés comme utilisant majoritairement une stratégie de capitalisation, en particulier car l'ectothermie est associée à une diminution des coûts du stockage de réserves (Bonnet et al. 1998). Néanmoins, ces définitions représentent les extrêmes d'un continuum, et certaines espèces peuvent adopter une stratégie mixte au sein d'un événement de reproduction (*e.g.* Bonnet et al. 2001; Reading 2004), ou bien changer de stratégie entre les pontes au sein d'une même saison (*e.g.* Wessels et al. 2010). Il est important de savoir à quel moment les ressources sont acquises et à quel moment elles sont dépensées pour mettre en évidence les facteurs importants dans ces processus (Bonnet et al. 1999). Notamment, si la femelle investit ses réserves dans sa reproduction, l'importance de son investissement ne sera pas corrélée aux conditions rencontrées lors de l'épisode de reproduction lui-même. Dans ce cas là, il est important de mesurer les conditions environnementales et l'état de la femelle avant l'épisode reproducteur étudié (*e.g.* Festa-Bianchet 1998; Lourdais et al. 2002a).

Chez le lézard vivipare, la stratégie utilisée n'est pas clairement définie. Certaines caractéristiques laissent penser qu'une stratégie de capitalisation pourrait être favorisée : il est ectotherme (comme tous les squamates), les femelles stockent des ressources avant l'hibernation (Avery 1974; Bauwens & Verheyen 1985), la période d'activité à la sortie d'hibernation et avant l'ovulation est courte (Bauwens & Verheyen 1985). Cependant, d'autres éléments suggèrent une stratégie income : le lézard se nourrit pendant la



vitellogenèse (Avery 1975) et une manipulation de la nourriture pendant la période de constitution des réserves précédent l'hibernation n'a pas modifié les caractéristiques de reproduction (Mugabo et al. 2011). En plus de l'origine des nutriments (récemment acquis ou stockés), on peut étudier les ajustements post-ovulatoires chez les espèces vivipares.

#### b. Ajustements post-ovulatoires

Chez les espèces vivipares, des ajustements post-ovulatoires de l'investissement reproducteur sont théoriquement possibles et avantageux, permettant aux femelles de répartir leur effort reproducteur tout au long du développement des jeunes (Tinkle & Gibbons 1977). Effectivement, chez les espèces matrotrophes, la mère transmet des nutriments au fur et à mesure de la gestation sans avoir à investir tous les nutriments au moment de la vitellogenèse. Cette stratégie associée à une stratégie income se traduira par un ajustement de l'investissement dans la masse des jeunes en fonction des ressources disponibles (*e.g.* Shine & Downes 1999), mais pourrait être mal-adaptative quand les ressources sont très fluctuantes (Reznick et al. 1996; Pollux & Reznick 2011). Même chez les espèces lécithotrophes, il y a des transferts importants pendant la gestation, certains sont indispensables (eau, gaz), les autres peuvent être indispensables ou seulement facultatifs (nutriments organiques et inorganiques) (Stewart 1992). Par exemple, chez le lézard, *Niveoscincus metallicus*, de la famille des Scincidae, les femelles peuvent augmenter les lipides investis dans les embryons quand les conditions sont favorables (Swain & Jones 2000; Jones & Swain 2006). Le lézard vivipare est également lécithotrophe, par contre l'existence de transfert de nutriments organiques facultatifs n'est pas démontrée. Nous savons cependant qu'il existe des transferts de minéraux nécessaires : le calcium est en grande majorité transmis par la mère pendant la gestation (Stewart et al. 2009).

Les ajustements post-ovulatoires peuvent aussi concerner la taille de portée. Chez les mammifères, il est bien établi que les femelles peuvent résorber tout ou partie de leur portée au cours de la gestation, par exemple en réponse à un stress (*e.g.* Brambell 1948; Henderson 1954; Conaway et al. 1960; Gosling 1986; Westlin et al. 1995). Cependant, cette possibilité est encore discutée chez les autres groupes de vertébrés vivipares (Reznick et al. 1996; Blackburn et al. 1998, 2003; Blackburn 1998; Bonnet et al. 2008). Dans ces groupes, la taille de portée pourrait notamment être ajustée par des expulsions sélectives d'embryons (Blackburn 1998).

### c. Caractéristiques intrinsèques des femelles

L'investissement dans la reproduction dépend aussi de l'histoire de vie particulière de chaque femelle, et par exemple, peut dépendre des autres événements de reproduction. Effectivement, comme montré en introduction, un épisode de reproduction peut avoir des coûts et en particulier affecter la fécondité suivante. Chez les espèces qui utilisent leurs réserves énergétiques au cours de la reproduction, la durée disponible pour constituer ce stock de réserve est certainement importante. Les femelles qui mettent bas plus tôt dans la saison pourraient être capables de capitaliser plus de ressources et donc d'investir plus ou plus rapidement dans la reproduction suivante (Bonnet et al. 2001).

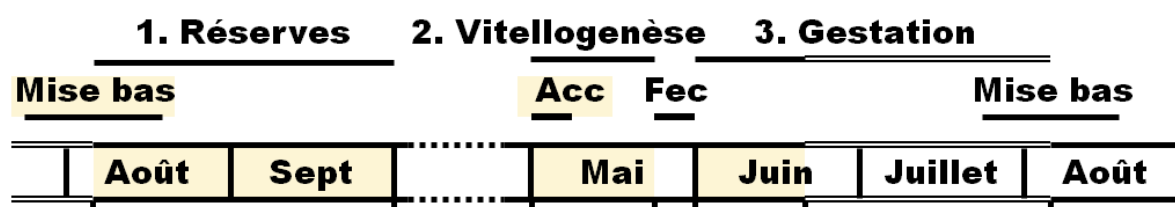
De plus, les femelles peuvent choisir plusieurs stratégies d'investissement par rapport à leurs partenaires. Une allocation différentielle en fonction de la qualité des mâles est effectivement fréquente chez les oiseaux (revue de Sheldon 2000) : les femelles qui s'accouplent avec des mâles moins attrayants investissent moins dans leurs œufs (masse ou composition de l'œuf). Dans une situation plus extrême où la femelle ne s'accouple pas, il a été montré chez certains squamates que la femelle n'initiait pas sa reproduction ou ne finissait pas le développement des follicules, comme chez le Python malais ovipare, *Python curtus* (DeNardo & Autumn 2001), chez le serpent brun arboricole ovipare, *Boiga irregularis* (Mathies et al. 2004), la couleuvre jarretière à flancs rouges vivipare, *Thamnophis sirtalis parietalis* (Mendonça & Crews 1990), ou chez plusieurs espèces ovipares de lézard à queue en fouet du genre *Cnemidophorus* (Crews et al. 1986). Chez ces espèces, l'investissement dans la reproduction nécessite la présence d'un mâle, autrement dit l'ovulation n'est pas spontanée. Cette stratégie pourrait être particulièrement adaptative chez les espèces lécithotrophes, qui produisent des œufs avec beaucoup d'énergie. De plus, chez les espèces vivipares qui portent leurs œufs pendant toute la durée de la gestation, il existe peut-être un coût supplémentaire qui renforcerait l'avantage d'une stratégie d'ovulation dépendante de l'accouplement. Cependant, les données chez les squamates sont encore trop rares pour valider cette hypothèse.

## **2.2. Étude menée chez le lézard vivipare**

Pour mieux comprendre les déterminants de l'investissement reproducteur chez le lézard vivipare, j'ai mené deux études. La première étude est basée sur une expérience et a pour but de tester une situation extrême qui est l'investissement dans la reproduction en

l'absence d'accouplement. La deuxième étude est corrélative et s'est concentrée sur l'influence de la condition passée de la femelle, ainsi que des conditions climatiques actuelles et passées sur l'investissement reproducteur. Pour mieux comprendre ces manipulations, voir le schéma du cycle reproducteur (**figure 1**).

**Figure 1.** Cycle de vie et facteurs testés chez le lézard vivipare. Les femelles du lézard vivipare constituent des réserves pendant l'été (1) puis hibernent. Leur reproduction commence à l'émergence (début mai) par des accouplements et la vitellogenèse (2). Le sperme est stocké jusqu'à l'ovulation et la fécondation (fin mai). La période de gestation dure environ 2 mois (3). Pour le suivi à long terme les femelles ont été capturées mi-juin et gardées en laboratoire jusqu'à la mise bas (lignes vides) puis relâchées. L'importance de certaines périodes a été testée (surlignage). Les abréviations utilisées sont « Acc » pour accouplements et « Fec » pour fécondation.



a. Effet de l'accouplement (**article en annexe 1**)

Cette expérience, réalisée avant le début de ma thèse, m'a permis de tester l'importance de l'accouplement sur l'investissement dans la reproduction. En conditions naturelles, les femelles s'accouplent dès leur sortie d'hibernation. Pour obtenir des femelles expérimentalement non accouplées, les mâles et les femelles ont donc été séparés avant l'hibernation dans des enclos en conditions semi-naturelles (**voir annexe 1**). À la sortie d'hibernation, les animaux ont été ramenés en laboratoire (mâles et femelles dans des pièces séparées) et seules certaines femelles ont été mises en contact avec des mâles afin d'obtenir des accouplements. Cette expérience a donné 5 types de femelles : des femelles accouplées qui n'ont pas produit d'œufs, des femelles accouplées qui ont produit des œufs non développés, des femelles accouplées qui ont produit des jeunes ; des femelles non accouplées qui n'ont pas produit d'œufs, des femelles non accouplées qui ont produit des œufs non développés (non fécondés).

Le premier résultat important est que la plupart des femelles ont investi dans la reproduction (production d'œufs) quelque soit leur statut d'accouplement. Effectivement,

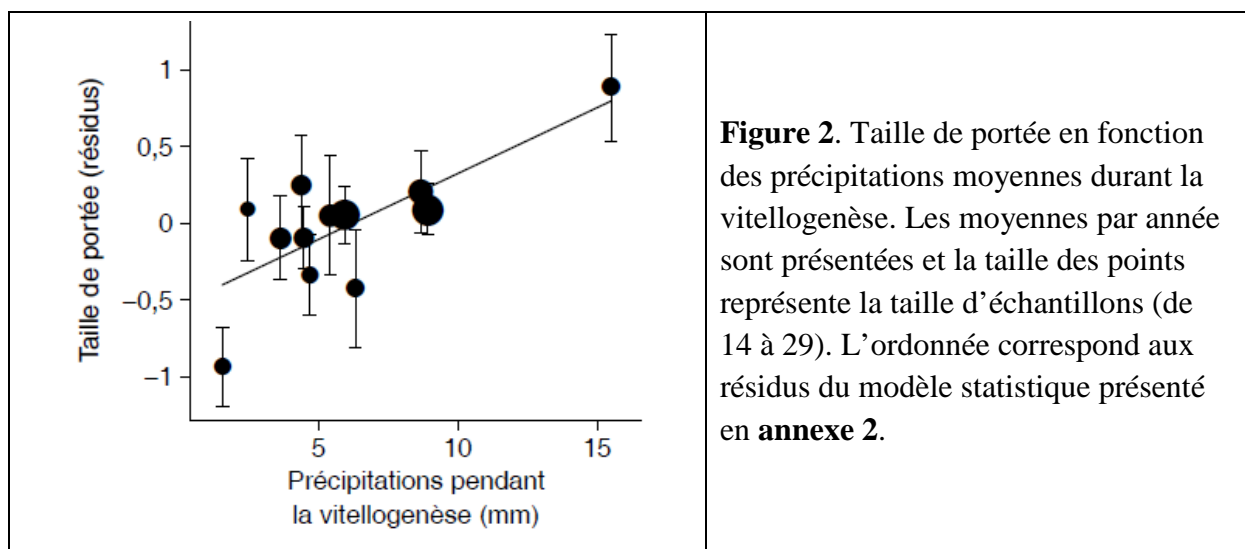
seulement 2 femelles accouplées et 1 femelle non accouplée n'ont pas visiblement investi dans la production d'œufs (**annexe 1**). L'accouplement et la présence de mâle n'est donc pas un facteur décisif pour déterminer l'investissement des femelles dans la vitellogenèse. Le deuxième résultat est que le nombre d'œufs produit par les femelles reproductrices ne dépend pas du statut d'accouplement ou du succès de la fécondation. Les femelles accouplées produisant des jeunes, les femelles accouplées produisant des œufs non fécondés et les femelles non accouplées produisant des œufs non fécondés ont eu une taille de portée similaire. Ce résultat suggère que l'investissement a aussi été quantitativement le même entre les femelles, en tout cas selon notre variable mesurée (taille de portée). De plus, c'est une indication indirecte que les femelles ne peuvent peut-être pas résorber leurs œufs après ovulation. Finalement, la date de mise bas était identique entre les femelles. Les femelles portant des œufs non fécondés ne les ont pas expulsés plus tôt. Ce résultat suggère que la durée de la gestation n'est pas déterminée par un signal embryonnaire, comme suggéré par certains auteurs (Guillette 1993). Cette expérience montre que la taille de portée n'est pas déterminée par l'accouplement, mais elle pourrait être influencée par d'autres facteurs (climatiques par exemple), et notamment des facteurs plus antérieurs (conditions pendant la constitution des réserves).

#### b. Effet du climat et des caractéristiques femelles (**article en annexe 2**)

Sur le jeu de données du suivi à long terme j'ai étudié les variations de taille de portée, masse de portée et poids des jeunes en fonction du climat (températures et précipitations) ressenti pendant la constitution des réserves (année précédente), la vitellogenèse et le début de gestation (**figure 1** et **annexe 2**). J'ai aussi testé les relations avec les caractéristiques individuelles suivantes : la corpulence (poids corrigé par la taille) après la mise bas de la reproduction précédente, la durée de la période de constitution des réserves (déterminée par la date de la mise bas précédente) et la taille. J'ai aussi considéré le succès de la portée en distinguant les portées totalement réussies des portées contenant au moins un échec (mort-né, prématuré ou œuf non développé).

Concernant les variables climatiques, aucun effet de la température n'a été mis en évidence (**annexe 2**). En particulier, la température pendant la gestation n'a pas d'influence sur la taille et la masse de la portée. La température pendant la gestation est connue pour affecter le développement embryonnaire chez les squamates (voir **chapitres 1 et 4**). Chez le lézard vivipare on sait que des températures plus chaudes pendant la gestation sont corrélées à

une mise bas plus précoce et une corpulence des femelles plus importante (Le Galliard et al. 2010). Néanmoins, les températures mesurées au cours de ce suivi, et en particulier pendant la gestation, ne semblent pas avoir influencé l'investissement dans la reproduction. J'ai mis en évidence un effet positif de la moyenne des précipitations pendant la vitellogenèse sur la taille et la masse des portées (**figure 2**). L'investissement dans la reproduction n'est donc pas entièrement fixé avant la vitellogenèse et des ajustements sont possibles à ce moment là. Les précipitations ont pu affecter la quantité de nourriture disponible ou la qualité de l'habitat pour les femelles (stratégie income), ou alors affecter l'utilisation de ressources stockées (stratégie de capitalisation dépendante du climat).



**Figure 2.** Taille de portée en fonction des précipitations moyennes durant la vitellogenèse. Les moyennes par année sont présentées et la taille des points représente la taille d'échantillons (de 14 à 29). L'ordonnée correspond aux résidus du modèle statistique présenté en **annexe 2**.

L'investissement dans la reproduction est aussi affecté par des caractéristiques individuelles des femelles. La taille et la masse de portée sont positivement corrélées à la taille de la femelle, reflétant une contrainte physique (*e.g.* Massot et al. 2011) et/ou une meilleure exploitation des ressources par les grandes femelles (*e.g.* González-Suárez et al. 2011). De plus, conditionnellement au succès de la portée, j'ai montré une interaction entre la corpulence après la mise bas précédente et la date de mise bas précédente (**annexe 2**). La corpulence est corrélée positivement à l'investissement dans la reproduction chez les femelles qui produisent des portées totalement viables. Par contre chez les femelles qui produisent des portées avec au moins un échec, la corpulence n'est importante que pour les femelles qui ont une mise bas tardive. Il semblerait donc que les autres femelles peuvent compenser l'effet de leur faible corpulence quand leur période post-reproductive de reconstitution des réserves est plus longue.

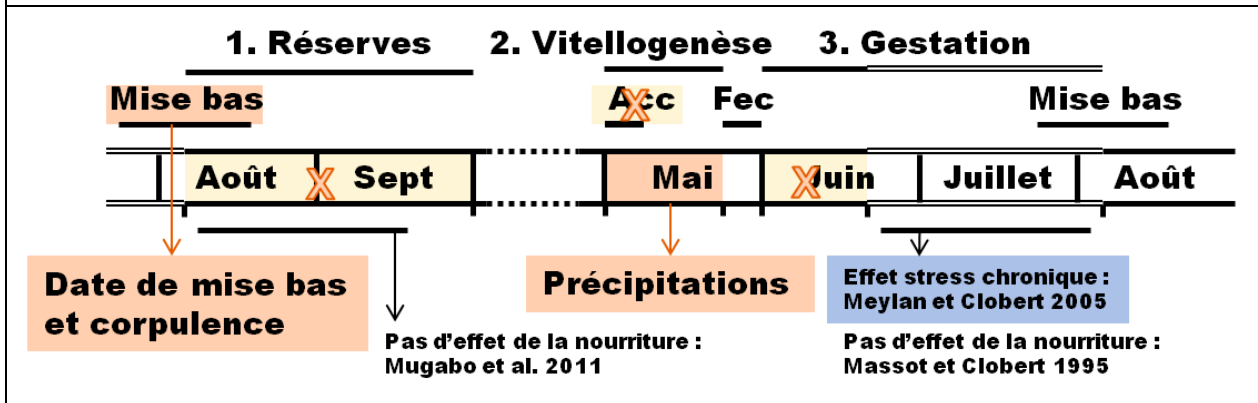
Enfin, je me suis aussi intéressée au poids moyen des jeunes. Le poids des jeunes est seulement corrélé négativement à la taille de portée (**annexe 2**). Il n'y a pas d'effets des autres caractéristiques femelles ou climatiques. La force de la corrélation entre poids et nombre de jeunes dépend toutefois de la variation annuelle dans l'acquisition des ressources, comme je l'ai montré dans une étude spécifique (**annexe 2**). Le compromis est détecté plus facilement (*i.e.* la valeur de la corrélation est plus grande) quand la variation dans l'acquisition des ressources est faible par rapport à la variation dans l'allocation de ses ressources, comme prédit théoriquement (modèle de van Noordwijk & de Jong 1986). L'importance du compromis entre nombre et poids des jeunes sera de nouveau abordée dans le **chapitre 4**.

### 2.3. Synthèse

L'ajustement de l'investissement reproducteur dépend de plusieurs facteurs chez le lézard vivipare (**figure 3**). Il dépend notamment de la corpulence après la mise bas précédente et de la durée de la période de constitution des réserves, ce qui suggère une stratégie de capitalisation chez ce lézard. De plus, l'investissement est aussi ajusté en fonction du niveau des précipitations pendant la vitellogenèse, suggérant une stratégie income. Par contre, il n'y a pas d'effet de l'accouplement. Enfin, les conditions climatiques en première moitié de gestation (mois de juin) n'influencent pas l'investissement dans la reproduction même si elles affectent d'autres caractéristiques de la femelle (*e.g.* Le Galliard et al. 2010).

Ces résultats montrent un schéma complexe des déterminants de l'investissement dans la reproduction et suggèrent que le lézard vivipare utiliserait une stratégie mixte entre income et capitalisation. Des manipulations de l'apport en nourriture aux femelles pendant la période de constitution des réserves ou pendant la gestation n'ont pas eu d'effet sur la taille de portée et le poids des jeunes produits (Massot & Clobert 1995; Mugabo et al. 2011), ce qui complète notre observation que les variables climatiques n'ont pas d'effet à ces périodes là non plus. L'effet du climat pourrait bien être lié à la disponibilité en nourriture, mais cela reste à tester plus formellement. D'autres expériences, notamment, pendant la vitellogenèse pourraient clarifier ce schéma.

**Figure 3.** Synthèse des variables climatiques et individuelles corrélées à l'investissement dans la reproduction, *i.e.* taille de portée, masse de portée et masse des jeunes. La figure reprend la présentation de la figure 1. Les facteurs testés sont surlignés en jaune et barrés quand ils n'étaient pas significatifs, ils sont surlignés en orange quand ils sont significatifs pour la taille et la masse de portée et en bleu pour la masse des jeunes. Pour l'accouplement, on ne s'est intéressé qu'à la taille de portée car aucun jeune n'est produit par les femelles non accouplées. Pour la masse des jeunes, l'effet de la taille de portée n'est pas représenté. Des références à certaines études pertinentes ont été ajoutées pour compléter ce bilan.



De plus, malgré la viviparité, j'ai mis en évidence que les femelles ovulent spontanément et investissent dans la reproduction même en l'absence d'accouplement, et aussi que les ajustements post-ovulatoires de la taille de portée semblent très limités. De plus, les ajustements de la masse des jeunes, même s'ils sont possibles, ne semblent pas dépendre des conditions climatiques. Un résultat important pour la suite, est l'influence de la corpulence après la mise bas sur la fécondité suivante. Ce résultat nous sera utile pour l'étude des coûts de la gestation.

## Chapitre 3. Coûts de la gestation

Les études sur les coûts de la reproduction considèrent généralement l'ensemble des phases de reproduction. Cependant ces coûts peuvent être liés à différents moments du cycle reproducteur et donc peuvent avoir des implications sur l'évolution des modes de reproduction. Par exemple, une étude corrélative chez des mammifères a mis en évidence un coût de la lactation plus important que le coût de la gestation (Clutton-Brock et al. 1989). Certaines études sont spécifiques aux coûts de l'incubation (chez les oiseaux) ou du nourrissage des jeunes (chez les oiseaux et mammifères) mais très peu aux coûts de la gestation en particulier. Dans le cadre de mon étude sur l'évolution de la viviparité, il est pourtant nécessaire de connaître les coûts de la période de gestation seule. Effectivement, l'évolution de la viviparité est liée à l'importance relative de ses différents avantages et inconvénients. Chez les squamates vivipares, l'étude des coûts de la gestation s'est concentrée sur 3 aspects : les baisses des capacités locomotrices, le changement du comportement de thermorégulation et les conséquences métaboliques ou énergétiques.

### ***3.1. Coûts de la gestation chez les squamates***

#### **a. Capacités locomotrices**

Les capacités locomotrices des femelles sont généralement plus faibles pendant la gestation (mais voir aussi Qualls & Shine 1998b). Cette diminution s'applique aussi bien sur des mesures d'endurance que de vitesse (Le Galliard et al. 2003; Webb 2004; Lin et al. 2008). Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, d'un point de vue seulement mécanique, la prise de poids et l'encombrement physique des femelles peuvent suffire à diminuer leurs capacités locomotrices. Une relation entre la performance et la taille de ponte ou le poids de la ponte soutient cette hypothèse (*e.g.* Van Damme et al. 1989; Le Galliard et al. 2003). Une deuxième hypothèse, d'ailleurs non-exclusive, prédit une diminution des capacités locomotrices due aux changements physiologiques liés à la gestation (changements hormonaux et métaboliques). Dans ce cas, cette diminution n'est pas corrélée au poids de la ponte (*e.g.* Webb 2004). De plus, l'hypothèse « physiologique » est aussi confortée par le fait que chez certaines espèces le regain des capacités locomotrices n'est pas



immédiat après la mise bas (Olsson et al. 2000), et qu'un fardeau comparable en poids à celui d'une portée ne produit pas les mêmes conséquences (Olsson et al. 2000; Webb 2004).

Ces mesures de performances locomotrices sont intéressantes car un lien entre les performances locomotrices (endurance) et la survie a été mis en évidence par plusieurs études (chez des lézards juvéniles (Le Galliard et al. 2004) et chez des lézards femelles après la ponte (Miles et al. 2000)). En revanche, ce lien n'est pas clairement établi pendant la gestation. Même s'il existe une baisse des capacités locomotrices, d'autres changements peuvent la compenser. Notamment, les femelles changent de comportement pendant la gestation : elles sont plus cryptiques (donc plus difficiles à détecter) et restent plus proches de leur cachette (Bauwens & Thoen 1981; Schwarzkopf & Shine 1992).

#### b. Thermorégulation

Il a été montré que les femelles gestantes choisissent une température différente de leurs conspécifiques ou à un autre moment du cycle reproducteur. Certains squamates augmentent leur température, comme le boa constrictor, *Boa constrictor occidentalis* (Chiaraviglio 2006), la vipère aspic, *Vipera aspis* (Ladyman et al. 2003), le python de Children, *Antaresia childreni* (Lourdais et al. 2008), tandis que d'autres diminuent leur température, comme le lézard vivipare (Heulin 1987; Le Galliard et al. 2003), le lézard épineux des montagnes, *Sceloporus jarrovi* (Mathies & Andrews 1997) et le scinque de Bougainville, *Lerista bougainvillii* (Qualls & Shine 1998b). Généralement, en plus d'un changement de la température moyenne sélectionnée, les femelles gestantes maintiennent aussi des températures plus stables (références ci-dessus, diminution de la variance). Dans certains cas d'ailleurs, on observe seulement un changement de la variance (Webb et al. 2006).

Comme discuté en introduction, une augmentation de la température peut servir à accélérer ou améliorer le développement embryonnaire (hypothèse des climats froids et de manipulation maternelle). Néanmoins, même si les femelles sélectionnent des températures plus faibles pendant la gestation, la vitesse de développement embryonnaire peut quand même être plus rapide que chez les espèces ovipares, si les femelles sélectionnent des températures supérieures à celles disponibles dans un lieu de ponte extérieur (Rodríguez-Díaz et al. 2010). Le fait que certaines femelles diminuent leur température de thermorégulation est peut-être aussi lié au fait que les femelles sont plus cryptiques pendant la gestation pour éviter la prédation, et/ou que des températures trop élevées sont délétères ou sous-optimales pour le développement embryonnaire (hypothèse de manipulation maternelle). Notamment, chez le

lézard vivipare, l'incubation *in vitro* à 30 °C d'embryons est délétère alors qu'elle est possible à des températures voisines de 25-27°C (Panigel 1956; Maderson & Bellairs 1962). Dans tous les cas un changement de température signifie que les femelles ne sont pas à leur température optimale : elles doivent résoudre un compromis entre le succès du développement embryonnaire, la vitesse de ce développement, les contraintes liées à l'activité des femelles et à leur maintenance.

### c. Métabolisme et énergétique

Le métabolisme est une mesure qui représente l'ensemble des dépenses énergétiques d'un individu et une augmentation du métabolisme reflète donc un processus énergétiquement coûteux. Chaque individu est caractérisé par un taux métabolique basal (au repos) qui exprime le coût de maintenance de l'organisme (consommation énergétique des fonctions vitales). Pendant la gestation, le métabolisme des femelles est augmenté pour deux raisons : le métabolisme des jeunes s'ajoute à celui des femelles, et la gestation est énergétiquement coûteuse (De Marco & Guillette 1992). Cette augmentation, non liée au métabolisme des jeunes, est appelée coût de maintenance de la gestation. La plupart des espèces de squamates vivipares sont lécithotrophiques et donc, pendant la gestation elles ne fournissent que peu de nutriments organiques supplémentaires aux embryons néanmoins il existe des échanges importants d'eau, de minéraux et d'oxygène. De plus, les femelles doivent gérer les déchets (nitrogène et dioxyde de carbone) générés par les embryons. La période de gestation est donc associée à une augmentation du débit sanguin et de la respiration (Birchard et al. 1984). Cette augmentation du métabolisme peut aussi être liée, quand c'est le cas, à l'augmentation de température de la femelle (Ladyman et al. 2003). Le coût de maintenance est lié à ces dépenses énergétiques supplémentaires.

De plus, pendant la gestation, les femelles mangent moins, surtout en fin de gestation (Qualls & Shine 1998b; Lin et al. 2008), voire jeûnent complètement (Lourdais et al. 2002b). Les femelles doivent donc assurer des dépenses supplémentaires avec moins de ressources ou grâce à des ressources stockées. La présence des embryons compacte fortement le tube digestif des femelles et peut donc gêner la digestion. Une autre raison de cette alimentation réduite chez les femelles gestantes pourrait être leur activité de chasse moindre et plus cryptique. Cette hypothèse est notamment soutenue par le fait que chez certaines espèces comme la vipère aspic, les femelles, qui sont connues pour jeûner en conditions naturelles

pendant la gestation, se nourrissent quand on leur offre de la nourriture en laboratoire (Lourdais et al. 2002b).

Les études existantes montrent indéniablement des changements pendant la gestation, mais du fait de la difficulté de manipuler expérimentalement le coût de la gestation seul, *i.e.* sans manipuler le coût de la vitellogénèse, ses effets spécifiques sur la survie (pendant et après la gestation) et la fécondité future ne sont pas clairs.

### **3.2. Étude expérimentale et comparative chez le lézard vivipare**

La plupart des études citées ci-dessus sont basées sur des comparaisons : (i) entre des femelles reproductrices ou non reproductrices ou avec des mâles, (ii) de la même femelle avant et après la mise bas. Ces approches sont souvent utilisées car facile à mettre en place. Mais il faut faire attention à l'existence de facteurs confondants. Par exemple, il peut exister une variation saisonnière dans les traits mesurés qui n'est pas associée au statut reproducteur (Qualls & Shine 1998b). L'autre problème principal est que le statut reproducteur peut être corrélé avec beaucoup de paramètres. Par exemple, les femelles non reproductrices sont souvent moins corpulentes que les femelles reproductrices (Naulleau & Bonnet 1996), elles peuvent aussi être plus petites en taille ou plus jeunes (Massot et al. 2011). Il est donc difficile de conclure sur les coûts de reproduction seuls. Ce problème peut être résolu en créant les groupes de femelles reproductrices et non reproductrices de manière expérimentale (ingénierie phénotypique). En créant des groupes expérimentaux, le statut reproducteur n'est plus corrélé à d'autres variables. Cependant, lorsque l'on compare des femelles qui se reproduisent normalement (accouplement, vitellogénèse, gestation) à des femelles non reproductrices, on ne peut pas distinguer l'origine des coûts entre les différentes phases du cycle reproducteur et isoler les coûts de la gestation seuls.

J'ai donc mis en place deux types d'approches pour résoudre ce problème et estimer au mieux les coûts de la gestation chez le lézard vivipare : comparaisons de femelles qui portent des embryons en développement ou des œufs sans développement, et aussi de femelles qui portent un nombre d'embryons différent. Ces expériences permettent de manipuler les conditions de la gestation sans manipuler (ou le moins possible) les autres phases du cycle reproducteur. Finalement, j'ai aussi utilisé une troisième approche reposant sur une comparaison de femelles ovipares et vivipares. Lors de ces différentes expériences, j'ai mesuré différents traits selon les possibilités. Notamment, j'ai mesuré des traits qui sont

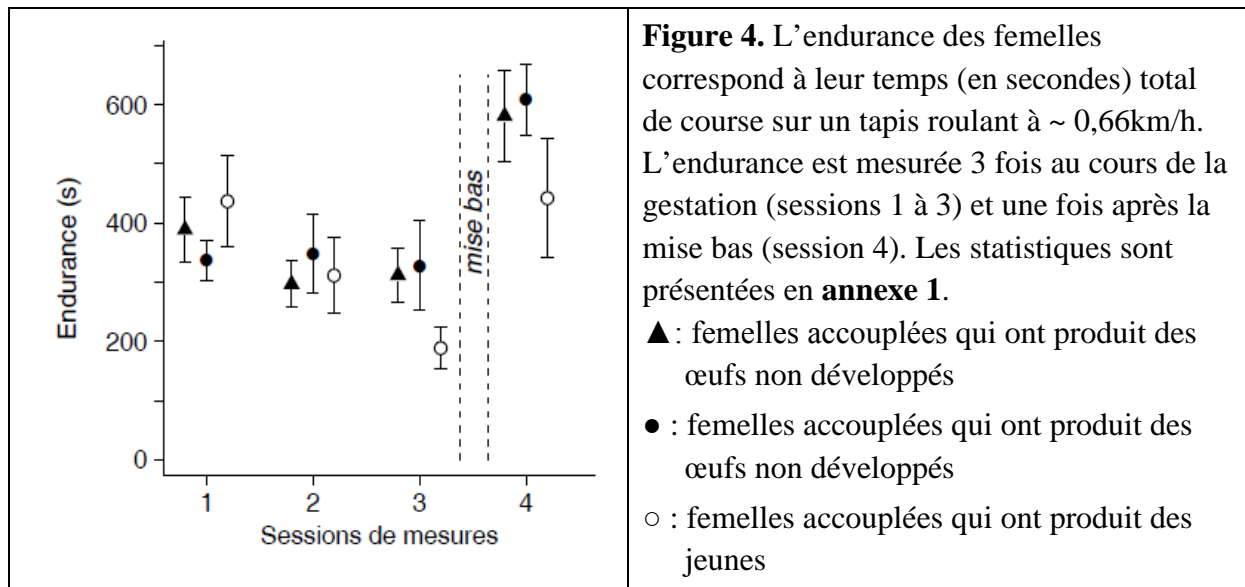
connus comme étant affectés par la gestation : les capacités locomotrices, la température sélectionnée et le comportement de thermorégulation. J'ai aussi mesuré le poids après la mise bas et certaines composantes du système immunitaire car ces paramètres ont été montrés comme importants pour l'étude des coûts de la reproduction (voir **chapitres 1 et 2**). Le système immunitaire est complexe et j'ai donc tenté d'en mesurer plusieurs aspects : la réponse à un challenge immunitaire (production d'anticorps), mesure du potentiel de la réponse inflammatoire (test PHA, qui inclut des aspects de la réponse immunitaire acquise et innée, Vinkler et al. 2010), mesure de l'immunité innée (activité du complément, Møller & Haussy 2007). Finalement, dans certains cas, j'ai aussi mesuré la survie et la croissance avant l'hibernation.

a. Coût de gestation d'œufs sans développement vs. embryons en développement  
(**article en annexe 1**)

La première expérience présentée dans le **chapitre précédent** consistait à comparer l'investissement dans la reproduction de femelles accouplées et non accouplées. J'ai montré que les femelles investissaient dans la production d'œufs quelque soit leur statut (accouplée ou non, portant des œufs en développement ou non). J'ai utilisé d'autres données, issues de cette même expérience, pour comparer les coûts de la gestation entre les femelles qui portent des œufs sans développement et celles qui portent des embryons en développement. Cette expérience a donné 3 types de femelles reproductrices : des femelles accouplées qui ont produit des jeunes, des femelles accouplées qui ont produit des œufs non développés, et des femelles non accouplées qui ont produit des œufs non développés. Toutes les femelles ont donc investi dans la vitellogenèse et la plupart ont aussi été accouplées. Cette expérience permet de tester spécifiquement si leurs coûts de gestation sont différents.

Les résultats ont montré que les femelles produisant des jeunes et celles produisant des œufs non développés ont le même poids après la mise bas et affichent le même changement de température pendant la gestation (elles ont sélectionné des températures plus faibles, voir **annexe 1**). Par contre, une différence de capacités locomotrices a été mise en évidence. Les femelles qui ont produit des jeunes étaient plus handicapées à la fin de la gestation que les femelles qui ont produit des œufs non développés (**figure 4 reprise de l'annexe 1**). À ce moment de la gestation, il y a aussi une différence de poids entre les femelles : les femelles qui ont produit des jeunes portaient une charge plus lourde que les autres femelles,

probablement en raison d'un afflux d'eau typique en fin de gestation (Dauphin-Villemant & Xavier 1986).



Globalement, les coûts de la gestation ne semblent pas fortement liés au développement des jeunes. La seule différence mise en évidence porte sur les capacités d'endurance, et cette différence semble liée aux différences de poids des portées en fin de gestation. Il est possible qu'en conditions naturelles cette différence se répercute sur la probabilité de survie ou le changement de comportement des femelles, mais ceci reste à déterminer. Toutefois, les performances d'endurance et le poids des femelles redeviennent comparables entre les groupes expérimentaux après la mise bas. Ces deux mesures sont liées à la survie après la mise bas et à la fécondité de l'année suivante. On peut donc penser, que les coûts de la gestation à plus long terme (survie et fécondité l'année suivante) seront comparables entre les femelles qui ont produit des œufs non développés et celles qui ont produit des jeunes. Plus généralement que dans le cadre de l'évolution de la viviparité, ce résultat montre l'existence d'une pression de sélection forte sur les femelles pour assurer la fécondation des œufs et pourrait expliquer la stratégie de certaines femelles de s'accoupler avec plusieurs mâles (*e.g.* Laloï et al. 2004).

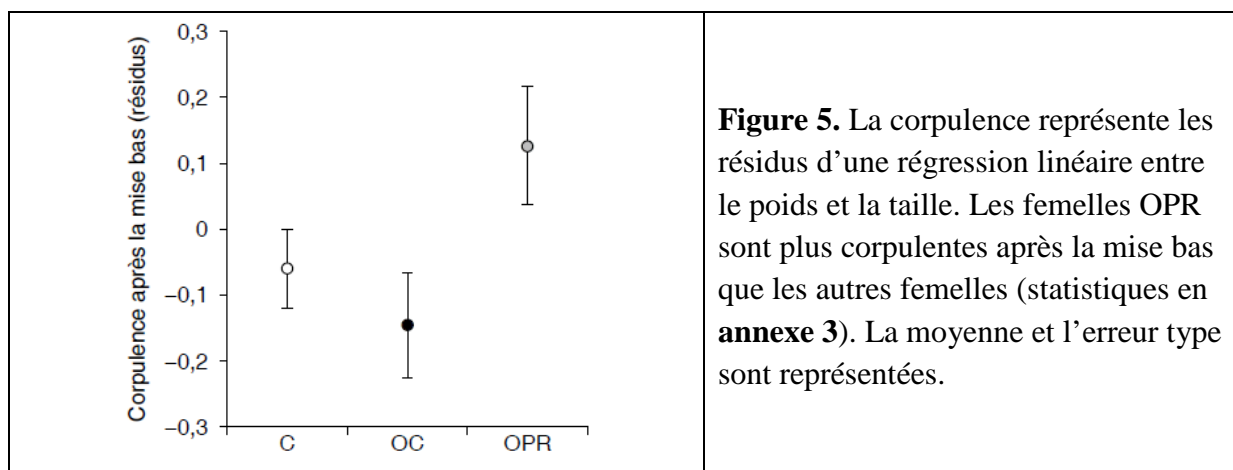
#### b. Manipulation de la taille de portée pendant la gestation

Dans un deuxième type d'approche, j'ai expérimentalement manipulé la taille de portée pendant la gestation. Les manipulations de taille de ponte/portée sont fréquentes dans les

études des coûts de la reproduction (voir **chapitre 1**) et ont même été appliquées au moment de la vitellogénèse chez des lézards (Landwer 1994; Miles et al. 2000) et des mammifères (Oksanen et al. 2002; Koivula et al. 2003). Pour la première fois, j'ai manipulé la taille de portée pendant la gestation pour l'étude spécifique des coûts de gestation.

- Manipulation par voie chirurgicale (**article en annexe 3**)

J'ai expérimentalement diminué la taille de portée au milieu de la gestation à l'aide d'une manipulation chirurgicale consistant en une ablation d'un des deux utérus. Cette manipulation a résulté en une diminution d'environ 50% de la taille de portée (voir les détails de méthode en **annexe 3**). J'ai donc comparé des femelles opérées dont la taille de portée a été réduite (opérées portées réduites ou OPR), des femelles opérées sans réduction de la taille de portée (opérées contrôles ou OC) et des femelles contrôles non manipulées (C).



**Figure 5.** La corpulence représente les résidus d'une régression linéaire entre le poids et la taille. Les femelles OPR sont plus corpulentes après la mise bas que les autres femelles (statistiques en **annexe 3**). La moyenne et l'erreur type sont représentées.

Cette expérience a mis en évidence que la réduction de taille de portée pouvait affecter le comportement de thermorégulation des femelles. En effet, pendant la fin de gestation, les femelles OPR ont thermorégulé plus souvent en étant à moitié cachée quand elles thermorégulaient que les femelles contrôles (OC et C). En revanche, je n'ai pas trouvé de différences de date de mise bas. Après la mise bas, les femelles ont montré la même capacité à monter une réponse inflammatoire (test PHA), par contre les femelles OPR étaient plus corpulentes que les femelles OC et C (**figure 5 reprise de l'annexe 3**). J'ai aussi suivi les femelles en conditions naturelles jusqu'à un an après la manipulation. Un à deux mois après la mise bas, avant l'entrée en hibernation, la prise de poids des femelles n'était pas différente entre les groupes expérimentaux. De plus, je n'ai identifié aucun effet sur la survie des

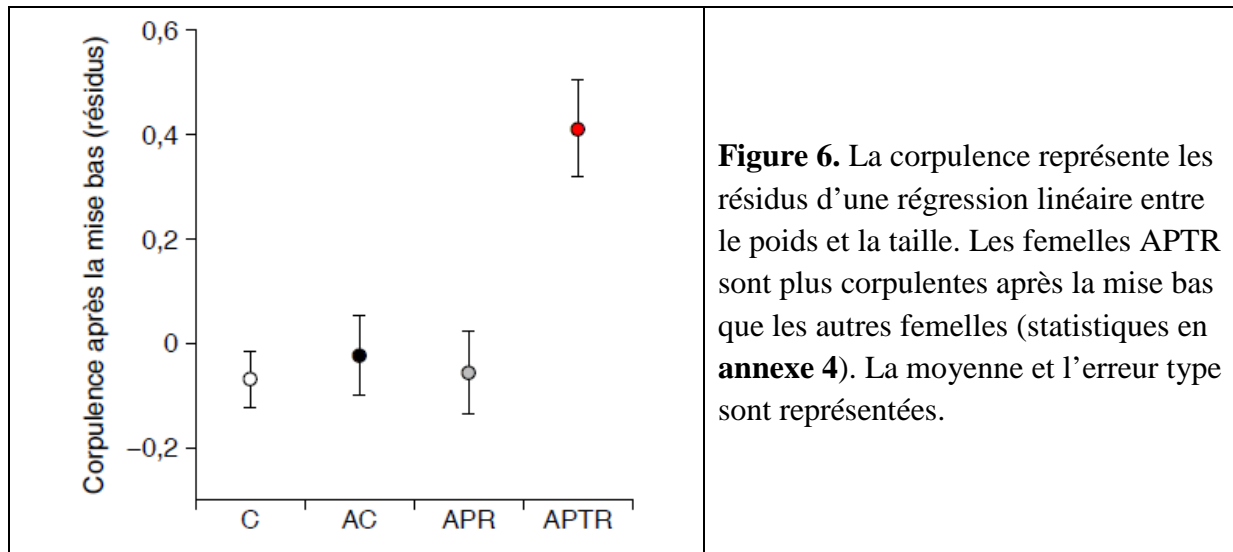
femelles. Il est vrai que les tailles d'échantillons de recapture étaient assez faibles, et ce résultat reste donc à être confirmé sur un plus grand jeu de données.

Cette étude a démontré expérimentalement que les coûts de gestation de grandes et petites portées sont différents. Le fait d'avoir une grande portée influence le comportement de thermorégulation, ce qui devrait jouer sur la détectabilité des femelles en conditions naturelles. De plus, les femelles avec une grande portée ont une corpulence plus faible après la mise bas, ce qui peut diminuer leur fécondité future (voir **annexe 2**).

- Manipulation par voie hormonale (**méthodes et résultats en annexe 4**)

J'ai également développé une autre méthode de manipulation de la taille de portée. Effectivement, la chirurgie est une méthode assez lourde à mettre en place, et a des conséquences définitives sur la femelle du fait de l'ablation d'un des deux utérus. À la place j'ai donc utilisé de l'arginine vasotocine (AVT), une hormone qui déclenche la mise bas chez les reptiles, de manière partielle ou totale (voir les détails de méthodes en **annexe 4**). Néanmoins certains individus ne répondent pas à cette stimulation. J'ai ainsi obtenu quatre groupes de femelles : femelles traitées à l'AVT qui ont pondu quelques œufs (APR), femelles traitées à l'AVT qui ont pondu tous leurs œufs (APTR), femelles traitées à l'AVT qui n'ont pas réagi (AC) et finalement des femelles contrôles non manipulées (C). Cette manipulation a résulté en une diminution d'environ 50% de la taille de portée chez les APR.

Cette manipulation a permis de mettre en évidence des effets différents des précédents. Ainsi, je n'ai pas observé de changement du comportement de thermorégulation. De même, après la mise bas, la masse des femelles APR, AC et C n'était pas différente. L'endurance a été mesurée et de manière surprenante il n'y a pas eu d'effet significatif de notre traitement (**annexe 4**). Par contre la masse des femelles APTR était supérieure (le poids a été mesuré après la mise bas expérimentale liée à l'injection d'AVT pour ces femelles) (**figure 6 reprise de l'annexe 4**). La capacité à monter une réponse inflammatoire (test PHA) a aussi été influencée par le traitement. Les grandes femelles APR ont réagi plus à la PHA que les autres femelles. Étonnamment, les femelles APTR n'ont pas suivi ce schéma et ont été identiques aux contrôles, bien que ceci ait pu être dû au faible nombre de femelles. Encore une fois, et avec une taille d'échantillon à la recapture légèrement supérieure que précédemment, je n'ai pas montré d'effet sur la survie des femelles.



**Figure 6.** La corpulence représente les résidus d’une régression linéaire entre le poids et la taille. Les femelles APTR sont plus corpulentes après la mise bas que les autres femelles (statistiques en **annexe 4**). La moyenne et l’erreur type sont représentées.

Globalement, les femelles qui ont pondu tous leurs œufs et celles qui en ont pondu qu’une partie ne réagissent pas tout à fait de la même façon. Néanmoins, les femelles APTR, qui ne sont donc plus gestantes, ne semblent pas être totalement différentes des autres femelles et parfois ressemblent plus aux contrôles. On a donc un résultat assez complexe qui pourrait traduire le fait que tous les changements physiologiques induits par la gestation ne sont peut-être pas modifiés par l’expulsion prématurée des œufs. En tout cas, les femelles APTR sont plus corpulentes que les autres femelles (C, AC et APR), et même plus corpulentes que les femelles OPR de l’expérience précédente. Pour les femelles avec une taille de portée réduite (APR), il semblerait qu’elles aient une plus grande immunocompétence quand elles sont grandes. Finalement, le fait de ne pas trouver de différences des capacités d’endurance est surprenant. Les femelles APR et APTR sont pourtant moins lourdes car elles ont expulsé tout ou partie de leur œuf. Il a été montré dans d’autres études que l’endurance était certainement corrélée à la masse de la portée (**annexe 1** ; Le Galliard et al. 2003), cependant on ne retrouve pas ce résultat ici. Un effet de l’AVT en soit sur les femelles peut avoir modifié cette relation. Effectivement, l’AVT n’influence pas que le comportement de mise bas chez les squamates, mais aussi le comportement de thermorégulation et la dynamique d’absorption de l’eau par le rein par exemples (Bradshaw & Bradshaw 2002). Peut-être aussi que des différences méthodologiques ou d’origine des animaux sont à l’origine de cette différence. Les résultats de cette expérience montrent bien que les mesures de performance et des coûts de la gestation dépendent des conditions. Effectivement, mis à part des différences méthodologiques (effet de l’AVT par exemple), la condition et l’histoire de vie des individus utilisés entre les expériences sont certainement



différentes car ils proviennent de différentes populations. L'effet de la population d'origine peut être très fort chez certaines espèces, comme chez le scinque, *Lampropholis guichenoti*, où les capacités locomotrices sont soit augmentées soit diminuées pendant la reproduction selon la population (Qualls & Shine 1997). Au sein d'une même population, les coûts de la reproduction peuvent dépendre, par exemples, de la disponibilité en ressource (French et al. 2007), de la présence d'un parasite (Descamps et al. 2009b) ou de l'âge des individus (Descamps et al. 2009a).

c. Coût du début de la reproduction chez des femelles ovipares et vivipares (**article en annexe 5**)

Pour comprendre l'évolution de la viviparité, il peut aussi être intéressant de comparer des femelles ovipares et vivipares. Effectivement, en comparant les coûts de reproduction de femelles appartenant à des modes de reproduction différents on peut en déduire quel mode de reproduction est associé avec le plus de coûts. Cependant, lors de la comparaison d'individus d'espèces différentes il risque d'exister encore plus d'effets confondants que lors de la comparaison d'individus reproducteurs et non reproducteurs car il existe des différences phylogénétiques qui risquent de masquer ou d'amplifier les différences liées aux modes de reproduction. Le modèle squamate est dans ce cas intéressant car la présence chez trois espèces, y compris le lézard vivipare, de femelles ovipares et vivipares offre la possibilité exceptionnelle d'une comparaison des modes de reproduction en minimisant les différences phylogénétiques.

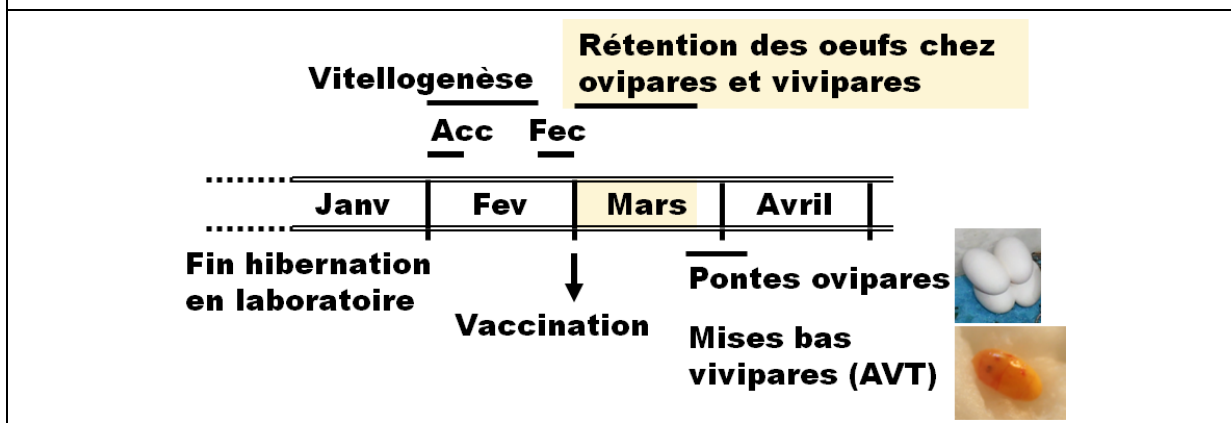
Une comparaison de ce type a été réalisée chez *L. bougainvillii*, une des trois espèces présentant les deux modes de reproduction (Qualls & Shine 1998b). Étonnement, cette étude a mis en évidence peu de différences entre femelles ovipares et vivipares : les femelles sélectionnent les mêmes températures, il n'y a pas de différences de poids et de croissance après la ponte et la mise bas, et la survie des femelles en enclos à la saison suivante est aussi identique (Qualls & Shine 1998b). Il faut toutefois noter, que chez cette espèce la reproduction (aussi bien chez les ovipares que chez les vivipares) ne diminue pas la survie à la saison suivante (Qualls & Shine 1998b). Il existe toutefois quelques différences : les femelles vivipares thermorégulent plus précisément (variance plus faible) et mangent moins en fin de gestation que les ovipares. Les coûts de gestation sont donc peut-être faibles ou en tout cas compensés chez les femelles vivipares. Il nous a semblé intéressant de compléter cette étude par une approche similaire de comparaison des modes de reproduction chez une autre espèce.

De plus, j'ai décidé de baser cette comparaison sur le cycle reproducteur des femelles ovipares pour avoir une approche plus fine des coûts spécifiques de la rétention des œufs pour chaque mode de reproduction.

Je ne me suis donc pas intéressée aux coûts de reproduction de manière globale mais aux coûts du début de la reproduction, c'est-à-dire à la partie commune entre femelles ovipares et vivipares. Effectivement, chez le lézard vivipare, même si les femelles vivipares retiennent leurs œufs plus longtemps que les femelles ovipares, ces dernières retiennent leur œuf pendant une période non négligeable (pendant un tiers du développement) (Heulin et al. 1991). Les femelles ovipares subissent donc également des coûts liés à la rétention des œufs, par exemple, elles subissent une baisse de leurs capacités locomotrices (*e.g.* Sinervo et al. 1991; Miles et al. 2000; Zani et al. 2008) et une augmentation du métabolisme (Angilletta & Sears 2000). Néanmoins, il existe d'autres différences, par exemple les femelles ovipares ont des glandes coquillières beaucoup plus développées que les femelles vivipares et produisent des coquilles plus épaisses (8 fois plus lourdes) (Heulin et al. 2005; Stewart et al. 2009). De plus chez le lézard vivipare, le calcium n'est pas investi dans le vitellus mais dans la coquille, pour les femelles ovipares, et il est transmis au cours de la gestation, en particulier en fin de gestation, pour les femelles vivipares (Stewart et al. 2009). Chez cette espèce lécithotrophique, les principales différences entre femelles ovipares et vivipares sont donc la durée de rétention des œufs et l'épaisseur de la coquille produite. L'investissement pendant la vitellogenèse, mesuré par le poids du vitellus, est comparable (Stewart et al. 2009). Je me suis intéressée à ces coûts de début de reproduction qui inclut la période de rétention des œufs commune aux femelles vivipares et ovipares.

Les méthodes de cette expérience sont décrites en **annexe 5** et **figure 7**. Rapidement, des femelles ovipares et vivipares du lézard vivipare ont été capturées dans deux populations différentes. Le cycle reproducteur des femelles a été synchronisé au moyen d'une hibernation artificielle afin d'éliminer les différences saisonnières. De plus, pour comparer les femelles ovipares et vivipares après la ponte des femelles ovipares, j'ai déclenché la mise bas des femelles vivipares par injection hormonale (injection d'AVT). La comparaison ovipare/vivipare a été enrichie par le test de leurs réponses respectives à un challenge immunitaire induit chez la moitié des femelles.

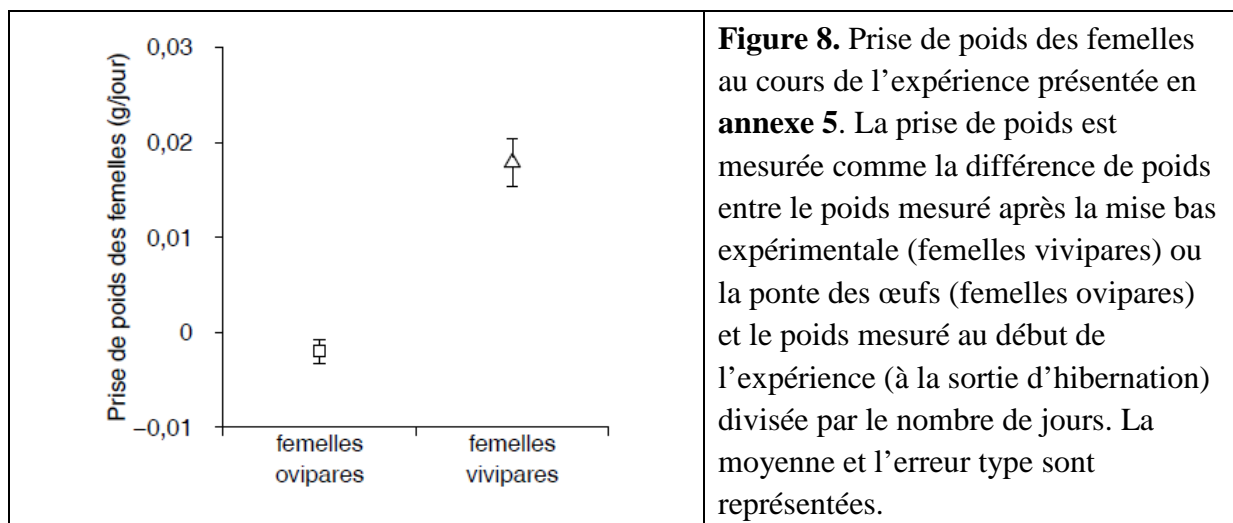
**Figure 7.** Déroulement de l'expérience de comparaison des coûts de la rétention des œufs chez des femelles ovipares et vivipares de *Z. vivipara*. Les cycles reproducteurs ont été synchronisés en laboratoire et sont donc décalés par rapport au cycle naturel.



Pendant la période de rétention des œufs, j'ai montré un effet du mode de reproduction lié au challenge immunitaire sur la température externe sélectionnée par les femelles. Néanmoins, cette différence semble liée à la taille des femelles (les femelles vivipares sont plus grandes) plutôt qu'à leur mode de reproduction (voir **annexe 5**). Le comportement de thermorégulation est lui clairement lié au mode de reproduction. Les femelles vivipares ont passé plus de temps à thermoréguler quand elles étaient actives et, quand elles thermorégulaient, elles thermorégulaient plus souvent en étant à moitié cachée que les femelles ovipares. J'ai aussi mis en évidence une différence marquée de prise de poids entre les femelles (**figure 8**). Après la ponte, les femelles ovipares ont retrouvé un poids similaire ou légèrement inférieure à celui de la sortie d'hibernation (avant reproduction), tandis que les femelles vivipares étaient nettement plus grosses. Les femelles vivipares ont pris du poids pendant cette première partie de la reproduction. Finalement, les femelles ovipares et vivipares ont la même capacité à monter une réponse inflammatoire (test PHA) après la ponte/mise bas.

Cette étude a montré que certains paramètres comme la réponse à un challenge immunitaire ne sont pas différents entre les modes de reproduction ovipares et vivipares. Toutefois, il existe des différences comportementales. Les deux types de femelles n'ont pas le même comportement de thermorégulation bien que (et probablement à cause de cette différence) leurs températures corporelles ne soient pas différentes. Les femelles vivipares utilisent plus souvent un comportement cryptique que les femelles ovipares. Le comportement cryptique des femelles vivipares a été associé négativement à l'effort pendant la gestation dans une des études précédentes (**annexe 3**). Cela suggère donc ici que le coût de la rétention

des œufs serait plus important pour les femelles ovipares que les femelles vivipares. Dernier point, les femelles vivipares ont pris du poids contrairement aux femelles ovipares. Cela indique de nouveau que le début de la reproduction est plus coûteux pour les femelles ovipares que pour les femelles vivipares. La sécrétion de la coquille pourrait représenter un coût important pour les femelles ovipares. On peut émettre l'hypothèse, que les ressources stockées pendant le début de la reproduction par les femelles vivipares seront utilisées pour supporter les dépenses liées à la fin de la gestation. En tout cas, il y a une prise de poids des femelles vivipares au début de la gestation (ce résultat et **annexe 4**).



### 3.3. Synthèse

Des coûts spécifiques de la gestation ont été mis en évidence par ces différentes études. Notamment, le changement de comportement de thermorégulation semble dépendre sous certaines conditions de la taille de portée, et aussi du mode de reproduction. Les femelles vivipares avec des portées réduites sont parfois plus cryptiques que les femelles vivipares contrôles, et les femelles vivipares sont plus cryptiques que les ovipares. Pour mieux comprendre l'impact de ces changements, il serait utile de mener une étude en conditions naturelles (ou semi-naturelles) pendant la gestation. Par ailleurs, certains coûts sont inhérents à la gestation et ne sont pas liés à la fécondité (taille de portée) ou au développement des jeunes, comme la température sélectionnée. Cela signifie que la fécondité n'est pas forcément contrainte par des coûts de gestation élevée chez les espèces vivipares.

Les coûts de la gestation semblent affecter la fécondité future et non la survie à la saison suivante. Cependant, nous ne pouvons pas écarter des coûts sur la survie à plus long terme

(longévité réduite). De plus, la manipulation hormonale ou celle des accouplements offre la possibilité de tester directement l'influence des coûts de la gestation sur la fécondité future. Finalement, la mise en évidence de coûts de la gestation est assez complexe car elle dépend des conditions individuelles et expérimentales. Cela suggère que certains coûts sont plutôt des réponses facultatives qu'obligatoires à la gestation. Par exemple, certaines années la croissance des femelles peut être fortement contrainte car les conditions sont moins bonnes (peu de ressource, parasites...) et donc les coûts de la gestation se traduiront par une diminution de la croissance de ses femelles. Cependant ces mêmes coûts de la gestation peuvent ne pas être détectables lors de « bonnes » années.

L'évolution de la viviparité chez les squamates s'accompagne d'une augmentation de la durée de rétention des œufs (période de gestation). La gestation est associée à certains coûts facultatifs ou obligatoires mais change aussi la dynamique des coûts de la reproduction. Effectivement, les femelles ovipares secrètent une coquille épaisse et doivent investir tous les nutriments nécessaires au développement des jeunes soit pendant la vitellogenèse soit pendant la formation de la coquille au moment de la rétention des œufs. Ce qui se traduit par une première partie de la reproduction plus coûteuse pour les femelles ovipares par rapport aux vivipares. La période de rétention des œufs plus longue (période de gestation) des femelles vivipares offre la possibilité de ne pas investir dans la production coûteuse d'une coquille et d'étaler l'investissement des nutriments qui peuvent être transmis via le placenta tout au long de la gestation. Ce changement de dynamique est intéressant car il montre que les coûts de la reproduction chez les espèces vivipares ne sont pas linéairement corrélés à l'augmentation de la durée de rétention des œufs par rapport à leur conspécifiques ovipares. La période de gestation offre aussi des avantages aux femelles vivipares, ce qui pourrait compenser l'existence de certains coûts.

## Chapitre 4. Effets maternels

### 4.1. Effets maternels et viviparité

Les effets maternels existent chez toutes les espèces, quelque soit leur mode de reproduction. Néanmoins, dans le cas des espèces vivipares, il existe une relation longue et étroite entre la mère et ses jeunes pendant la gestation qui permet l'existence d'effets maternels particuliers à cette période en particulier via des échanges placentaires (Bernardo 1996). En plus de la nature des effets maternels, la durée et le moment des effets maternels pendant l'ontogénie peuvent être importants. Par exemple, le même élément (humidité du milieu) peut avoir des conséquences différentes sur le comportement de dispersion des jeunes selon qu'il ait été transmis par un effet maternel prénatal, humidité du milieu pendant la gestation, ou post-natal, humidité du milieu à la naissance déterminé par le site de parturition (Massot et al. 2002).

Nous avons abordé dans le **chapitre 2**, la possibilité de modulation maternelle de l'effort reproducteur pendant la gestation, via la résorption ou l'expulsion des embryons en développement (taille de portée) ou l'adaptation des transferts nutritifs (poids des jeunes). On peut rappeler que chez notre espèce l'ajustement de la taille de portée et les transferts de nutriments organiques semblent limités pendant la gestation (**chapitre 2**), mais il existe clairement des transferts de minéraux (Panigel 1956; Stewart et al. 2009).

Pendant la gestation, les effets maternels ne sont pas limités à des échanges trophiques. Il existe aussi des transferts hormonaux entre la mère et les embryons. Des études chez les mammifères ont montré l'existence de transferts des glucocorticoïdes (Matthews et al. 2002), des hormones thyroïdiennes (Patel et al. 2011) ou encore de la mélatonine, qui transmet des informations sur la photopériode (Horton & Stetson 1992). Même si le modèle mammifère est le plus étudié, chez le lézard des transferts de la corticostérone, un glucocorticoïde (Itonaga et al. 2011), et de la progestérone (Painter et al. 2002) via le placenta ont été mis en évidence. Certains anticorps peuvent aussi être transmis pendant la gestation : cela est bien établi pour les immunoglobulines G chez les mammifères (Boulinier & Staszewski 2008) mais les données dans les autres taxons sont rares. Un exemple chez *Neoditrema ransonneti*, un poisson vivipare, suggère que des immunoglobulines M peuvent être transmises chez cette espèce (Nakamura et al. 2006). À notre connaissance, chez les squamates vivipares, aucune étude n'a établi ou infirmé l'existence d'un transfert d'anticorps. Finalement, beaucoup

d'autres composés peuvent être transmis, comme les métabolites impliqués dans les odeurs, qui peuvent directement influencé le développement du système de reconnaissance des odeurs des embryons (Todrank et al. 2011), ou bien des pathogènes ou des toxines, qui diminuent la survie des descendants (*e.g.* Fligny et al. 2009). Ces derniers transferts ne sont pas adaptatifs mais plutôt des effets passifs liés aux échanges entre mères et embryons.

La thermorégulation maternelle peut aussi influencer le développement des jeunes pendant la gestation, et est largement étudiée chez les squamates. La durée ou la température de thermorégulation influence le comportement et la croissance des jeunes (Wapstra 2000; Yan et al. 2011), leur viabilité (Beuchat 1988; Shine & Harlow 1993) ou encore le sex-ratio de la portée (Robert & Thompson 2001; Wapstra et al. 2004; Zhang et al. 2010). L'effet de la thermorégulation peut être direct : la température influence directement le métabolisme des jeunes ; ou indirect : la température modifie le métabolisme ou la balance hydrique chez les femelles ce qui modifie le développement des jeunes (Huey 1982). De manière plus générale, toutes les caractéristiques de la femelle ou de son environnement qui influencent son état physiologique et les transferts placentaires peuvent résulter en des effets maternels au cours de la gestation. Par exemple, la densité en congénères pendant la gestation résulte en la production de jeunes mieux adaptés à la compétition (jeunes plus grands) chez un poisson vivipare, *Heterandria formosa* (Leips et al. 2009).

#### **4.2. Tests expérimentaux sur les effets maternels chez le lézard vivipare**

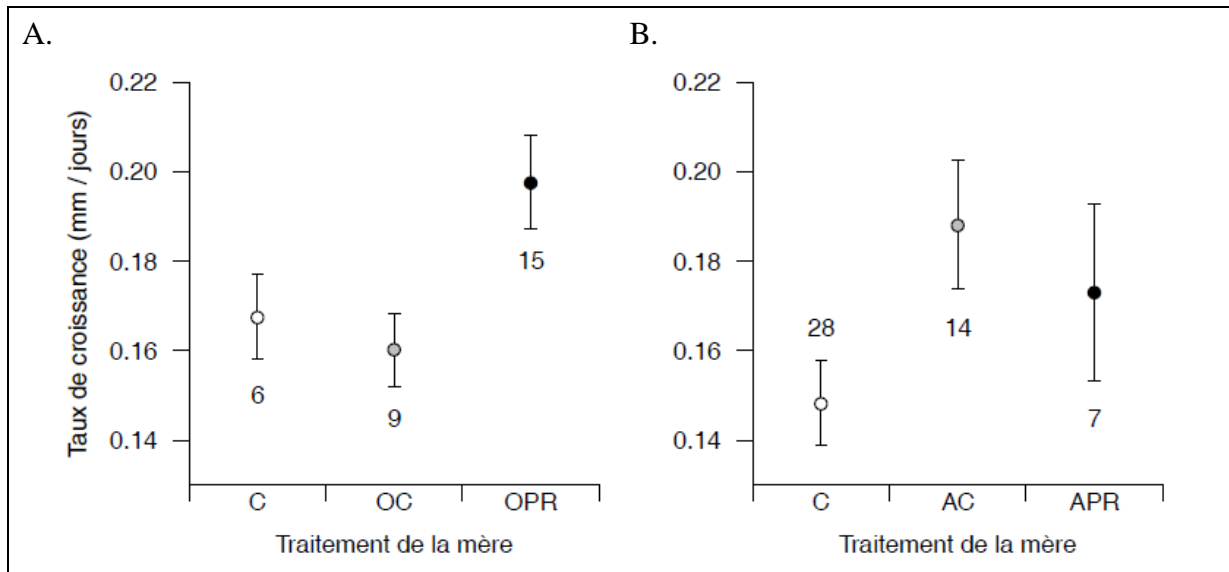
On peut distinguer plusieurs types d'approches pour mettre en évidence des effets maternels pendant la gestation. Il existe des approches corrélatives (aucune manipulation) et des approches expérimentales qui reposent sur des manipulations : des conditions environnementales, du phénotype maternel, ou de l'environnement des embryons directement. Ce premier type d'approche expérimentale (modification de l'environnement) a beaucoup été utilisé chez les squamates du fait de l'intérêt porté aux effets des conditions thermiques pendant la gestation sur le phénotype des jeunes (voir ci-dessus). D'autres aspects environnementaux peuvent être modifiés, comme la présence de prédateurs (Shine & Downes 1999) ou l'humidité du milieu (*e.g.* Massot et al. 2002). L'intérêt des deux derniers types d'approches est de se placer plus près de la compréhension des mécanismes des effets maternels. Une manipulation du phénotype maternel peut mettre en évidence l'importance du niveau hormonal (corticostérone) (Meylan et al. 2004; Meylan & Clobert 2005) ou de la charge parasitaire maternelle (Sorci et al. 1994) sur le phénotype des jeunes. Finalement, il est

souvent plus difficile de modifier directement l'environnement des embryons. Cependant cette manipulation est la seule qui permet de tester directement les effets des facteurs considérés. Chez les mammifères, des techniques de transferts d'embryons ont été employées (Bernardo 1996). Cette approche puissante est néanmoins techniquement très difficile à mettre en place chez des espèces lécithotrophes (qui produisent des ovules de tailles importantes) et pour l'instant, à notre connaissance, n'a pas été adaptée à d'autres modèles. L'environnement des embryons peut aussi être manipulé directement *in utero* : par exemple, dans le cas de l'étude de certaines hormones, celles-ci peuvent être appliquées directement sur les embryons pendant la gestation grâce à une manipulation chirurgicale (Uller & Olsson 2003, 2006). Néanmoins le nombre de paramètres manipulables est limité avec cette approche. La dernière possibilité consiste à incuber des embryons en dehors de l'organisme maternel. Chez les espèces vivipares, il est évidemment plus difficile de développer des techniques d'incubations que chez les espèces ovipares. Cependant, c'est une réelle possibilité chez les espèces vivipares lécithotrophiques. Mon travail se base sur ces techniques expérimentales avec une manipulation de la taille de portée et une approche d'incubation *in vitro* des embryons.

a. Coûts de gestation inter-générationnels (**Annexes 3 et 4**)

Dans une première série d'expériences, je me suis intéressée à l'influence de la taille de portée pendant la gestation sur le phénotype des jeunes et donc sur l'existence d'un coût de gestation inter-générationnel. Effectivement, comme décrit en introduction, l'investissement dans la reproduction peut résulter en des coûts intra-générationnels (survie et fécondité des femelles) ou inter-générationnels (survie et reproduction des jeunes). Pour tester l'existence d'effets maternels pendant la gestation dépendant de la taille de portée nous avons expérimentalement manipulé la taille de portée pendant la gestation. La taille de portée a été diminuée par manipulation chirurgicale ou hormonale (**chapitre précédent, annexes 3 et 4**). Les deux expériences ont résulté en une diminution d'environ de moitié de la taille de portée. Les caractéristiques des jeunes ont été mesurées à la naissance (taille, poids, sexe) et aussi à plus long terme. Les jeunes ont été recapturés à deux occasions : avant leur première hibernation (environ 1 mois après leur naissance) et après l'hibernation (environ 10 mois après leur naissance). Ce suivi nous permet d'estimer leur taux de croissance et leur survie avant hibernation.





**Figure 9.** Taux de croissance des jeunes durant leur premier mois de vie. Le taux de croissance est la différence de taille entre la recapture et la naissance divisé par le nombre de jours écoulés (mm / jour). Les tailles d'échantillons sont indiquées sur la figure.

A. La taille de portée a été manipulée par chirurgie en 2009. Nous avons des femelles contrôles non manipulées (C), opérées contrôles (OC) et opérées dont la taille de portée a été réduite (OPR).

B. La taille de portée a été manipulée par injection d'AVT en 2010. Nous avons des femelles contrôles non manipulées (C), traitées à l'AVT qui n'ont pas réagi (AC) et traitées à l'AVT qui ont pondu quelques œufs (APR).

Ces deux expériences menées pendant l'été 2009 et 2010 ont permis de montrer que les caractéristiques des jeunes à la naissance étaient identiques entre les différents groupes expérimentaux (**annexes 3 et 4**). La taille et le poids des jeunes étaient liés à la taille de portée au début de gestation (avant la manipulation) et reflétaient un compromis entre le nombre et la taille des jeunes produits (**chapitre 2**). Cependant nous avons mis en évidence un effet maternel à plus long terme. La croissance après la naissance a été plus importante chez les jeunes des portées de taille réduite expérimentalement par chirurgie que chez les jeunes contrôles (**figure 9A reprise de l'annexe 3**). Néanmoins, l'année suivante, suite à la manipulation hormonale, je n'ai pas retrouvé cet effet. L'interaction entre le traitement hormonal et la croissance a seulement été marginalement significative (**annexe 4**) et mettrait plutôt en évidence un effet global de l'injection d'AVT (**figure 9B**). Dans ces deux expériences, aucun effet sur la survie des jeunes n'a été mis en évidence (**annexes 3 et 4**).

Ces expériences confirment que les transferts de nutriments organiques semblent limités chez notre espèce et l'importance du compromis entre la taille et le nombre de jeunes produits (**chapitre 2**). Néanmoins, un effet sur la croissance a été mis en évidence. Cela signifie que,

sous certaines conditions, le nombre de jeunes pendant la gestation détermine un élément de la qualité de ces jeunes. Dans notre cas, le taux de croissance plus rapide n'a pas été associé avec une augmentation de la survie des jeunes (Le Galliard et al. 2010). Néanmoins, une plus grande taille à maturité peut conférer des avantages, par exemple sur le plan de la fécondité (âge à maturité, taille de portée) chez les femelles (Massot et al. 2011). Il est aussi vrai qu'un taux de croissance élevé peut avoir des conséquences négatives à long terme (Metcalfé & Monaghan 2001). Chez les squamates, la croissance des jeunes est très plastique et peut par exemple, pendant la gestation, être influencée positivement par les conditions de thermorégulation (Wapstra 2000) et d'humidité (Le Galliard et al. 2010) ou négativement par le stress (Meylan & Clobert 2005). Dans notre cas, la modification de la taille de portée a pu modifier la quantité des transferts entre la mère et les embryons restants, ces derniers ayant eu potentiellement accès à plus de ressources disponibles. Même si les caractéristiques de taille et poids mesurées à la naissance étaient identiques, le phénotype des jeunes a pu être modifié : les jeunes des portées réduites ont peut-être reçu plus de calcium ou plus de testostérone, ce qui est connu pour stimuler la croissance (Uller & Olsson 2003). Cet effet semble être plastique du fait qu'on ne le retrouve pas les deux années consécutives. Cela pourrait résulter d'un effet direct de l'AVT sur les jeunes ou de différences entre les deux manipulations. Effectivement, les deux manipulations n'ont pas eu lieu la même année et les individus provenaient de populations différentes. En particulier, la présence de tiques a été plus importante dans la population des jeunes de l'expérience AVT (observations personnelles). L'étude citée précédemment (Uller & Olsson 2003), a aussi mis en évidence que l'augmentation du taux de croissance suite à une augmentation du taux de testostérone pendant la gestation n'est plus significative quand les juvéniles sont exposés à des tiques. Dans ce cas là, la croissance des juvéniles contrôles et des juvéniles « augmentés » en testostérone est identique. Ce résultat pourrait expliquer l'absence de différences dans les taux de croissance lors de la manipulation AVT sur des lézards provenant d'une population fortement infestée en tiques. Cela n'est qu'une hypothèse car nous ne connaissons pas les mécanismes sous-jacents de cet effet maternel.

#### b. Incubation *in vitro* d'embryons (**méthodes et résultats en annexe 6**)

Comme notre manipulation le montre, il est difficile de déterminer les mécanismes à l'origine des effets maternels quand le phénotype maternel est modifié. Même si ce genre de manipulation est plus approprié pour la mise en évidence des mécanismes que des

manipulations de l'environnement, il est impossible de comprendre la cascade des effets qui peut affecter le phénotype des embryons. Dans notre cas, le changement de la taille de portée peut avoir modifié la quantité des échanges de certains composés entre la mère et les embryons, mais nous ne savons pas lesquels. De plus le changement de taille de portée peut aussi avoir modifié l'importance des échanges hormonaux entre embryons. Il peut donc être astucieux de manipuler directement l'environnement des embryons pour tester l'importance des facteurs que l'on pense impliqués. Dans le cas des hormones, comme la testostérone, celles-ci peuvent être appliquées directement sur les embryons (Uller & Olsson 2003, 2006). Mais il semble difficile de manipuler la disponibilité en calcium avec ce genre d'approche. C'est pourquoi, je me suis intéressée aux techniques d'incubations *in vitro*. Notamment, chez le lézard vivipare une technique a déjà été décrite (Panigel 1956). J'ai donc testé cette méthode pour obtenir des jeunes vivants sous des conditions complètement contrôlées. Malgré la publication d'origine, il s'est révélé difficile d'obtenir des jeunes vivants et le protocole d'incubation a du être adapté (**annexe 6**).

Il a finalement été possible d'obtenir des jeunes vivants, mais la technique doit encore être raffinée avant de pouvoir l'utiliser à des fins expérimentales. Pour l'instant le taux de succès est trop faible, même s'il s'approche des 30% quand on prend en compte uniquement les embryons incubés à partir du stade 35-37. Les œufs prélevés à un stade trop jeune (<32) ne se sont jamais développés jusqu'au terme et en fait meurent rapidement. Peut-être qu'à ces stades l'homéostasie de l'œuf est moins efficacement régulée (Packard et al. 1977). Pour les œufs d'un stade un peu plus avancé, il nous faut encore améliorer le succès d'éclosion. Effectivement, les embryons qui se développent meurent surtout à l'approche du moment de l'éclosion et très peu aux stades antérieurs. Dans notre cas, les jeunes obtenus vivants ont tous été éclos artificiellement (nous avons ouverts les œufs nous-mêmes). Cependant il est difficile de déterminer à quelle date il faut « éclore » les œufs et plusieurs embryons/jeunes étaient déjà morts ou sont morts peu de temps après l'ouverture de leurs œufs. En conditions naturelles, la parturition est corrélée à une augmentation des taux de corticostérone (Dauphin-Villemant & Xavier 1986) et une diminution de la progestérone (Xavier 1982). Ces signaux hormonaux sont peut-être importants pour stimuler l'éclosion des jeunes. Le faible taux d'éclosion peut aussi être lié aux conditions d'incubations. Chez les squamates, il est bien connu que la température d'incubation des œufs chez les ovipares (*e.g.* Braña & Ji 2000; Booth et al. 2000) ou la température de gestation chez les vivipares (*e.g.* Wapstra 2000; Lourdais et al. 2004; Yan et al. 2011) affectent le phénotype des jeunes à l'éclosion. De plus,

chez des femelles ovipares du lézard vivipare, des températures trop élevées d'incubation diminuent fortement le succès d'éclosion (Rodríguez-Díaz & Braña 2011).

Nous pensons donc que la température est un élément critique à manipuler pour augmenter le succès de cette technique d'incubation d'embryons vivipares. Cette approche expérimentale, nous permettra prochainement d'étudier de manière fine et directe les effets maternels pendant la gestation.

### **4.3. Effets de l'âge grand-maternel**

#### **a. L'âge un effet maternel ?**

La persistance d'effets maternels peut être particulièrement importante et se traduire par des modifications phénotypiques sur deux générations de descendants. On parle alors d'effets grand-maternels, et ces effets peuvent être liés, par exemple, au choix du site de ponte (*e.g.* Fox & Savalli 1998) ou à la disponibilité en ressource (*e.g.* Hafer et al. 2011). Je me suis en particulier intéressée à l'effet de l'âge grand-maternel car cette question a encore été rarement étudiée en dépit de l'importance de l'âge dans les processus de reproduction. L'âge à la reproduction influence en effet le succès de la reproduction et la qualité des jeunes produits. Ces effets peuvent être positifs comme chez plusieurs espèces d'oiseaux (Forslund & Pärt 1995) ou négatifs, surtout à des âges plus avancés (*e.g.* Rockwell et al. 1993).

Les mécanismes sous-jacents des effets de l'âge sont multiples. Tout d'abord, les effets de l'âge moyen dans les populations peuvent être liés à la sélection de certains phénotypes (Forslund & Pärt 1995). Si les individus de meilleurs « qualités » (qui ont des performances reproductrices plus élevées) survivent mieux, la proportion de ces individus sera plus élevée dans les classes d'âge plus âgées. De ce fait un effet de l'âge sera lié à la qualité des individus (qui ont de meilleurs gènes ou un meilleur accès aux ressources). D'autres mécanismes purement individuels peuvent expliquer un effet véritable de l'âge : la maturation, l'investissement terminal et la sénescence. La maturation correspond à une amélioration des performances reproductrices lorsque l'âge est associé à une amélioration physiologique (maturation développementale), morphologique (augmentation de la taille) ou comportementale (apprentissage, connaissance des sites de reproduction, du partenaire, meilleur fourrageage, changement de statut social...) (Forslund & Pärt 1995). L'hypothèse d'investissement terminal ou de valeur reproductive résiduelle émerge de la théorie des traits d'histoire de vie et prédit que l'effort reproducteur doit être augmenté quand la valeur

reproductive résiduelle diminue (augmentation de l'âge) pour maximiser le succès reproducteur total (Sydeman et al. 1991; Stearns 1992). Finalement, la sénescence provient d'une détérioration physiologique des vieux individus, ce qui peut amener une augmentation de leur taux de mortalité ou/et une détérioration de la reproduction (Orell & Belda 2002; Bryant & Reznick 2004). Outre la détérioration physiologique, le déclin des performances reproductrices avec l'âge peut être dû à des gamètes davantage susceptibles de porter des anomalies génétiques (Hook 1981) ou à une allocation réduite de l'énergie dans la reproduction (Rockwell et al. 1993). Les effets de l'âge sur la reproduction peuvent donc être des effets génétiques ou non génétiques.

Ces différents effets de l'âge maternel peuvent amener à des effets sur le phénotype des petits-enfants. Une étude pionnière réalisée par MacKay et Wellington (1976) a ainsi montré l'influence de l'âge grand-maternel et de l'environnement social (densité) sur la production de pucerons au phénotype ailé. Mais peu d'autres travaux ont été réalisés depuis cette étude. En médecine humaine, il a été montré que l'âge grand-maternel est un facteur de risque pour certaines trisomies (Malini & Ramachandra 2006). En laboratoire, des études sur la drosophile ont aussi mis en évidence l'influence de l'âge grand-maternel sur la viabilité des jeunes (Hercus & Hoffmann 2000), l'instabilité développementale (en particulier la forme des ailes) en fonction de la température (Røgilds et al. 2005; Faurby et al. 2005; Kjarsgaard et al. 2007) et le déclin des capacités de mémorisation à court terme (Burns & Mery 2010).

Outre la rareté de ces études, aucune étude, à ma connaissance, a testé un effet de l'âge grand-maternel sur le phénotype des petits-enfants chez un squamate, ni même sur une espèce sauvage suivie dans son milieu naturel. J'ai donc décidé d'étudier ce problème chez le lézard vivipare où une étude récente a mis en évidence des effets diversifiés de l'âge maternel sur les performances de reproduction (Massot et al. 2011). L'utilisation de données longitudinales (mesures répétées pour une même femelle) lors de cette étude a permis de montrer l'existence conjointe de processus de maturation, d'investissement terminal et de sénescence.

#### b. Tests des effets de l'âge grand-maternel chez le lézard vivipare

- Jeu de données

J'ai utilisé les données du suivi long terme qui a précédemment servi à la caractérisation des variations d'âge chez le lézard vivipare (Massot et al. 2011). Ce jeu de données m'a permis de connaître les lignées maternelles, les performances reproductrices (taille et succès

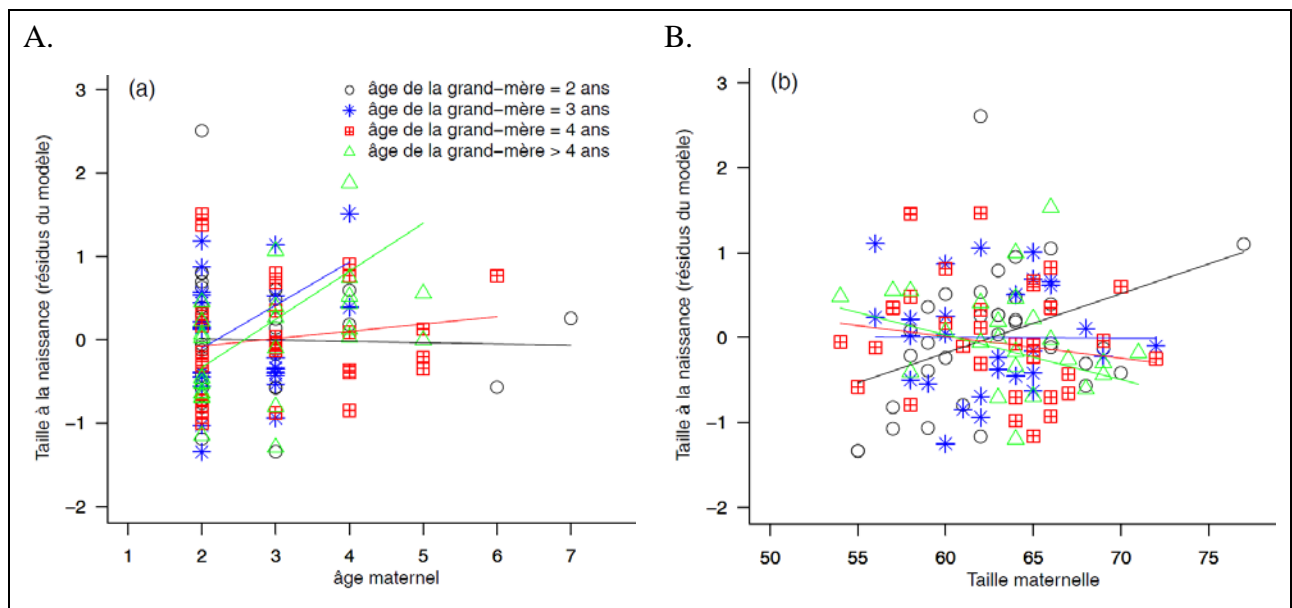
des portées) et le phénotype des jeunes à la naissance (taille, poids, sexe). Les données correspondent à 135 portées issues de grand-mères et de mères âgées entre 2 et 8 ans et de 580 petits-enfants (300 mâles et 280 femelles) nés entre 1992 et 2004. De plus, nous connaissons la reproduction à 2 ans (première reproduction) de 22 petites-filles. Cette étude est basée sur une comparaison transversale de l'effet de l'âge car les données n'étaient pas suffisantes pour réaliser une étude longitudinale. J'ai testé l'influence de l'âge grand-maternel sur la taille et la corpulence des petits-enfants à la naissance. En cohérence avec l'étude précédente (Massot et al. 2011), j'ai choisi de faire les analyses sur les moyennes par sexe pour chaque portée afin d'éviter la non-indépendance des données au sein d'une portée. J'ai sélectionné le meilleur modèle linéaire mixte suite à la sélection d'un modèle complet comprenant comme variable : âge de la grand-mère (effet simple et quadratique), âge de la mère (effet simple et quadratique), taille de la mère, fécondité résiduelle de la mère (taille de portée corrigée par la taille), zone de capture de la mère (voir **annexe 2**), et les interactions simples avec l'âge de la mère et de la grand-mère. Le modèle comprenait également l'année de reproduction de la mère en effet aléatoire. J'ai aussi étudié les effets grand-maternels sur la reproduction de leur petites filles : taille de portée et succès de la portée. Dans ce cas là, les modèles comprenaient également la taille de la petite-fille, et l'effet aléatoire était l'année de reproduction de la petite-fille. Le succès de la portée est une variable binomiale : succès total (tous les jeunes sont vivants) ou présence d'au moins un échec dans la portée ; et fut donc analysé avec une régression logistique.

La survie a été analysée à l'aide du logiciel Mark et de tests LRT (likelihood ratio test). En raison du nombre important de paramètres et de la difficulté de les estimer, je me suis focalisée sur les taux de survie précoces (survie avant et pendant la première hibernation). Ces taux correspondent à la survie juvénile qui est la composante majeure de la valeur sélective chez le lézard vivipare (Le Galliard et al. 2010). Mes modèles ont estimé les taux de survie indépendamment des taux de capture et ont toujours inclus un effet cohorte (*i.e.* effet de l'année de naissance). Un effet groupe (âge de la grand-mère) additif ou en interaction a été ajouté sur les taux de survie et/ou sur les taux de capture. Le meilleur modèle a d'abord été sélectionné sur les taux de capture puis sur les taux de survie.

Par la suite, je vais présenter uniquement les résultats qui sont des effets grand-maternels, les effets maternels que j'ai trouvés ont déjà été décrits précédemment (Massot et al. 2011). Pour décrire les interactions, j'ai regroupé les grand-mères en 4 catégories : âge de 2 ans (41 femelles jeunes), âge de 3 ans (35 femelles), âge de 4 ans (32 femelles) et âge supérieur à 4 ans (27 femelles âgées).

- Caractéristiques morphologiques à la naissance des petits-enfants

Pour les mâles, la corpulence n'a pas été influencée par l'âge grand-maternel, AGM (effets simples et interactions :  $P > 0,10$ ), contrairement à leur taille. La taille des mâles à la naissance a en effet été influencée par l'AGM (effet quadratique :  $F_{1,97} = 4,75$  ;  $P = 0,032$ ), par l'AGM en interaction avec l'âge maternel ( $F_{1,97} = 5,79$  ;  $P = 0,018$ ), et par l'AGM en interaction avec la taille maternelle ( $F_{1,97} = 11,56$  ;  $P = 0,0010$ ). J'ai réalisé des tests partiels pour comprendre ces interactions (**figure 10**).



**Figure 10.** La taille des petits-enfants mâles (A.) en fonction de l'âge maternel et (B.) en fonction de la taille maternelle, selon l'âge grand-maternel (code couleur). J'ai représenté les résidus de la taille des petit-enfants calculés à partir du modèle statistique complet.

A. Pour les grands-mères de 2, 3 et 4 ans, la taille des petit-enfants mâles ne dépend pas significativement de l'âge maternel ( $P > 0,08$ ), par contre c'est le cas lorsque la grand-mère est âgée ( $F_{1,10} = 12,8971$  ;  $P = 0,0049$ ).

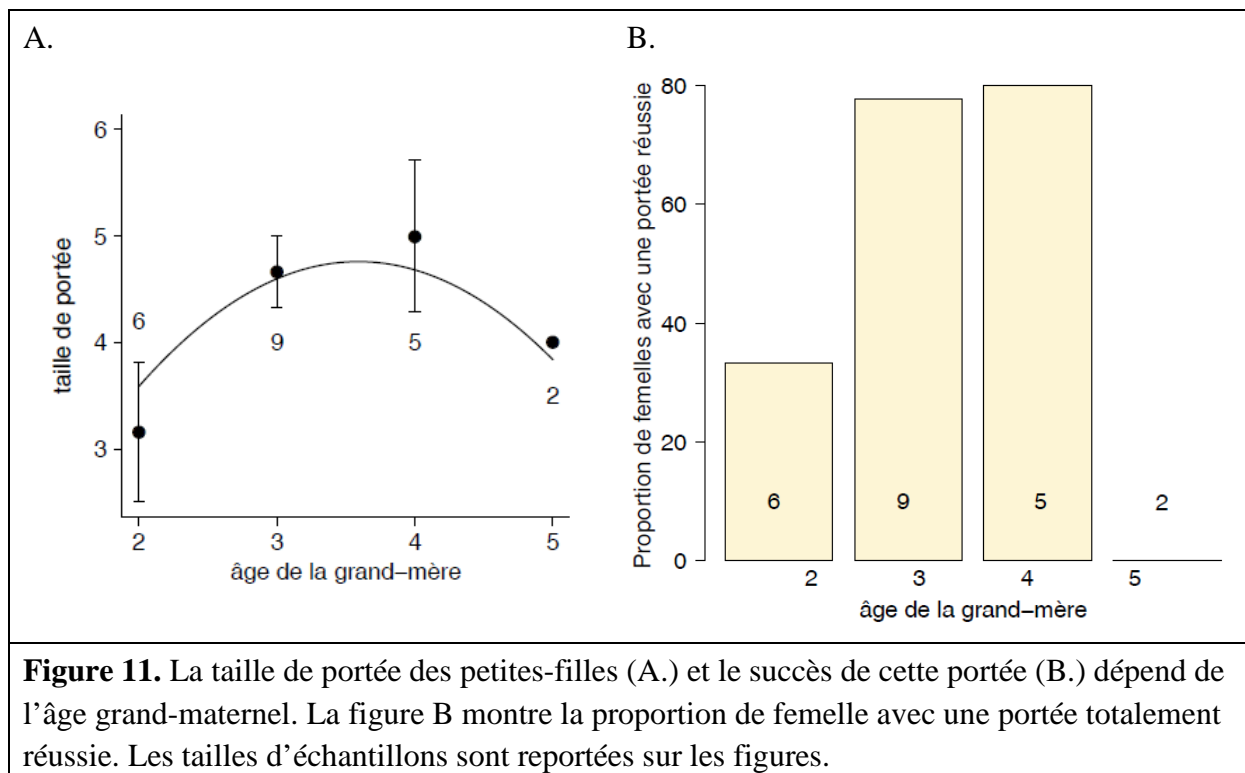
B. Pour les grand-mères de 3 ans et de 5 ans et plus, il n'y a pas d'effets significatifs de la taille maternelle ( $P > 0,15$ ). Il y a un effet positif pour les grand-mères de 2 ans ( $F_{1,19} = 9,52$  ;  $P = 0,0061$ ) et un effet négatif pour les grand-mères de 4 ans ( $F_{1,18} = 5,30$  ;  $P = 0,0335$ ).

Pour les jeunes femelles, les effets ont été différents. La taille des femelles dépendait en partie de l'interaction entre l'AGM et la fécondité résiduelle maternelle ( $F_{1,105} = 7,83$  ;  $P = 0,0061$ ). Il y a eu une relation négative avec la fécondité résiduelle maternelle uniquement quand la grand-mère était âgée ( $-0,50 \pm 0,16$  ;  $F_{1,10} = 9,53$  ;  $P = 0,0115$ ), sinon il n'y a pas eu d'effet ( $P > 0,48$  pour les grand-mères de 2 et 3 ans et  $P = 0,0949$  pour les grand-mères de 4 ans). Pour la corpulence des jeunes femelles, j'ai détecté un effet de l'AGM en interaction

avec la taille maternelle ( $F_{1,104} = 7,15$  ;  $P = 0,0087$ ). La corpulence était négativement corrélée à la taille de la mère quand la grand-mère avait 3 ans ( $-2,71 \pm 0,64$  ;  $F_{1,17} = 17,77$  ;  $P = 0,0006$ ) ou plus de 4 ans ( $-1,61 \pm 0,66$  ;  $F_{1,9} = 5,89$  ;  $P = 0,0381$ ) et positivement quand la grand-mère était jeune ( $1,66 \pm 0,64$  ;  $F_{1,24} = 6,71$  ;  $P = 0,0161$ ), mais il n'y a pas eu d'effet lorsque la grand-mère avait 4 ans ( $F_{1,12} = 0,29$  ;  $P = 0,5974$ ).

- Effets à long terme : survie des petits-enfants et reproduction des petites-filles

La survie des petits-enfants mâles et des petits-enfants femelles n'a pas été influencée par l'AGM ( $P > 0,13$ ). La taille de portée des petites-filles était corrélée à leur taille ( $F_{1,10} = 26,91$ ,  $P = 0,0004$ ) et à l'AGM (effet simple :  $F_{1,10} = 9,71$   $P = 0,0110$ , effet quadratique :  $F_{1,10} = 7,89$ ,  $P = 0,0185$ ) (**figure 11A**). Les mêmes effets de l'AGM ont été retrouvés pour le succès des portées (effet simple :  $\chi^2_{18} = 10,21$  ;  $P = 0,0014$ , effet quadratique :  $\chi^2_{18} = 11,24$  ;  $P = 0,0008$ ) (**figure 11B**).



- Conclusions

La nature transversale des données utilisées fait qu'on a une incertitude sur l'origine individuelle des mécanismes à l'origine des effets de l'âge grand-maternel. Néanmoins, le fait



que l'on retrouve des effets maternels décrits précédemment (Massot et al. 2011) supportent l'hypothèse que ces effets ne sont pas dus à des effets de sélection, mais qu'il s'agit plutôt d'effets de sénescence, d'investissement terminal ou de maturation. Un exemple de maturation et de sénescence pourrait être l'observation que les petites-filles ont un succès reproducteur à la première reproduction plus faible quand leur grand-mère a 2 ans ou 5 ans. Un exemple d'investissement terminal serait que les grand-mères âgées produisent des petits-fils de plus grande taille quand leur mère est aussi âgée. S'il est clair qu'il y a une complexité liée aux variations d'âge chez le lézard vivipare, et comme trouvé précédemment (Massot et al. 2011), les nombreux effets grand-maternels mis en évidence témoignent tout aussi clairement de leur réalité.

Pour l'étude de la viviparité, il serait intéressant de comparer ces effets de l'âge grand-maternels (ou dans un premier temps maternel) entre des lézards issus de populations ovipares et vivipares. Il serait alors possible de tester si l'existence de coût de la gestation induit une sénescence plus rapide chez les femelles vivipares (Orell & Belda 2002; Massot et al. 2011) ou encore si les effets de l'âge sont plus marqués chez les femelles vivipares. Effectivement, pendant la gestation, les embryons sont plus longuement exposés aux changements physiologiques liés à l'âge.

#### **4.4. Synthèse**

J'ai mis en évidence un nouvel effet maternel pendant la gestation chez le lézard vivipare. La taille de portée pendant la gestation influence la croissance après la naissance dans certaines conditions. Les jeunes des portées de taille réduite sont alors des meilleurs compétiteurs au début de leur vie que les jeunes des portées de taille non réduite. Le compromis entre le nombre et la qualité des jeunes n'est donc pas seulement lié à l'investissement au cours de la vitellogenèse mais aussi à l'investissement durant la gestation. Par la suite, il serait intéressant de comprendre les mécanismes à l'origine de cet effet maternel et notamment s'il est dû à un transfert de minéraux ou d'hormones pendant la gestation.

Dans l'optique de cette compréhension des mécanismes des effets maternels, je me suis aussi consacrée à la mise au point d'une approche expérimentale novatrice. Cette approche est basée sur une adaptation du protocole de Panigel (1956) consistant à incuber *in vitro* des embryons vivipares. La mise au point technique n'est pas complètement aboutie, mais a déjà

permis d'obtenir des jeunes *in vitro* viables et d'apparences normales. Il nous faut encore améliorer le taux de succès de cette technique avant de l'utiliser à des fins expérimentales. Les expériences possibles seront nombreuses et puissantes pour tester les facteurs à l'origine des effets maternels ou des interactions entre embryons *in utero*.

Finalement, je me suis aussi intéressée aux effets de l'âge grand-maternel sur les caractéristiques à la naissance, la survie et la reproduction des petits-enfants. Cette étude a montré des effets multiples qui peuvent correspondre à des effets de maturation, de sénescence ou d'investissement terminal. Plus largement, l'ensemble de mes résultats montrent l'importance des effets maternels et ce jusque leurs effets à long terme sur plusieurs générations.



## Chapitre 5. Conclusions

### *5.1. Chez le lézard vivipare et les squamates*

Cette étude a montré l'existence de certains coûts de la gestation. L'effort pendant la gestation est corrélé, dans certains cas, à un changement du comportement de thermorégulation, à une baisse des capacités d'endurance, à une baisse de la corpulence après la mise bas, à une baisse de la capacité à monter une réponse inflammatoire et aussi à une baisse de la croissance des jeunes. Ces études n'ont pas mis en évidence d'effets sur la survie des femelles après la mise bas. Par ailleurs, on s'attend à observer une baisse de la fécondité future des femelles (liée à la baisse de corpulence après la mise bas). Pour clarifier les effets sur la survie, il serait intéressant de suivre les animaux plus longtemps (effet de la gestation sur la longévité ?) et aussi pendant la période de gestation elle-même. Effectivement, c'est peut-être à ce moment là que la mortalité est la plus élevée pour les femelles et des études sur le terrain pendant la gestation sont donc nécessaires pour le déterminer. Par ailleurs, certains avantages théoriques de la viviparité qui pourraient contrebalancer ces coûts n'ont pas été mis en évidence. L'ajustement de l'investissement dans la reproduction (taille de portée, masse de portée, masse des jeunes) semble faible après l'ovulation (pendant la période de gestation) : l'ajustement de la taille de portée est peut-être impossible et l'ajustement de la masse des jeunes est limité. Le compromis entre la taille et le nombre de jeunes est expliqué par l'investissement pendant la vitellogenèse et semble peu flexible après ovulation. Donc l'augmentation des coûts de la reproduction ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'ajustement reproducteur. Cela n'est pas nécessaire pour contrebalancer les coûts et nécessite peut-être des adaptations qui sont contraintes phylogénétiquement. Cependant d'autres avantages peuvent être importants. La comparaison des femelles ovipares et vivipares a montré que la dynamique des coûts de la reproduction est différente selon le mode de reproduction. Les femelles ovipares ont un coût de début de la reproduction plus élevé que les femelles vivipares. Ce coût plus élevé peut correspondre à un investissement des femelles ovipares lors de la sécrétion des coquilles de leurs œufs. En tout cas, les femelles vivipares payent moins de coûts sur certains aspects de la reproduction. Si les femelles vivipares peuvent compenser les coûts de la gestation du fait de l'existence de coûts plus faibles au début de l'épisode reproducteur, le mode de reproduction vivipare peut être globalement associé à des coûts similaires que le mode de reproduction ovipare. L'existence d'effets

maternels pendant la gestation est aussi un avantage de la viviparité bien connu, mais les études sur leurs mécanismes sous-jacents sont rares. L'utilisation d'une méthode d'incubations *in vitro* des embryons de lézards vivipares nous permettra d'étudier précisément les facteurs impliqués dans ces effets maternels. Par exemple, il serait intéressant de connaître le mécanisme de l'effet maternel mis en évidence pendant la gestation sur la croissance des jeunes.

L'origine récente de la viviparité chez notre espèce est une caractéristique qui nous a permis une comparaison fine des deux modes de reproduction. Cependant, cet aspect peut aussi être corrélé à l'absence de certains ajustements post-ovulatoires que nous avons testés. Chez les squamates, il existe aussi des évolutions plus anciennes de la viviparité et plusieurs complexités de placenta, en partie associées au mode de nutrition des jeunes (Stewart & Thompson 2000). Notre espèce est lécithotrophe avec un placenta de type I (terminologie de Stewart & Thompson 2000), comme la plupart des espèces de squamates vivipares. Cependant il existe quelques espèces qui ont des placentas plus complexes (types III et IV) et mêmes certaines qui sont matrotrophes (Stewart & Thompson 2000). Il serait intéressant de comparer nos résultats avec des espèces ayant différentes caractéristiques. Pour l'instant il n'a pas été mis clairement en évidence la possibilité de modifier (diminuer) la taille de portée après ovulation chez un squamate (Blackburn 1998). Cependant, les différents types de placenta et de mode de nutrition des jeunes pourraient avoir des conséquences sur les effets de la taille de portée sur les coûts de la gestation et les effets maternels. De plus, une connaissance plus fine des coûts de la gestation entre des espèces contrastées nous permettra de mieux évaluer les différentes balances entre coûts et bénéfices, et ainsi de comprendre, si c'est le cas, les différentes pressions de sélection à l'origine des multiples évolutions indépendantes de la viviparité chez les squamates. Finalement, les espèces de squamates vivipares matrotrophes permettent de faire des comparaisons plus directes avec l'autre groupe important d'espèces vivipares, les mammifères, et offrent aussi la possibilité d'étudier l'évolution des différents modes d'apport en nutriments aux jeunes (lécithotrophie et matrotrophie).

## **5.2. Perspectives**

Mon étude offre aussi de nouvelles perspectives. Quand le taux de succès de la méthode d'incubation d'œufs vivipares sera élevé, on pourra certes étudier directement les mécanismes des effets maternels, mais aussi mieux comprendre les différentes contraintes liées à

l'évolution de la viviparité. Par exemple l'évolution du sex-ratio est certainement contrainte chez les espèces vivipares à cause de l'exposition des embryons aux sécrétions hormonales des autres embryons de la portée (Uller 2003, 2006). Chez le lézard vivipare, une étude corrélative a mis en évidence des effets du sex-ratio de la portée sur le phénotype des jeunes (Uller et al. 2004). Cependant une étude sur des œufs ovipares du lézard vivipare, a aussi montré un effet du sex-ratio de la ponte à la naissance (Braña 2008). Il serait donc pertinent de tester si les « œufs » vivipares, qui ont une coquille fine, sont plus sensibles au sex-ratio que les œufs ovipares, qui ont une coquille épaisse (10 fois plus épaisse) et calcifiée (Heulin et al. 2005). Une incubation d'œufs ovipares et vivipares dans les mêmes conditions pourra répondre à cette question et déterminer si les œufs vivipares sont plus sensibles au sex-ratio pendant l'incubation. Cet exemple illustre les possibilités offertes pour déterminer les contraintes associées à l'évolution de la viviparité. D'autres facteurs, comme la sensibilité à la température moyenne d'incubation ou la sensibilité aux variations de températures pendant l'incubation, pourront être testés.

Un aspect de mon travail que je n'ai pas abordé est la tentative de mise au point d'une méthode de dosage d'anticorps dans le vitellus. La connaissance du système immunitaire des squamates est assez développée (Zimmerman et al. 2010), cependant les possibilités de transferts d'immunité à la génération suivante ne sont presque jamais étudiées. Le transfert d'anticorps via le vitellus, le placenta pendant la gestation ou le lait maternel pendant la lactation est un effet maternel très important et largement étudié chez les oiseaux et les mammifères (Boulinier & Staszewski 2008; Hasselquist & Nilsson 2009). J'ai tenté d'étudier le transfert d'anticorps pendant la gestation chez le lézard vivipare, mais des problèmes techniques ne m'ont pas permis de finaliser cette étude. J'espère que le développement d'anticorps spécifiques, qui est en cours chez notre espèce, nous offrira la possibilité de réaliser à nouveau cette expérience. Il serait intéressant de connaître l'investissement en anticorps dans le vitellus chez des femelles ovipares et vivipares et de connaître les possibilités de transfert d'anticorps pendant la gestation chez les vivipares ou pendant la période de rétention des œufs chez les ovipares. Effectivement, il est intéressant de savoir si certaines femelles ont la possibilité d'investir des anticorps à la fois pendant la vitellogenèse et pendant la gestation. De plus, une fois que des méthodes efficaces et répétables de dosages seront mises au point, je pense que les squamates sont des bons modèles pour tester la valeur adaptative des transferts d'anticorps. Sur les modèles mammifères et aviaires, il a été mis en évidence que le transfert d'anticorps a des effets positifs sur la valeur sélective des descendants : protection contre les infections quand le système immunitaire du jeune n'est pas

mature, éducation du système immunitaire du jeune. Cependant le transfert d'anticorps peut aussi avoir des effets négatifs s'il inhibe la réponse immunitaire du jeune (Hasselquist & Nilsson 2009). Des études sur d'autres groupes pourraient apporter des réponses complémentaires à cette question sur la valeur adaptative des transferts d'anticorps.

## Bibliographie

- Agrawal, A. A.** 2002. Herbivory and maternal effects: mechanisms and consequences of transgenerational induced plant resistance. *Ecology*, **83**, 3408-3415.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. & Sorci, G.** 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, **7**, 363-368.
- Andrews, R. M.** 2000. Evolution of viviparity in squamate reptiles (*Sceloporus* spp.): a variant of the cold-climate model. *Journal of Zoology*, **250**, 243-253.
- Andrews, R. M.** 2002. Low oxygen: a constraint on the evolution of viviparity in reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, **75**, 145-154.
- Angilletta, M. J. & Sears, M. W.** 2000. The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Functional Ecology*, **14**, 39-45.
- Ardia, D. R., Wasson, M. F. & Winkler, D. W.** 2006. Individual quality and food availability determine yolk and egg mass and egg composition in tree swallows *Tachycineta bicolor*. *Journal of Avian Biology*, **37**, 252-259.
- Arrayago, M.-J., Bea, A. & 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.
- Avery, R. A.** 1974. Storage lipids in the lizard *Lacerta vivipara*: a quantitative study. *Journal of Zoology*, **173**, 419-425.
- Avery, R. A.** 1975. Clutch size and reproductive effort in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. *Oecologia*, **19**, 165-170.
- Badyaev, A. V. & Uller, T.** 2009. Parental effects in ecology and evolution: mechanisms, processes and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 1169-1177.
- Bårdsen, B., Fauchald, P., Tveraa, T., Langeland, K. & Nieminen, M.** 2009. Experimental evidence of cost of lactation in a low risk environment for a long-lived mammal. *Oikos*, **118**, 837-852.
- Bauwens, D. & Thoen, C.** 1981. Escape tactics and vulnerability to predation associated with reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology*, **50**, 733-743.
- Bauwens, D. & Verheyen, R. F.** 1985. The timing of reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*: differences between individual females. *Journal of Herpetology*, **19**, 353-364.
- Bernardo, J.** 1991. Manipulating egg size to study maternal effects on offspring traits. *Trends in Ecology & Evolution*, **6**, 1-2.
- Bernardo, J.** 1996. Maternal effects in animal ecology. *Integrative and Comparative Biology*, **36**, 83-105.
- Beuchat, C. A.** 1988. Temperature effects during gestation in a viviparous lizard. *Journal of Thermal Biology*, **13**, 135-142.
- Birchard, G. F., Black, C. P., Schuett, G. W. & Black, V.** 1984. Influence of pregnancy on oxygen consumption, heart rate and hematology in the garter snake: implications for the "cost of reproduction" in live bearing reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **77**, 519-523.
- Blackburn, D. G.** 1994. Discrepant usage of the term ovoviviparity in the herpetological literature. *Herpetological Journal*, **4**, 65-72.



- Blackburn, D. G.** 1998. Resorption of oviductal eggs and embryos in squamate reptiles. *Herpetological Journal*, **8**, 65-71.
- Blackburn, D. G.** 1999. Viviparity and oviparity: evolution and reproductive strategies. In: *Encyclopedia of Reproduction*, Vol 4 (Ed. by E. Knobil & J. D. Neill), pp. 994-1003. London, UK: Academic Press.
- Blackburn, D. G.** 2006. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs*, **20**, 131-146.
- Blackburn, D. G., Kleis-San Francisco, S. & Callard, I. P.** 1998. Histology of abortive egg sites in the uterus of a viviparous, placentotrophic lizard, the skink *Chalcides chalcides*. *Journal of Morphology*, **235**, 97-108.
- Blackburn, D. G., Weaber, K. K., Stewart, J. R. & Thompson, M. B.** 2003. Do pregnant lizards resorb or abort inviable eggs and embryos? Morphological evidence from an Australian skink, *Pseudemoia pagenstecheri*. *Journal of Morphology*, **256**, 219-234.
- Bonnet, X., Bradshaw, D. & Shine, R.** 1998. Capital versus income breeding: an ectothermic perspective. *Oikos*, **83**, 333-342.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R. & Lourdais, O.** 1999. What is the appropriate timescale for measuring costs of reproduction in a "capital breeder" such as the asp viper? *Evolutionary Ecology*, **13**, 485-497.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R. & Lourdais, O.** 2001. Short-term versus long-term effects of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*, **92**, 297-308.
- Bonnet, X., Akoka, S., Shine, R. & Pourcelot, L.** 2008. Disappearance of eggs during gestation in a viviparous snake (*Vipera aspis*) detected using non-invasive techniques. *Acta Herpetologica*, **3**, 129-137.
- Booth, D. T., Thompson, M. B. & Herring, S.** 2000. How incubation temperature influences the physiology and growth of embryonic lizards. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, **170**, 269-276.
- Boulinier, T. & Staszewski, V.** 2008. Maternal transfer of antibodies: raising immunology issues. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 282-288.
- Bradshaw, S. D. & Bradshaw, F. J.** 2002. Arginine vasotocin: site and mode of action in the reptilian kidney. *General and Comparative Endocrinology*, **126**, 7-13.
- Brambell, F. W. R.** 1948. Prenatal mortality in mammals. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **23**, 370-407.
- Braña, F.** 2008. Sex of incubation neighbours influences hatchling sexual phenotypes in an oviparous lizard. *Oecologia*, **156**, 275-280.
- Braña, F. & Ji, X.** 2000. Influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance, and early growth of hatchling wall lizards (*Podarcis muralis*). *Journal of Experimental Zoology*, **286**, 422-433.
- Braña, F. & 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. & Shine, R.** 2009. Beyond size-number trade-offs: clutch size as a maternal effect. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 1097-1106.
- Bryant, M. J. & Reznick, D.** 2004. Comparative studies of senescence in natural populations of guppies. *The American Naturalist*, **163**, 55-68.

- Burness, G. P., McClelland, G. B., Wardrop, S. L. & Hochachka, P. W.** 2000. Effect of brood size manipulation on offspring physiology: an experiment with passerine birds. *Journal of Experimental Biology*, **203**, 3513-3520.
- Burns, J. G. & Mery, F.** 2010. Transgenerational memory effect of ageing in *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 678-686.
- Buzatto, B. A., Requena, G. S., Martins, E. G. & Machado, G.** 2007. Effects of maternal care on the lifetime reproductive success of females in a neotropical harvestman. *The Journal of Animal Ecology*, **76**, 937-945.
- Chiaraviglio, M.** 2006. The effects of reproductive condition on thermoregulation in the Argentina boa constrictor (*Boa constrictor occidentalis*) (Boidae). *Herpetological Monographs*, **20**, 172-177.
- Clutton-Brock, T. & Sheldon, B. C.** 2010. Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 562-573.
- Clutton-Brock, T. H., Guinness, F. E. & Albon, S. D.** 1983. The costs of reproduction to red deer hinds. *Journal of Animal Ecology*, **52**, 367-383.
- Clutton-Brock, T. H., Albon, S. D. & Guinness, F. E.** 1989. Fitness costs of gestation and lactation in wild mammals. *Nature*, **337**, 260-262.
- Conaway, C. H., Baskett, T. S. & Toll, J. E.** 1960. Embryo resorption in the swamp rabbit. *The Journal of Wildlife Management*, **24**, 197-202.
- Cox, R. M. & Calsbeek, R.** 2010. Severe costs of reproduction persist in *Anolis* lizards despite the evolution of a single-egg clutch. *Evolution*, **64**, 1321-1330.
- Cox, R. M., Parker, E. U., Cheney, D. M., Liebl, A. L., Martin, L. B. & Calsbeek, R.** 2010. Experimental evidence for physiological costs underlying the trade-off between reproduction and survival. *Functional Ecology*, **24**, 1262-1269.
- Crean, A. J. & Marshall, D. J.** 2009. Coping with environmental uncertainty: dynamic bet hedging as a maternal effect. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 1087-1096.
- Crews, D., Grassman, M. & Lindzey, J.** 1986. Behavioral facilitation of reproduction in sexual and unisexual whiptail lizards. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 9547-9550.
- Dauphin-Villemant, C. & Xavier, F.** 1986. Adrenal activity in the female *Lacerta vivipara* Jacquin: possible involvement in the success of gestation. In: *Endocrine Regulation as Adaptive Mechanisms to the Environment*, (Ed. by I. Assenmacher & J. Boissin), pp. 241-250. Paris, France: CNRS.
- De Marco, V. & Guillette, L. J.** 1992. Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovi*). *Journal of Experimental Zoology*, **262**, 383-390.
- DeNardo, D. F. & Autumn, K.** 2001. Effect of male presence on reproductive activity in captive female blood pythons, *Python curtus*. *Copeia*, **2001**, 1138-1141.
- Descamps, S., Boutin, S., McAdam, A. G., Berteaux, D. & Gaillard, J.-M.** 2009a. Survival costs of reproduction vary with age in North American red squirrels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, 1129-1135.
- Descamps, S., Gilchrist, H. G., Bêty, J., Buttler, E. I. & Forbes, M. R.** 2009b. Costs of reproduction in a long-lived bird: large clutch size is associated with low survival in the presence of a highly virulent disease. *Biology Letters*, **5**, 278-281.

- Dijkstra, C., Bult, A., Bijlsma, S., Daan, S., Meijer, T. & Zijlstra, M.** 1990. Brood size manipulations in the kestrel (*Falco tinnunculus*): effects on offspring and parent survival. *Journal of Animal Ecology*, **59**, 269-285.
- Doughty, P. & Shine, R.** 1997. Detecting life history trade-offs: measuring energy stores in “capital” breeders reveals costs of reproduction. *Oecologia*, **110**, 508-513.
- Downes, S. J. & Shine, R.** 1999. Do incubation-induced changes in a lizard’s phenotype influence its vulnerability to predators? *Oecologia*, **120**, 9-18.
- Dufaure, J. P. & Hubert, J.** 1961. Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Archives d’Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, **50**, 309-328.
- Dulvy, N. K. & Reynolds, J. D.** 1997. Evolutionary transitions among egg-laying, live-bearing and maternal inputs in sharks and rays. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **264**, 1309-1315.
- Ellers, J.** 1995. Fat and eggs: an alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*, **46**, 227-235.
- Faurby, S., Kjærsgaard, A., Pertoldi, C. & Loeschcke, V.** 2005. The effect of maternal and grandmaternal age in benign and high temperature environments. *Experimental Gerontology*, **40**, 988-996.
- Festa-Bianchet, M.** 1998. Condition-dependent reproductive success in bighorn ewes. *Ecology Letters*, **1**, 91-94.
- Festa-Bianchet, M., Gaillard, J. & Jorgenson, J. T.** 1998. Mass- and density-dependent reproductive success and reproductive costs in a capital breeder. *The American Naturalist*, **152**, 367-379.
- Fisher, R. A.** 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford, UK: Clarendon Press.
- Flatt, T.** 2011. Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, **46**, 369-375.
- Fligny, C., Hatia, S., Amireault, P., Mallet, J. & Côté, F.** 2009. Mammalian prenatal development: the influence of maternally derived molecules. *BioEssays*, **31**, 935-943.
- Forslund, P. & Pärt, T.** 1995. Age and reproduction in birds - hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution*, **10**, 374-378.
- Fox, C. W. & Savalli, U. M.** 1998. Inheritance of environmental variation in body size: superparasitism of seeds affects progeny and grandprogeny body size via a nongenetic maternal effect. *Evolution*, **52**, 172-182.
- Fox, C. W., Martin, J. D., Thakar, M. S. & Mousseau, T. A.** 1996. Clutch size manipulations in two seed beetles: consequences for progeny fitness. *Oecologia*, **108**, 88-94.
- French, S. S. & Moore, M. C.** 2008. Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *General and Comparative Endocrinology*, **155**, 148-156.
- French, S. S., DeNardo, D. F. & Moore, M. C.** 2007. Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? *The American Naturalist*, **170**, 79-89.
- Garratt, M., Vasilaki, A., Stockley, P., McArdle, F., Jackson, M. & Hurst, J. L.** 2011. Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **278**, 1098-1106.

- Gavaud, J.** 1983. Obligatory hibernation for completion of vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology*, **225**, 397-405.
- Gil, D., Leboucher, G., Lacroix, A., Cue, R. & Kreutzer, M.** 2004. Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. *Hormones and Behavior*, **45**, 64-70.
- Gil, D., Biard, C., Lacroix, A., Spottiswoode, C. N., Saino, N., Puerta, M. & Møller, A. P.** 2007. Evolution of yolk androgens in birds: development, coloniality, and sexual dichromatism. *The American Naturalist*, **169**, 802-819.
- Gliwicz, Z. M. & Guisande, C.** 1992. Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia*, **91**, 463-467.
- Golet, G. H., Irons, D. B. & Estes, J. A.** 1998. Survival costs of chick rearing in black-legged kittiwakes. *Journal of Animal Ecology*, **67**, 827-841.
- González-Suárez, M., Mugabo, M., Decencièrè, B., Perret, S., Claessen, D. & Le Galliard, J.-F.** 2011. Disentangling the effects of predator body size and prey density on prey consumption in a lizard. *Functional Ecology*, **25**, 158-165.
- Goodwin, N. B., Dulvy, N. K. & Reynolds, J. D.** 2002. Life-history correlates of the evolution of live bearing in fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **357**, 259-267.
- Gosling, L. M.** 1986. Selective abortion of entire litters in the coypu: adaptive control of offspring production in relation to quality and sex. *The American Naturalist*, **127**, 772-795.
- Groothuis, T. G. G. & Schwabl, H.** 2008. Hormone-mediated maternal effects in birds: mechanisms matter but what do we know of them? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **363**, 1647 -1661.
- Groothuis, T. G. G., Müller, W., von Engelhardt, N., Carere, C. & Eising, C.** 2005. Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **29**, 329-352.
- Guillette, L. J.** 1993. The evolution of viviparity in lizards. *Bioscience*, **43**, 742-751.
- Gustafsson, L., Nordling, D., Andersson, M. S., Sheldon, B. C. & Qvarnström, A.** 1994. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **346**, 323-331.
- Hafer, N., Ebil, S., Uller, T. & Pike, N.** 2011. Transgenerational effects of food availability on age at maturity and reproductive output in an asexual collembolan species. *Biology Letters*, **7**, 755-758.
- Hanssen, S. A., Hasselquist, D., Folstad, I. & Erikstad, K. E.** 2005. Cost of reproduction in a long-lived bird: incubation effort reduces immune function and future reproduction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 1039-1046.
- Hardy, I. C. W., Griffiths, N. T. & Godfray, H. C. J.** 1992. Clutch size in a parasitoid wasp: a manipulation experiment. *Journal of Animal Ecology*, **61**, 121-129.
- Hasselquist, D. & Nilsson, J. A.** 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 51-60.
- Henderson, M.** 1954. Foetal regression in rabbits; experimental studies of histolysis and phagocytosis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **142**, 88-112.

- Hercus, M. J. & Hoffmann, A. A.** 2000. Maternal and grandmaternal age influence offspring fitness in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **267**, 2105 -2110.
- Heulin, B.** 1987. Température diurne d'activité des mâles et des femelles de *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia*, **8**, 393-400.
- Heulin, B., Osenegg, K. & 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., Stewart, J. R., Surget-Groba, Y., Bellaud, P., Jouan, F., Lancien, G. & Deunff, J.** 2005. Development of the uterine shell glands during the preovulatory and early gestation periods in oviparous and viviparous *Lacerta vivipara*. *Journal of Morphology*, **266**, 80-93.
- Holbrook, G. L. & Schal, C.** 2004. Maternal investment affects offspring phenotypic plasticity in a viviparous cockroach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 5595 -5597.
- Hook, E. B.** 1981. Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstetrics & Gynecology*, **58**, 282-285.
- Horton, T. H. & Stetson, M. H.** 1992. Maternal transfer of photoperiodic information in rodents. *Animal Reproduction Science*, **30**, 29-44.
- Huey, R. B.** 1982. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In: *Biology of the reptilia*, Vol 12 (Ed. by C. Gans & F. H. Pough), pp. 25-91. New-York: Academic Press.
- Itonaga, K., Wapstra, E. & Jones, S. M.** 2011. Evidence for placental transfer of maternal corticosterone in a viviparous lizard. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **160**, 184-189.
- Ji, X., Lin, C.-X., Lin, L.-H., Qiu, Q.-B. & Du, Y.** 2007. Evolution of viviparity in warm-climate lizards: an experimental test of the maternal manipulation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 1037-1045.
- Jones, S. M. & Swain, R.** 2006. Placental transfer of <sup>3</sup>H-oleic acid in three species of viviparous lizards: A route for supplementation of embryonic fat bodies? *Herpetological Monographs*, **20**, 186-193.
- Kjarsgaard, A., Faurby, S., Holmandersen, D. H., Pertoldi, C., David, J. R. & Loeschcke, V.** 2007. Effects of temperature and maternal and grandmaternal age on wing shape in parthenogenetic *Drosophila mercatorum*. *Journal of Thermal Biology*, **32**, 59-65.
- Koivula, M., Koskela, E., Mappes, T. & Oksanen, T. A.** 2003. Cost of reproduction in the wild: manipulation of reproductive effort in the bank vole. *Ecology*, **84**, 398-405.
- Ladyman, M., Bonnet, X., Lourdais, O., Bradshaw, D. & Naulleau, G.** 2003. Gestation, thermoregulation, and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: evidence for fecundity-independent costs. *Physiological and Biochemical Zoology*, **76**, 497-510.
- Laloi, D., Richard, M., Lecomte, J., Massot, M. & Clobert, J.** 2004. Multiple paternity in clutches of common lizard *Lacerta vivipara*: data from microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **13**, 719-723.
- Landwer, A. J.** 1994. Manipulation of egg production reveals costs of reproduction in the tree lizard (*Urosaurus ornatus*). *Oecologia*, **100**, 243-249.

- Le Galliard, J.-F., Le Bris, M. & Clobert, J.** 2003. Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology*, **17**, 877-885.
- Le Galliard, J.-F., Clobert, J. & Ferrière, R.** 2004. Physical performance and darwinian fitness in lizards. *Nature*, **432**, 502-505.
- Le Galliard, J.-F., Marquis, O. & Massot, M.** 2010. Cohort variation, climate effects and population dynamics in a short-lived lizard. *Journal of Animal Ecology*, **79**, 1296-1307.
- Leips, J., Richardson, J. M. L., Rodd, F. H. & Travis, J.** 2009. Adaptive maternal adjustments of offspring size in response to conspecific density in two populations of the least killifish, *Heterandria formosa*. *Evolution*, **63**, 1341-1347.
- Li, H., Qu, Y.-F., Hu, R.-B. & Ji, X.** 2008. Evolution of viviparity in cold-climate lizards: testing the maternal manipulation hypothesis. *Evolutionary Ecology*, **23**, 777-790.
- Lin, C.-X., Zhang, L. & 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.
- Lindtke, D., Mayer, W. & Böhme, W.** 2010. Identification of a contact zone between oviparous and viviparous common lizards (*Zootoca vivipara*) in central Europe: reproductive strategies and natural hybridization. *Salamandra*, **46**, 73-82.
- Lombardi, J.** 1996. Postzygotic maternal influences and the maternal-embryonic relationship of viviparous fishes. *American Zoologist*, **36**, 106-115.
- Lourdais, O., Bonnet, X., Shine, R., Denardo, D., Naulleau, G. & Guillon, M.** 2002a. Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of a viviparous snake. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 470-479.
- Lourdais, O., Bonnet, X. & Doughty, P.** 2002b. Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal of Experimental Zoology*, **292**, 487-493.
- Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Guillon, M. & Naulleau, G.** 2004. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*, **104**, 551-560.
- Lourdais, O., Heulin, B. & 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.
- MacKay, P. A. & Wellington, W. G.** 1976. Maternal age as a source of variation in the ability of an aphid to produce dispersing forms. *Researches on Population Ecology*, **18**, 195-209.
- Maderson, P. F. A. & Bellairs, A. d'A.** 1962. Culture methods as an aid to experiment on reptile embryos. *Nature*, **195**, 401-402.
- Malini, S. S. & Ramachandra, N. B.** 2006. Influence of advanced age of maternal grandmothers on Down syndrome. *BMC Medical Genetics*, **7**, 4.
- Marquis, O., Massot, M. & Le Galliard, J.-F.** 2008. Intergenerational effects of climate generate cohort variation in lizard reproductive performance. *Ecology*, **89**, 2575-2583.
- Marshall, D. J. & Uller, T.** 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos*, **116**, 1957-1963.
- Massot, M. & Clobert, J.** 1995. Influence of maternal food availability on offspring dispersal. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**, 413-418.
- Massot, M. & Clobert, J.** 2000. Processes at the origin of similarities in dispersal behaviour among siblings. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 707-719.

- Massot, M., Clobert, J., Lorenzon, P. & Rossi, J.-M.** 2002. Condition-dependent dispersal and ontogeny of the dispersal behaviour: an experimental approach. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 253-261.
- Massot, M., Clobert, J., Montes-Poloni, L., Haussy, C., Cubo, J. & Meylan, S.** 2011. An integrative study of ageing in a wild population of common lizards. *Functional Ecology*, **25**, 848-858.
- Mathies, T. & Andrews, R. M.** 1997. Influence of pregnancy on the thermal biology of the lizard, *Sceloporus jarrovi*: why do pregnant females exhibit low body temperatures? *Functional Ecology*, **11**, 498-507.
- Mathies, T., Franklin, E. A. & Miller, L. A.** 2004. Proximate cues for ovarian recrudescence and ovulation in the brown treesnake (*Boiga irregularis*) under laboratory conditions. *Herpetological Review*, **35**, 46-49.
- Matthews, S. G., Owen, D., Banjanin, S. & Andrews, M. H.** 2002. Glucocorticoids, hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) development, and life after birth. *Endocrine Research*, **28**, 709-718.
- Maynard Smith, J.** 1958. The effects of temperature and of egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *Journal of Experimental Biology*, **35**, 832-842.
- Mendonça, M. T. & Crews, D.** 1990. Mating-induced ovarian recrudescence in the red-sided garter snake. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, **166**, 629-632.
- Metcalfe, N. B. & Monaghan, P.** 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 254-260.
- Metcalfe, N. B. & Monaghan, P.** 2003. Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology*, **38**, 935-940.
- Meylan, S. & Clobert, J.** 2005. Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. *Hormones and Behavior*, **48**, 44-52.
- Meylan, S., De Fraipont, M. & Clobert, J.** 2004. Maternal size and stress and offspring philopatry: an experimental study in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Ecoscience*, **11**, 125-129.
- Miles, D. B., Sinervo, B. & Frankino, W. A.** 2000. Reproductive burden, locomotor performance, and the cost of reproduction in free ranging lizards. *Evolution*, **54**, 1386-1395.
- Møller, A. P. & Haussy, C.** 2007. Fitness consequences of variation in natural antibodies and complement in the Barn Swallow *Hirundo rustica*. *Functional Ecology*, **21**, 363-371.
- Mousseau, T. A. & Fox, C. W.** 1998. *Maternal effects as adaptations*. Oxford University Press.
- Mousseau, T. A., Uller, T., Wapstra, E. & Badyaev, A. V.** 2009. Evolution of maternal effects: past and present. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 1035-1038.
- Mugabo, M., Marquis, O., Perret, S. & Le Galliard, J.-F.** 2011. Direct and socially-mediated effects of food availability late in life on life-history variation in a short-lived lizard. *Oecologia*, **166**, 949-960.
- Nakamura, O., Kudo, R., Aoki, H. & Watanabe, T.** 2006. IgM secretion and absorption in the materno-fetal interface of a viviparous teleost, *Neoditrema ransonneti* (Perciformes; Embiotocidae). *Developmental & Comparative Immunology*, **30**, 493-502.

- Naulleau, G. & Bonnet, X.** 1996. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. *Oecologia*, **107**, 301-306.
- Nilsson, J.-Å. & Svensson, E.** 1996. The cost of reproduction: a new link between current reproductive effort and future reproductive success. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **263**, 711-714.
- Oksanen, T. A., Koskela, E. & Mappes, T.** 2002. Hormonal manipulation of offspring number: maternal effort and reproductive costs. *Evolution*, **56**, 1530-1537.
- Oksanen, T. A., Koivula, M., Koskela, E. & Mappes, T.** 2007. The cost of reproduction induced by body size at birth and breeding density. *Evolution*, **61**, 2822-2831.
- Olsson, M., Shine, R. & Bak-Olsson, E.** 2000. Locomotor impairment of gravid lizards: is the burden physical or physiological? *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 263-268.
- Orell, M. & Belda, E. J.** 2002. Delayed cost of reproduction and senescence in the willow tit *Parus montanus*. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 55-64.
- Packard, G. C., Tracy, C. R. & Roth, J. J.** 1977. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, and the evolution of viviparity within the class Reptilia. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **52**, 71-105.
- Painter, D., Jennings, D. H. & Moore, M. C.** 2002. Placental buffering of maternal steroid hormone effects on fetal and yolk hormone levels: a comparative study of a viviparous lizard, *Sceloporus jarrovi*, and an oviparous lizard, *Sceloporus graciosus*. *General and Comparative Endocrinology*, **127**, 105-116.
- 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, Zoologie (XI)*, **18**, 569-668.
- Patel, J., Landers, K., Li, H., Mortimer, R. H. & Richard, K.** 2011. Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **22**, 164-170.
- Pollux, B. J. A. & Reznick, D. N.** 2011. Matrotrophy limits a female's ability to adaptively adjust offspring size and fecundity in fluctuating environments. *Functional Ecology*, **25**, 747-756.
- Qualls, C. P. & 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.** 1995. Maternal body-volume as a constraint on reproductive output in lizards: evidence from the evolution of viviparity. *Oecologia*, **103**, 73-78.
- Qualls, F. J. & Shine, R.** 1997. Geographic variation in "costs of reproduction" in the scincid lizard *Lampropholis guichenoti*. *Functional Ecology*, **11**, 757-763.
- Qualls, C. P. & Shine, R.** 1998a. *Lerista bougainvillii*, a case study for the evolution of viviparity in reptiles. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 63-78.
- Qualls, C. P. & Shine, R.** 1998b. Costs of reproduction in conspecific oviparous and viviparous lizards, *Lerista bougainvillii*. *Oikos*, **82**, 539-551.
- Radder, R. S., Elphick, M. J., Warner, D. A., Pike, D. A. & Shine, R.** 2008. Reproductive modes in lizards: measuring fitness consequences of the duration of uterine retention of eggs. *Functional Ecology*, **22**, 332-339.
- Reading, C. J.** 2004. The influence of body condition and prey availability on female breeding success in the smooth snake (*Coronella austriaca Laurenti*). *Journal of Zoology*, **264**, 61-67.



- Reznick, D., Callahan, H. & Llauredo, R.** 1996. Maternal effects on offspring quality in poeciliid fishes. *American Zoologist*, **36**, 147-156.
- Robert, K. A. & Thompson, M. B.** 2001. Sex determination: viviparous lizard selects sex of embryos. *Nature*, **412**, 698-699.
- Rockwell, R. F., Cooch, E. G., Thompson, C. B. & Cooke, F.** 1993. Age and reproductive success in female lesser snow geese: experience, senescence and the cost of philopatry. *Journal of Animal Ecology*, **62**, 323-333.
- Rodríguez-Díaz, T. & Braña, 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., González, F., Ji, X. & Braña, F.** 2010. Effects of incubation temperature on hatchling phenotypes in an oviparous lizard with prolonged egg retention: are the two main hypotheses on the evolution of viviparity compatible? *Zoology*, **113**, 33-38.
- Roff, D. A.** 2002. *Life history evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Røglids, A., Andersen, D. H., Pertoldi, C., Dimitrov, K. & Loeschcke, V.** 2005. Maternal and grandmaternal age effects on developmental instability and wing size in parthenogenetic *Drosophila mercatorum*. *Biogerontology*, **6**, 61-69.
- Russell, A. F., Langmore, N. E., Cockburn, A., Astheimer, L. B. & Kilner, R. M.** 2007. Reduced egg investment can conceal helper effects in cooperatively breeding birds. *Science*, **317**, 941-944.
- Schwarzkopf, L. & Shine, R.** 1992. Costs of reproduction in lizards: escape tactics and susceptibility to predation. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **31**, 17-25.
- Sheldon, B. C.** 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 397-402.
- Shine, R.** 1983. Reptilian viviparity in cold climates: testing the assumptions of an evolutionary hypothesis. *Oecologia*, **57**, 397-405.
- 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.** 2004. Does viviparity evolve in cold climate reptiles because pregnant females maintain stable (not high) body temperatures? *Evolution*, **58**, 1809-1818.
- Shine, R. & Downes, S. J.** 1999. Can pregnant lizards adjust their offspring phenotypes to environmental conditions? *Oecologia*, **119**, 1-8.
- Shine, R. & Harlow, P.** 1993. Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia*, **96**, 122-127.
- Sinervo, B. & Huey, R. B.** 1990. Allometric engineering: an experimental test of the causes of interpopulational differences in performance. *Science*, **248**, 1106-1109.
- Sinervo, B., Hedges, R. & Adolph, S. C.** 1991. Decreased sprint speed as a cost of reproduction in the lizard *Sceloporus occidentalis*: variation among populations. *Journal of Experimental Biology*, **155**, 323-336.
- Sinervo, B., Zamudio, K., Doughty, P. & Huey, R. B.** 1992. Allometric engineering: a causal analysis of natural selection on offspring size. *Science*, **258**, 1927-1930.
- Smith, S. A. & Shine, R.** 1997. Intraspecific variation in reproductive mode within the Scincid lizard *Saiphos equalis*. *Australian Journal of Zoology*, **45**, 435-445.

- Sorci, G., Massot, M. & Clobert, J.** 1994. Maternal parasite load increases sprint speed and philopatry in female offspring of the common lizard. *The American Naturalist*, **144**, 153-164.
- Stearns, S. C.** 1992. *The evolution of life histories*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Stephens, P. A., Boyd, I. L., McNamara, J. M. & Houston, A. I.** 2009. Capital breeding and income breeding: their meaning, measurement, and worth. *Ecology*, **90**, 2057-2067.
- Stewart, J. R.** 1992. Placental structure and nutritional provision to embryos in predominantly lecithotrophic viviparous reptiles. *American Zoologist*, **32**, 303-312.
- Stewart, J. R. & Thompson, M. B.** 2000. Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **127**, 411-431.
- Stewart, J. R., Ecy, 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**, 2520-2524.
- 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.
- Swain, R. & Jones, S. M.** 2000. Maternal effects associated with gestation conditions in a viviparous lizard, *Niveoscincus metallicus*. *Herpetological Monographs*, **14**, 432-440.
- Sydeaman, W. J., Huber, H. R., Emslie, S. D., Ribic, C. A. & Nur, N.** 1991. Age-specific weaning success of northern elephant seals in relation to previous breeding experience. *Ecology*, **72**, 2204-2217.
- Tinkle, D. W. & Gibbons, J. W.** 1977. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous Publications University of Michigan*, **154**, 1-55.
- Todrank, J., Heth, G. & Restrepo, D.** 2011. Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **278**, 1949-1955.
- Uller, T.** 2003. Viviparity as a constraint on sex-ratio evolution. *Evolution*, **57**, 927-931.
- Uller, T.** 2006. Sex-specific sibling interactions and offspring fitness in vertebrates: patterns and implications for maternal sex ratios. *Biological Reviews*, **81**, 207-217.
- Uller, T. & Olsson, M.** 2003. Prenatal exposure to testosterone increases ectoparasite susceptibility in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**, 1867-1870.
- Uller, T. & Olsson, M.** 2006. Direct exposure to corticosterone during embryonic development influences behaviour in an ovoviviparous lizard. *Ethology*, **112**, 390-397.
- Uller, T., Massot, M., Richard, M., Lecomte, J. & Clobert, J.** 2004. Long-lasting fitness consequences of prenatal sex ratio in a viviparous lizard. *Evolution*, **58**, 2511-2516.
- Van Damme, R., Bauwens, D. & Verheyen, R. F.** 1989. Effect of relative clutch mass on sprint speed in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Herpetology*, **23**, 459-461.
- Van Damme, R., Bauwens, D. & Verheyen, R. F.** 1991. The thermal dependence of feeding behavior, food consumption and gut passage time in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. *Functional Ecology*, **5**, 507-517.
- van Noordwijk, A. J. & de Jong, G.** 1986. Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *The American Naturalist*, **128**, 137-142.

- Vinkler, M., Bainová, H. & Albrecht, T.** 2010. Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Functional Ecology*, **24**, 1081-1086.
- Visser, M. E. & Lessells, C. M.** 2001. The costs of egg production and incubation in great tits (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **268**, 1271-1277.
- Wake, M. H.** 1993. Evolution of oviductal gestation in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, **266**, 394-413.
- Wapstra, E.** 2000. Maternal basking opportunity affects juvenile phenotype in a viviparous lizard. *Functional Ecology*, **14**, 345-352.
- Wapstra, E., Olsson, M., Shine, R., Edwards, A., Swain, R. & Joss, J. M. P.** 2004. Maternal basking behaviour determines offspring sex in a viviparous reptile. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **271**, S230-S232.
- Wapstra, E., Uller, T., While, G. M., Olsson, M. & 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.** 2004. Pregnancy decreases swimming performance of female northern death adders (*Acanthopis praelongus*). *Copeia*, **2004**, 357-363.
- Webb, J. K., Shine, R. & Christian, K. A.** 2006. The adaptive significance of reptilian viviparity in the tropics: testing the maternal manipulation hypothesis. *Evolution*, **60**, 115-122.
- Wessels, F. J., Jordan, D. C. & Hahn, D. A.** 2010. Allocation from capital and income sources to reproduction shift from first to second clutch in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, **56**, 1269-1274.
- Westlin, L. M., Soley, J. T., van der Merwe, N. J. & van Dyk, Y. J.** 1995. Late fetal development and selective resorption in *Saccostomus campestris* (cricetidae). *Reproduction, Fertility and Development*, **7**, 1177-1184.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J. R. & Verhulst, S.** 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **271**, S360-S363.
- Williams, G. C.** 1966. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*, **100**, 687-690.
- Xavier, F.** 1982. Progesterone in the viviparous lizard *Lacerta vivipara*: ovarian biosynthesis, plasma levels, and binding to transcortin-type protein during the sexual cycle. *Herpetologica*, **38**, 62-70.
- Yan, X.-F., Tang, X.-L., Yue, F., Zhang, D.-J., Xin, Y., Wang, C. & Chen, Q.** 2011. Influence of ambient temperature on maternal thermoregulation and neonate phenotypes in a viviparous lizard, *Eremias multiocellata*, during the gestation period. *Journal of Thermal Biology*, **36**, 187-192.
- Zani, P. A., Neuhaus, R. A., Jones, T. D. & Milgrom, J. E.** 2008. Effects of reproductive burden on endurance performance in side-blotched lizards (*Uta stansburiana*). *Journal of Herpetology*, **42**, 76-81.
- Zera, A. J. & Harshman, L. G.** 2001. The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **32**, 95-126.
- Zhang, D.-J., Tang, X.-L., Yue, F., Chen, Z., Li, R.-D. & Chen, Q.** 2010. Effect of gestation temperature on sexual and morphological phenotypes of offspring in a viviparous lizard, *Eremias multiocellata*. *Journal of Thermal Biology*, **35**, 129-133.

- Zimmerman, L. M., Vogel, L. A. & Bowden, R. M.** 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 661-671.
- Zink, A. G.** 2003. Quantifying the costs and benefits of parental care in female treehoppers. *Behavioral Ecology*, **14**, 687 -693.



# **Annexe 1 : L'accouplement n'influence pas l'investissement dans la reproduction, chez un lézard vivipare**

## **Appendix 1: Mating does not influence reproductive investment, in a viviparous lizard**

Josefa Bleu<sup>1</sup>, Jean-François Le Galliard<sup>1,2</sup>, Sandrine Meylan<sup>1,3</sup>, Manuel Massot<sup>1</sup> & Patrick S. Fitze<sup>4,5,6</sup>

<sup>1</sup> CNRS ; UPMC ; ENS – UMR 7625, Laboratoire Ecologie et Evolution, 7 Quai St. Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>2</sup> CNRS ; ENS – UMS 3194, CEREEP – Ecotron IleDeFrance, École Normale Supérieure, 78 rue du Château, 77140 St-Pierre-lès-Nemours, France.

<sup>3</sup> IUFM de Paris – Université Sorbonne Paris IV, 10 rue molitor, 75016 Paris, France.

<sup>4</sup> Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC), Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, C/ José Gutiérrez Abascal 2, Madrid 28006, Spain.

<sup>5</sup> Instituto Pirenaico de Ecología (IPE-CSIC), Avenida Regimiento de Galicia s/n, 22700 Jaca, Spain.

<sup>6</sup> Université de Lausanne, Department of Ecology and Evolution (DEE), Biophore, 1015 Lausanne, Switzerland.

Running headline: mating and reproductive adjustments

**Article published** in Journal of Experimental Zoology Part A

# Mating Does Not Influence Reproductive Investment, in a Viviparous Lizard

JOSEFA BLEU<sup>1\*</sup>, JEAN-FRANÇOIS LE GALLIARD<sup>1,2</sup>,  
SANDRINE MEYLAN<sup>1,3</sup>, MANUEL MASSOT<sup>1</sup>,  
AND PATRICK S. FITZE<sup>4-6</sup>

<sup>1</sup>CNRS; UPMC; ENS-UMR 7625, Laboratoire Ecologie et Evolution, Paris, France

<sup>2</sup>CNRS; ENS-UMS 3194, CEREEP-Ecotron IleDeFrance, École Normale Supérieure, St-Pierre-lès-Nemours, France

<sup>3</sup>IUFM de Paris-Université Sorbonne Paris IV, Paris, France

<sup>4</sup>Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC), Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Instituto Pirenaico de Ecología (IPE-CSIC), Avenida Regimiento de Galicia s/n, Jaca, Spain

<sup>6</sup>Université de Lausanne, Department of Ecology and Evolution (DEE), Biophore, Lausanne, Switzerland



## ABSTRACT

Mating is crucial for females that reproduce exclusively sexually and should influence their investment into reproduction. Although reproductive adjustments in response to mate quality have been tested in a wide range of species, the effect of exposure to males and mating per se has seldom been studied. Compensatory mechanisms against the absence of mating may evolve more frequently in viviparous females, which pay higher direct costs of reproduction, due to gestation, than oviparous females. To test the existence of such mechanisms in a viviparous species, we experimentally manipulated the mating opportunity of viviparous female lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. We assessed the effect of mating on ovulation, postpartum body condition and parturition date, as well as on changes in locomotor performances and body temperatures during the breeding cycle. Female lizards ovulated spontaneously and mating had no influence on litter size, locomotor impairment or on selected body temperature. However, offspring production induced a more pronounced locomotor impairment and physical burden than the production of undeveloped eggs. Postpartum body condition and parturition dates were not different among females. This result suggests that gestation length is not determined by an embryonic signal. In the common lizard, viviparity is not associated with facultative ovulation and a control of litter size after ovulation, in response to the absence of mating. *J. Exp. Zool.* 315:458–464, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**How to cite this article:** Bleu J, Le Galliard J-F, Meylan S, Massot M, Fitze PS. 2011. Mating does not influence reproductive investment, in a viviparous lizard. *J. Exp. Zool.* 315:458–464.

*J. Exp. Zool.*  
315:458–464, 2011

Reproductive investment strategies involve trade-offs over resource allocation to number and quality of offspring versus self growth and maintenance; they are crucial determinants of female lifetime reproductive success (Roff, 2002). Mating is crucial for female fitness in species with exclusively sexual reproduction. Reproductive adjustments in response to mate quality, such as differential allocation, have been tested in a wide range of species (Sheldon, 2000; Harris and Uller, 2009). However, mating per se may be much more important for female fitness than mating with

Grant Sponsors: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Programa Ramón y Cajal; European Commission; Grant number: HPRN-CT-2000-00051; Grant Sponsor: Agence Nationale de la Recherche (ANR); Grant number: 07-JCJC-0120; Grant Sponsor: Spanish Ministry of Education and Science; Grant numbers: CGL2005-01187; CGL2008-01522; Grant Sponsor: Swiss National Science Foundation; Grant number: PPOOP3\_128375.

\*Correspondence to: Josefa Bleu, UMR 7625 Ecologie Et Evolution, Université Pierre et Marie Curie, Bat A-7ème étage-Case 237, 7 Quai St Bernard, 75252 Paris cedex 05, France. E-mail: josefa.bleu@snnv.jussieu.fr

Received 28 March 2011; Revised 19 May 2011; Accepted 23 May 2011  
Published online 5 July 2011 in Wiley Online Library (wileyonline library.com). DOI: 10.1002/jez.693

a better or a lower quality male. Surprisingly, the effect of exposure to males and mating per se has seldom been studied. Some species are spontaneous ovulators, whereas others are facultative ovulators that do not invest in reproduction at all when they are not stimulated by mating. Facultative ovulation is common in many mammals (for review see Kauffman and Rissman, 2006), but relevant data for squamate reptiles are scarce (for lizards, see Crews et al., '86; and for snakes, see Mendonça and Crews, '90; DeNardo and Autumn, 2001; Mathies et al., 2004).

An absence of mating may influence reproductive investment at different times in the reproductive cycle, depending on the reproductive mode. Viviparity (live-bearing) enables adaptive maternal manipulations of offspring phenotypes during gestation and facilitates postfertilization adjustments of reproductive effort (Bernardo, '96)—two key advantages that can favor this reproductive mode over oviparity (egg-laying). Evolutionary transitions from oviparity to viviparity have occurred more than 100 times and relatively recently in squamate reptiles (Blackburn, 2006). Contrary to mammals, in most viviparous squamate reptiles, mother–embryo exchange of organic nutrients is of reduced importance: females supply most of them directly into the egg yolk (lecithotrophy, Blackburn, '98a). Therefore, follicle and egg production requires almost comparable investment in oviparous and viviparous females. On the other hand, viviparous females retain their eggs for a longer period than oviparous females, and this long period of gestation is associated with significant locomotor and thermoregulatory costs (Olsson et al., 2000; Ladyman et al., 2003; Le Galliard et al., 2003; Shine, 2003; Lin et al., 2008). Viviparous females, therefore, pay a higher direct cost of reproduction than oviparous females. We, therefore, expect compensatory mechanisms against the absence of mating to evolve more frequently in viviparous females, including facultative ovulation but also adjustments of reproductive effort postovulation. Reproductive adjustments could indeed occur after ovulation through selective expulsion or resorption (as observed in mammals, Morton et al., '82).

We set up an experiment to test whether female common lizards *Lacerta (Zootoca) vivipara* are facultative ovulators and whether the expected postovulation adjustments exist. We manipulated mating opportunities in the laboratory and assessed the influence of the absence of mating on ovulation (number of eggs) as well as on changes in locomotor performances and behavior during the breeding cycle. Pregnant females select lower body temperatures during gestation, due to a trade-off between their optimal temperature and the one of their embryos, and have a lower endurance capacity (Le Galliard et al., 2003). Therefore, we measured the selected body temperature and endurance capacity once before the manipulation of mating opportunities and several times after this treatment, i.e., during gestation and once after parturition. We expected that unmated females would not ovulate if common lizards are facultative ovulators, or would produce smaller litters than mated females, if females can expel

or resorb some unfertilized eggs. We also expected stronger changes in locomotor performances and body temperatures in mated than in unmated females.

## MATERIAL AND METHODS

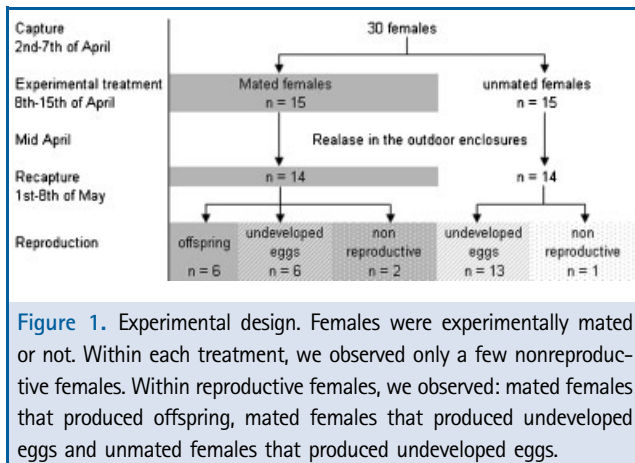
### Model Species

*L. vivipara* is a small (50–70 mm adult snout-vent length, SVL) ground-dwelling lizard widely distributed across Eurasia. We studied a viviparous strain originating from natural populations of the Massif Central mountain range (South-eastern France) maintained before hibernation in outdoor enclosures at our field station (CEREPP, 48°17'N, 2°41'E, Central France). For females, mating occurs 0–3 days after hibernation, and reproductive investment (vitellogenesis) occurs on average during the first three weeks (Bauwens and Verheyen, '85). During gestation, a primitive chorioallantoic placenta allows respiratory, aqueous and mineral exchanges between mother and embryos (Panigel, '56; Stewart et al., 2009). Parturition occurs when embryos are fully developed, after an average gestation period of 2 months. The mean litter size is five (range from 1 to 12) including undeveloped eggs (fertilized or unfertilized eggs where only yolk is visible), stillborn and live offspring. Live offspring hatch immediately and are autonomous.

### Experimental Conditions

Adult females and males were maintained before hibernation in separate outdoor enclosures at our field station. Enclosures were surrounded by plastic walls to prevent lizards from escaping (see Fitze et al., 2008 for a description of field enclosures). The start of the mating period was determined in mixed-sex populations located in the same meadow. Once mating was detected in the mixed-sex populations, individuals were captured (from 2nd to 7th of April), weighed (to the nearest milligram), measured for SVL (to the nearest millimeter), and transferred to the laboratory for mating. Females and males were maintained in separate rooms during this period. Females ( $n = 30$ ) were randomly allocated to one of the two treatment groups: mated or unmated group (Fig. 1). Females of the two treatment groups did not differ in initial SVL ( $F_{1,28} = 0.11$ ,  $P = 0.74$ ) or body condition ( $F_{1,27} = 1.63$ ,  $P = 0.21$ , body mass with SVL as a covariate). Mating experiments were conducted from 8th to 15th of April following the protocol of Fitze et al. (2008, 2010): females were released into large boxes (2,500 cm<sup>2</sup>) and thereafter a randomly selected male was introduced. Mating trials were observed for 1 hr and males were removed after 1 hr or, if mating lasted longer, 5 min after the end of the copulation. Unmated females were handled in the same way as mated females, but no males were introduced in their box. After the mating experiments, females were released in their outdoor enclosures. They were recaptured during the first week of May and then maintained under standardized laboratory conditions until parturition (Le Galliard et al., 2003). Two females probably died in the





enclosures and were not recaptured (Fig. 1). Females were weighed every 4 days before parturition and once immediately after parturition. The authors attest the adherence to the *National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

#### Direct Costs of Reproduction and Investment in Reproduction

We assessed the costs of reproduction with indirect measures: endurance capacity, selected body temperature and postpartum body condition, and we assessed the investment in reproduction with litter size and the mass loss during parturition. Endurance capacity was measured four times on average once every three weeks from the start of the experiment to 8 days after parturition (SD = 4.7 days). Endurance was calculated as the time spent running until exhaustion on a treadmill following the protocol of Le Galliard et al. (2003). Body temperature was measured for females housed individually in large terrariums (130 × 47 × 35 cm), using a K-thermocouple thermometer ( $\pm 0.2^\circ\text{C}$  accuracy) inserted into the cloaca every hour from 13:00 to 17:00 local time. The selected body temperature was assessed once before (14 days, SD = 5.29 days) and once after parturition (7 days, SD = 4.71 days), and was calculated as the mean of all measures. At parturition, the number of offspring or eggs was counted and females were weighed. We could not avoid the desiccation of the eggs and thus could not weigh them accurately. Instead we calculated the mass loss during parturition, defined as the difference between female body mass before and after parturition (females were weighed on average 4.5 days before parturition, SD = 3.0 days). This measure thus included the mass of the litter, embryonic annexes and water lost during parturition. A female was considered reproductive if she gave birth to offspring or laid eggs.

#### Statistical Analyses

Two females were not recaptured in May and thus could not be included in the analyses. The experiment resulted in nonreproductive females producing no eggs (2 mated and 1 unmated), unmated females producing undeveloped (unfertilized) eggs ( $n=13$ ), mated females producing offspring ( $n=6$ ), and mated females

producing undeveloped (unfertilized or fertilized) eggs ( $n=6$ , see Fig. 1). First, we analyzed differences between the experimental groups of mated ( $n=12$ ) and unmated females ( $n=13$ ). Because some mated females did not produce offspring (Fig. 1), we analyzed differences between the three groups of mated females that produced offspring ( $n=6$ ), mated females that produced undeveloped eggs ( $n=6$ ) and unmated females that produced undeveloped eggs ( $n=13$ ). Finally, we also tested the effect of producing offspring by comparing females that produced offspring ( $n=6$ ) and females that produced undeveloped eggs ( $n=19$ ). For the analyses of litter size, we excluded two females that produced undeveloped eggs (1 mated and 1 unmated) because their clustered eggs could not be counted. Repeated measures of endurance capacity (log-transformed to normalize the data) and mean selected body temperatures were analyzed with mixed-effects linear models for repeated measures in R 2.12.1 statistical software (<http://cran.r-project.org/>). Repeated measures were modeled with the *lme* procedure and with the compound symmetry covariance structure (Pinheiro and Bates, 2000). The covariance structure was selected from a list of variance-covariance models by the Akaike Index Criterion (AIC) (Pinheiro and Bates, 2000). The model included fixed effects of treatment, time and their interaction, and a random effect of subject identity. Mass loss during parturition, litter size and postpartum body mass were compared between groups using linear models and standard ANOVA tests (*lm* procedure) with female SVL as a covariate. Parturition dates were compared between groups using linear models and the *lm* procedure. In all cases, the assumptions of normality and homogeneity of variances were fulfilled. Results are presented as mean  $\pm$  standard error.

## RESULTS

### Reproductive Traits

There were no significant differences between treatments in the probability of being reproductive (Fisher's exact test,  $P=1$ ). Litter size was  $4.92 \pm 0.80$  for unmated females producing undeveloped eggs,  $3.40 \pm 0.51$  for mated females producing undeveloped eggs and  $6.50 \pm 1.23$  for mated females producing offspring. Litter sizes were not significantly different between the groups (Table 1). Mass loss during parturition was significantly different between females producing offspring and females producing undeveloped eggs (Table 1). Mass loss during parturition was on average  $54.9 \pm 8.8\%$  of postpartum body mass for females that produced offspring and only  $28.4 \pm 3.2\%$  for females that produced undeveloped eggs. Female postpartum body conditions (body mass statistically corrected for female SVL) and parturition dates did not significantly differ between groups (Table 1).

### Locomotor Performances and Basking Behavior

Repeated measures of endurance capacity indicated temporal changes during reproduction independent of the experimental

Table 1. Reproductive traits.			
	Experimental groups: effect of mating	Effect of offspring production	Effect of mating and offspring production
<b>Litter size</b>			
Treatment	$F_{1,20} = 0.05, P = 0.8260$	$F_{1,20} = 2.38, P = 0.1390$	$F_{2,19} = 2.53, P = 0.1059$
SVL	$F_{1,20} = 1.80, P = 0.1943$	$F_{1,20} = 1.61, P = 0.2188$	$F_{1,19} = 2.93, P = 0.1031$
<b>Mass loss during parturition</b>			
Treatment	$F_{1,22} = 1.15, P = 0.2949$	$F_{1,22} = 11.97, P = 0.0022$	$F_{2,21} = 6.28, P = 0.0073$
SVL	<u><math>F_{1,22} = 3.59, P = 0.0714</math></u>	<u><math>F_{1,22} = 4.27, P = 0.0507</math></u>	$F_{1,21} = 4.48, P = 0.0464$
<b>Postpartum body mass</b>			
Treatment	$F_{1,22} = 0.48, P = 0.4939$	$F_{1,22} < 0.01, P = 0.9790$	$F_{2,21} = 0.37, P = 0.6967$
SVL	$F_{1,22} = 13.97, P = 0.0011$	$F_{1,22} = 13.03, P = 0.0016$	$F_{1,21} = 13.29, P = 0.0015$
<b>Parturition date</b>			
Treatment	$F_{1,23} = 1.15, P = 0.2956$	$F_{1,23} < 0.01, P = 0.9976$	$F_{2,22} = 0.85, P = 0.4402$

We compared litter size, mass loss during parturition, postpartum body mass and parturition dates between different groups (see Fig. 1). First, we compared mated and unmated females to assess the effect of mating (experimental treatment). Second, we compared females that produced offspring and females that produced undeveloped eggs to assess the effect of offspring production, irrespective of the mating status. Finally, we compared mated females that produced offspring, mated females that produced undeveloped eggs and unmated females that produced undeveloped eggs to assess the effect of mating and of offspring production simultaneously. In models containing SVL, interactions between treatment and SVL were not significant ( $P > 0.42$ ). Significant results are in bold ( $P < 0.05$ ) and marginally significant results are underlined ( $P < 0.10$ ).

Table 2. Locomotor performances and thermoregulation.			
	Experimental groups: effect of mating	Effect of offspring production	Effect of mating and offspring production
<b>Endurance capacity</b>			
Treatment	$F_{1,23} = 0.23, P = 0.6383$	$F_{1,23} = 0.70, P = 0.4121$	$F_{2,22} = 0.34, P = 0.7181$
Time	$F_{3,64} = 11.42, P < 0.0001$	$F_{3,64} = 18.44, P < 0.0001$	$F_{3,61} = 12.32, P < 0.0001$
Time $\times$ Treatment	$F_{3,64} = 1.16, P = 0.3332$	$F_{3,64} = 3.60, P = 0.0180$	<u><math>F_{6,61} = 1.96, P = 0.0849</math></u>
<b>Body temperatures</b>			
Treatment	$F_{1,23} = 0.20, P = 0.6575$	$F_{1,23} = 1.81, P = 0.1912$	$F_{2,22} = 2.12, P = 0.1438$
Time	$F_{1,19} = 82.70, P < 0.0001$	$F_{1,19} = 115.87, P < 0.0001$	$F_{1,18} = 84.13, P < 0.0001$
Time $\times$ Treatment	$F_{1,19} = 0.06, P = 0.8137$	$F_{1,19} = 0.64, P = 0.4336$	$F_{2,18} = 0.74, P = 0.4903$

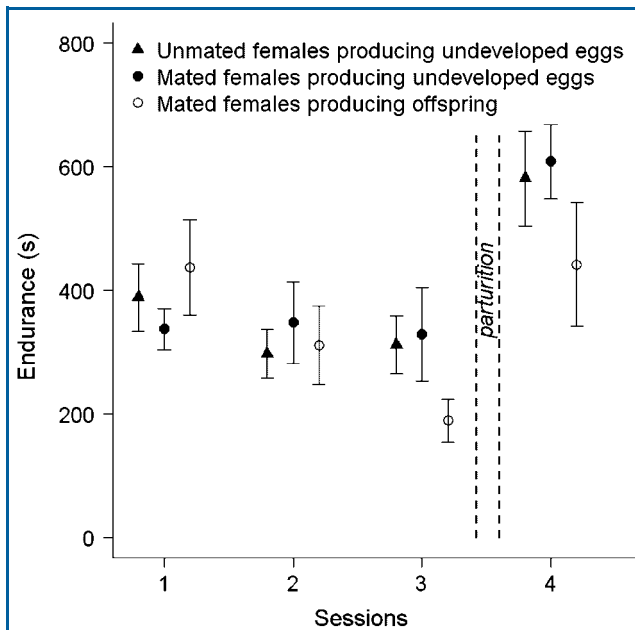
We compared repeated measures of endurance capacity and body temperatures between different groups (see Table 1 for more explanations). Models included a random effect of subject identity. Significant results are in bold ( $P < 0.05$ ) and marginally significant results are underlined ( $P < 0.10$ ).

treatment (Table 2). Endurance capacity decreased from the first to the third session of measure (contrast =  $-101.4 \pm 33.1$  sec,  $P = 0.0031$ , see Fig. 2), followed by a significant recovery after parturition (contrast =  $277.2 \pm 35.0$  sec,  $P < 0.0001$ ). There was an effect of offspring production, but not of mating, on the temporal changes in endurance capacity (Table 2). Females producing offspring showed a more pronounced locomotor impairment at the end of gestation (Fig. 2). Body temperature was only affected by the time of the measure (Table 2). Parturition was associated with a significant increase in selected body temperature ( $29.48 \pm 0.31^\circ\text{C}$  before versus  $33.26 \pm 0.28^\circ\text{C}$  after parturition,

Table 2). This shift in selected body temperatures was not dependent on mating or on offspring production.

## DISCUSSION

Our study showed that common lizards are spontaneous ovulators whose litter size is not influenced by the absence of mating. Reproductive costs associated with gestation were also independent of the mating treatment. Thus, in the common lizard, viviparity is not associated with facultative ovulation, and viviparity does not allow an effective control of litter size, after ovulation, in response to the absence of mating opportunities.



**Figure 2.** Locomotor impairment. Endurance capacity of females (mean running time  $\pm$  SE) during gestation (sessions 1, 2 and 3) and after parturition (session 4). Data are shown for unmated females producing undeveloped eggs ( $n = 13$ ), mated females producing undeveloped eggs ( $n = 6$ ) and mated females producing offspring ( $n = 6$ ).

The lack of compensatory mechanisms might be explained by the relative recentness with which viviparity has evolved in this species (i.e., 0.5–2 mybp according to Surget-Groba et al., 2001). However, offspring production induced a more pronounced locomotor impairment and physical burden of reproduction than the production of undeveloped eggs.

#### Reproduction in the Absence of Mating

Female lizards mate directly after emergence, and vitellogenesis, which is controlled by an endogenous cycle, starts shortly thereafter (Gavaud, '83). We observed that mating has no effect on the onset of vitellogenesis and on ovulation. In squamates, ovulation can be induced by mating or male presence (Crews et al., '86; Mendonça and Crews, '90; DeNardo and Autumn, 2001; Mathies et al., 2004). However, these data are not sufficient to understand the phylogenetic constraints and the ease with which induced ovulation can evolve in this group. In the common lizard, the investment in reproduction may be controlled by other factors and/or at a different time scale. For example, litter size may be influenced by female food consumption after hibernation (when vitellogenesis starts) and also by conditions experienced before vitellogenesis (e.g., Marquis et al., 2008). Common lizards are thought to use a mixed-strategy in which they fuel reproduction with both stored and recently acquired

resources (Avery, '75; Massot and Clobert, '95; Mugabo et al., 2011; Bleu et al., unpublished results). According to previous observations, litter size is a function of multiple mating (Fitze et al., 2005; Eizaguirre et al., 2007). Our study suggests that multiple mating is unlikely to affect follicle recruitment; however, it may increase fertilization success. Since we observed no difference in litter sizes between the different groups, we can conclude that females did not abort or resorb their unfertilized and undeveloped eggs. This finding is in line with the fact that, contrary to mammals, there is no clear-cut evidence in viviparous squamates, indicating that pregnant females are able to resorb unviable eggs and embryos from the uterus (Blackburn, '98b; Girling, 2002; Blackburn et al., 2003). However, it may occur in some particular species (Bonnet et al., 2008). That being said, we did not check for qualitative adjustments of the reproductive investment. It is possible that females did not invest the same amount of nutrients in their eggs, as observed in studies of differential allocation on egg mass (e.g., Uller et al., 2005), yolk hormonal content (e.g., Gil et al., 2004; Tschirren et al., 2004) or other compounds of the egg yolk (e.g. antioxidant, Williamson et al., 2006).

Unmated and mated females displayed similar reduced locomotor performances and selected lower body temperatures during gestation. These locomotor and behavioral changes during gestation are associated with a decrease in the ability to escape predators and to forage. Thus, both unmated and mated females may suffer from increased mortality costs in the field (Irschick et al., 2008; but see Bauwens and Thoen, '81). However, we also found that females carrying offspring compared to females producing undeveloped eggs had a stronger locomotor impairment during late gestation, probably due to their heavier litters. The weight of fertilized eggs, containing developing embryos, increases in the course of pregnancy, because a large amount of water accumulates in the eggs (Dufaure and Hubert, '61). Apparently, there was no such accumulation in undeveloped eggs. We found no significant difference in postpartum body condition. This result is important because the postpartum amount of resources of a female affects its future survival (Sorci et al., '96) and its subsequent investment in reproduction (capital breeding, Bleu et al., unpublished results). Altogether, our results, therefore, indicate that unmated female common lizards pay both the cost of missing a reproduction opportunity and most of the typical direct costs of reproduction. This double cost of not mating may generate a strong positive selection for insurance of fertilization, which may explain why females mate with multiple partners in this species (Laloi et al., 2004; Fitze et al., 2005; Uller and Olsson, 2005).

#### Implications of the Absence of Reproductive Adjustments

The risk of an absence of mating depends on factors such as age, body size and social conditions, in particular the population density (Massot et al., '92; Richard et al., 2005). *L. vivipara* population densities across Eurasia are highly variable and

densities can be very low in marginal habitats (e.g., Herczeg et al., 2003). Lizards used in this experiment were native from high-density populations where around 700 adults and yearlings co-occur within a ha of natural habitat (Massot et al., '92). In these populations, most of the 3 year old and older females are mated (Massot et al., 2011) and still they may produce litters of exclusively undeveloped eggs (2.7% in 1630 litters, Massot, pers. comm.). Thus, our experiment, which may be more representative of low-density populations, is still relevant in high-density populations. The inability of adjusting reproductive effort in response to mating could be an important demographic factor, especially in small populations, since it may increase local extinction risk. The inability of adjusting reproductive effort may also affect the colonization of new habitats, since newly founded populations show low densities and since unmated females paying the costs of reproductive investment may have reduced lifetime reproductive success. This drawback may become especially important since rapid habitat changes, e.g. induced by climate warming (Massot et al., 2008), may limit the colonization ability of the species.

Finally, this finding also has implications for the understanding of the evolution of viviparity. It has been suggested that the thin eggshell of viviparous eggs may allow exposure of the maternal uterus to chemical signals of embryonic origin (Guillette, '93). Embryonic signals may allow maternal recognition of pregnancy and may have played a role in the increase of egg retention length during transitions from oviparity to viviparity (Guillette, '93). The fact that undeveloped eggs were retained until normal parturition date suggests that there is no embryonic signal for maternal recognition of pregnancy, or at least that this signal does not determine gestation length. Maternal effects during pregnancy on offspring phenotypes have been demonstrated to exist in the common lizards (e.g., Massot and Clobert, '95; Meylan and Clobert, 2005). However, further studies are needed to clarify the existence and the role of embryonic signals on their mother.

## ACKNOWLEDGMENTS

Julien Cote kindly assisted with the mating experiments. Financial support was received from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche", the European Research Training Network ModLife (Modern Life-History Theory and its Application to the Management of Natural Resources) funded through the Human Potential Program of the European Commission (Contract HPRN-CT-2000-00051), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) grants (07-JCJC-0120) to J.F.L.G, the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2005-01187, CGL2008-01522, and Programa Ramón y Cajal to P.S.F.) and the Swiss National Science Foundation (PPOOP3\_128375 to P.S.F.).

## LITERATURE CITED

- Avery RA. 1975. Clutch size and reproductive effort in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. *Oecologia* 19:165–170.
- Bauwens D, Thoen C. 1981. Escape tactics and vulnerability to predation associated with reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*. *J Anim Ecol* 50:733–743.
- Bauwens D, Verheyen RF. 1985. The timing of reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*: differences between individual females. *J Herpetol* 19:353–364.
- Bernardo J. 1996. Maternal effects in animal ecology. *Am Zool* 36: 83–105.
- Blackburn DG. 1998a. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 282:560–617.
- Blackburn DG. 1998b. Resorption of oviductal eggs and embryos in squamate reptiles. *Herpetol J* 8:65–71.
- Blackburn DG. 2006. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetol Monogr* 20:131–146.
- Blackburn DG, Weaber KK, Stewart JR, Thompson MB. 2003. Do pregnant lizards resorb or abort inviable eggs and embryos? Morphological evidence from an Australian skink, *Pseudemoia pagenstecheri*. *J Morphol* 256:219–234.
- Bonnet X, Akoka S, Shine R, Pourcelot L. 2008. Disappearance of eggs during gestation in a viviparous snake (*Vipera aspis*) detected using non-invasive techniques. *Acta Herpetol* 3:129–137.
- Crews D, Grassman M, Lindzey J. 1986. Behavioral facilitation of reproduction in sexual and unisexual whiptail lizards. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9547–9550.
- DeNardo DF, Autumn K. 2001. Effect of male presence on reproductive activity in captive female blood pythons, *Python curtus*. *Copeia* 2001:1138–1141.
- Dufaure JP, Hubert J. 1961. Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Arch Anat Micros Morphol Exp* 50:309–328.
- Eizaguirre C, Laloï D, Massot M, Richard M, Federici P, Clobert J. 2007. Condition dependence of reproductive strategy and the benefits of polyandry in a viviparous lizard. *Proc R Soc B* 274:425–430.
- Fitze PS, Le Galliard J-F, Federici P, Richard M, Clobert J. 2005. Conflict over multiple-partner mating between males and females of the polygynandrous common lizards. *Evolution* 59:2451–2459.
- Fitze PS, Cote J, Martínez-Rica JP, Clobert J. 2008. Determinants of male fitness: disentangling intra- and inter-sexual selection. *J Evol Biol* 21:246–255.
- Fitze PS, Cote J, Clobert J. 2010. Mating order-dependent female mate choice in the polygynandrous common lizard *Lacerta vivipara*. *Oecologia* 162:331–341.
- Gavaud J. 1983. Obligatory hibernation for completion of vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 225: 397–406.
- Gil D, Leboucher G, Lacroix A, Cue R, Kreutzer M. 2004. Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. *Horm Behav* 45:64–70.

- Girling JE. 2002. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. *J Exp Zool* 293: 141–170.
- Guillette Jr LJ. 1993. The evolution of viviparity in lizards. *BioScience* 43:742–751.
- Harris WE, Uller T. 2009. Reproductive investment when mate quality varies: differential allocation versus reproductive compensation. *Phil Trans R Soc B* 364:1039–1048.
- Herczeg G, Kovács T, Hettyey A, Merilä J. 2003. To thermoconform or thermoregulate? An assessment of thermoregulation opportunities for the lizard *Zootoca vivipara* in the subarctic. *Polar Biology* 26: 486–490.
- Irschick DJ, Meyers JJ, Husak JF, Le Galliard J-F. 2008. How does selection operate on whole-organism functional performance capacities? A review and synthesis. *Evol Ecol Res* 10:177–196.
- Kauffman AS, Rissman EF. 2006. Neuroendocrine control of mating-induced ovulation. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 3rd edition. Amsterdam: Elsevier. p 2283–2326.
- Ladyman M, Bonnet X, Lourdaïs O, Bradshaw D, Naulleau G. 2003. Gestation, thermoregulation, and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: evidence for fecundity-independent costs. *Physiol Biochem Zool* 76:497–510.
- Laloi D, Richard M, Lecomte J, Massot M, Clobert J. 2004. Multiple paternity in clutches of common lizard *Lacerta vivipara*: data from microsatellite markers. *Mol Ecol* 13:719–723.
- Le Galliard J-F, Le Bris M, Clobert J. 2003. Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Funct Ecol* 17:877–885.
- Lin C-X, Zhang L, 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.
- Marquis O, Massot M, Le Galliard J-F. 2008. Intergenerational effects of climate generate cohort variation in lizard reproductive performance. *Ecology* 89:2575–2583.
- Massot M, Clobert J. 1995. Influence of maternal food availability on offspring dispersal. *Behav Ecol Sociobiol* 37:413–418.
- Massot M, Clobert J, Pilorge T, Lecomte J, Barbault R. 1992. Density dependence in the common lizard: demographic consequences of a density manipulation. *Ecology* 73:1742–1756.
- Massot M, Clobert J, Ferrière R. 2008. Climate warming, dispersal inhibition and extinction risk. *Global Change Biol* 14:461–469.
- Massot M, Clobert J, Montes-Poloni L, Haussy C, Cubo J, Meylan S. 2011. An integrative study of ageing in a wild population of common lizards (*Lacerta vivipara*). *Funct Ecol*.
- Mathies T, Franklin EA, Miller LA. 2004. Proximate cues for ovarian recrudescence and ovulation in the brown treesnake (*Boiga irregularis*) under laboratory conditions. *Herpetol Rev* 35: 46–49.
- Mendonça MT, Crews D. 1990. Mating-induced ovarian recrudescence in the red-sided garter snake. *J Comp Physiol Neuroethol Sensory Neural Behav Physiol* 166:629–632.
- Meylan S, Clobert J. 2005. Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. *Horm Behav* 48:44–52.
- Morton SR, Recher HF, Thompson SD, Braithwaite RW. 1982. Comments on the relative advantages of marsupial and eutherian reproduction. *Am Nat* 120:128–134.
- Mugabo M, Marquis O, Perret S, Le Galliard J-F. 2011. Direct and socially-mediated effects of food availability late in life on life-history variation in a short-lived lizard. *Oecologia*.
- Olsson M, Shine R, Bak-Olsson E. 2000. Locomotor impairment of gravid lizards: is the burden physical or physiological? *J Evol Biol* 13:263–268.
- 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 (XI)* 18:569–668.
- Pinheiro JC, Bates DM. 2000. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. New York: Springer.
- Richard M, Lecomte J, de Fraipont M, Clobert J. 2005. Age-specific mating strategies and reproductive senescence. *Mol Ecol* 14: 3147–3155.
- Roff DA. 2002. *Life history evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Sheldon BC. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends Ecol Evol* 15:397–402.
- Shine R. 2003. Effects of pregnancy on locomotor performance: an experimental study on lizards. *Oecologia* 136:450–456.
- Sorci G, Clobert J, Michalakis Y. 1996. Cost of reproduction and cost of parasitism in the common lizard, *Lacerta vivipara*. *Oikos* 76:121–130.
- Stewart JR, Ecaj TW, 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 RS, Kupriyanova L, Vogrin N, Maslak R, Mazzotti S, Venczel M, Ghira I, Odierna G, Leontyeva O, Monney J-C, Smith N. 2001. Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Mol Phylogenet Evol* 18:449–459.
- Tschirren B, Richner H, Schwabl H. 2004. Ectoparasite-modulated deposition of maternal androgens in great tit eggs. *Proc R Soc B* 271:1371–1375.
- Uller T, Eklöf J, Andersson S. 2005. Female egg investment in relation to male sexual traits and the potential for transgenerational effects in sexual selection. *Behav Ecol Sociobiol* 57:584–590.
- Uller T, Olsson M. 2005. Multiple copulations in natural populations of lizards: evidence for the fertility assurance hypothesis. *Behaviour* 142:45–56.
- Williamson KA, Surai PF, Graves JA. 2006. Yolk antioxidants and mate attractiveness in the Zebra Finch. *Funct Ecol* 20:354–359.

## **Annexe 2 : Les précipitations actuelles et la corpulence passée affectent l'investissement dans la reproduction chez un lézard vivipare**

### **Appendix 2: Current rainfall and past body condition affect reproductive investment in a viviparous lizard**

Josefa Bleu<sup>1</sup>, Jean-François Le Galliard<sup>1,2</sup>, Patrick S. Fitze<sup>3,4</sup>, Sandrine Meylan<sup>1,5</sup>, Jean Clobert<sup>6</sup>  
& Manuel Massot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS ; UPMC ; ENS – UMR 7625, Laboratoire Ecologie et Evolution, 7 Quai St. Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>2</sup> CNRS ; ENS – UMS 3194, CEREEP – Ecotron IleDeFrance, École Normale Supérieure, 78 rue du Château, 77140 St-Pierre-lès-Nemours, France.

<sup>3</sup> University of Lausanne, Department of Ecology and Evolution (DEE), Biophore, 1015 Lausanne, Switzerland.

<sup>4</sup> Instituto Pirenaico de Ecología (IPE-CSIC), Avenida Regimiento de Galicia s/n, 22700 Jaca, Spain.

<sup>5</sup> IUFM de Paris – Université Sorbonne Paris IV, 10 rue molitor, 75016 Paris, France.

<sup>6</sup> CNRS, USR 2936, Station d'Ecologie Expérimentale du CNRS à Moulis, 09200 Saint Girons, France.

Running headline: Timing of reproductive investment

**Article submitted** for publication in *Oikos*

## ABSTRACT

Optimization of reproductive investment is crucial for Darwinian fitness. However, allocation strategies are not trivial because they depend on the timing of resource acquisition, the timing of resource allocation, and trade-offs between different life-history traits. Hence, only detailed long-term studies can unravel optimal solutions. In particular, a distinction is recognized between capital breeders that fuel reproduction with stored resources and income breeders that use recently acquired resources. Thus, in capital breeders, energy allocation may be temporally decoupled from energy acquisition. Here, we tested the influence of climatic and intrinsic factors during energy storage, vitellogenesis, and early gestation on patterns of energy allocation to reproduction, *i.e.* variation in litter mass, litter size, and offspring mass, using data from a long-term study (13 years) of the viviparous lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. Rainfall during vitellogenesis was positively correlated with litter size and mass. Climatic conditions during gestation and thermal conditions in general did not affect reproductive investment, despite viviparity and the fact that lizards are ectotherms. We did not detect post-ovulatory adjustments in response to climatic conditions. Intrinsic factors also influenced reproductive investment. There was a positive correlation with body size. Low postpartum body condition the previous year and late parturition date the previous year led to lower litter size. Lastly, offspring mass was negatively correlated with litter size. These results suggest that common lizard females combine both recently acquired and stored resources to fuel reproduction, showing a mixed reproductive strategy. Finally, we also confirmed the predictions of the van Noordwijk and de Jong model (1986) on the detection of trade-offs when there is variation in resources acquisition.

**Key words:** capital breeder, income breeder, reproductive adjustment, phenotypic plasticity, viviparity, trade-off, offspring mass, litter size, long-term survey

## INTRODUCTION

Reproductive investment decisions are of central interest to evolutionary ecology as they determine the lifetime reproductive success and some of the costs associated with reproduction (Roff 2002). However, allocation strategies are not trivial because they depend on the timing of resources acquisition and allocation into reproduction, and on the existence of trade-offs between different life-history traits. In particular, current fecundity can be traded-off with future fecundity (*e.g.* Richner and Tripet 1999). For example, a high investment in reproduction decreases the probability to breed again and thus increases the inter-breeding interval in some species (*e.g.* Bonnet et al. 2001, Hadley et al. 2007). In line with this trade-off hypothesis, recent experimental evidence in mammals (Koivula et al. 2003) and birds (Hanssen et al. 2005) also shows that brood enlargement results in a decrease in fecundity the following year. When current and future reproductive investments are traded off, it is important to understand which factors can constrain reproductive effort in the future and when these factors are important.

In capital breeders, energy allocation is temporally decoupled from energy acquisition because capital breeding species fuel reproduction with stored resources, whereas income breeding species use recently acquired resources (Stephens et al. 2009). Thus, in capital breeders pre-reproductive energy stores should correlate with future reproductive investment (Doughty and Shine 1997, 1998, Reading 2004) or future reproductive success (Festa-Bianchet 1998). In addition, conditions experienced during the energy storage period, such as food availability, may also correlate with future reproductive investment, as shown for litter size in vipers (Bonnet et al. 2001, Lourdais et al. 2002). Consequently, relevant patterns of reproductive investment may be missed in capital breeding species if relevant intrinsic and extrinsic factors are not studied at the appropriate time scale. However, the concepts of income and capital breeders describe only the extremes of a continuum (*e.g.* Houston et al. 2007). In some of the above cited capital breeders, elements of income breeding exists as well: smooth snake females have a higher probability to breed when prey density is high during the breeding year (Reading 2004) and offspring size is influenced by maternal food intake during vitellogenesis in the asp viper (Bonnet et al. 2001). In particular, adjustment of offspring size or litter size may occur in viviparous (*i.e.* live-bearing) species during gestation itself via embryo resorption or nutritional transfer. In lizards, for example, food and thermal conditions experienced by the mother during gestation can affect offspring mass at birth (*e.g.* Shine and Downes 1999, Swain and Jones 2000). Therefore, patterns of reproductive investment can be



complex and long-term studies are needed to disentangle the effects of previous and current conditions, and the effects of different environmental constraints. In this study, we will use long-term data to investigate the effects of past reproduction, past and current climatic conditions on reproduction.

Reproductive decisions depend not only on how much total energy is invested into reproduction (*e.g.* total litter mass) but also on how reproductive investment is allocated into each offspring (*e.g.* offspring mass), *i.e.* on how the trade-off between litter size and litter mass is solved. It is often assumed that these decisions are independent and occur in a sequential manner (*e.g.* Charnov et al. 1995). However, investment and allocation decisions may also be simultaneous, genetically linked, or inter-dependent, as suggested by a theoretical model (Winkler and Wallin 1987) and recent evidence from natural populations (Uller et al. 2009). Moreover, total investment in reproduction and investment per offspring may depend on different energy stores and be influenced by different factors. For example, in the asp viper, litter size depends on both pre-reproductive store and feeding rate during vitellogenesis, whereas offspring mass depends on feeding rate during vitellogenesis (Bonnet et al. 2001). Thus it is important to study both the total investment in reproduction and the allocation to each offspring.

Here we investigated the relative importance of intrinsic and external conditions at different periods of the reproductive cycle on both total reproductive investment and reproductive allocation in litter size versus offspring mass in the viviparous common lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. Squamate reptiles (*i.e.* lizards and snakes) often lack parental care (Shine 2005) and thus reproductive investment is restricted to vitellogenesis and, in some viviparous species, to gestation. In many squamates, body size influences reproductive success, such that longer females invest more in reproduction than shorter females (*e.g.* Shine 2005). Climatic conditions are also of particular importance for reproduction: foraging performances (including the rate of food assimilation) are linked to the ability to maintain optimal body temperatures and depend on variations in air temperatures and in rainfall (Le Galliard et al. in press). Climatic conditions can also affect directly habitat quality and food availability, which influence fecundity and reproductive investment (*e.g.* Jordan and Snell 2002). Finally, some squamates are typical capital breeder but others may also use mixed capital and income strategies (*e.g.* Bonnet et al. 2001, Houston et al. 2007). Thus, we expect that current reproductive decisions should be largely dependent on pre-reproductive energy stores, food availability, and climate conditions in these species. Moreover, because parturition dates affect

the duration of the energy storage period, early breeders may be able to capitalise more resources than late breeders.

In the common lizard, previous studies have shown (1) that the life history is sensitive to variation in air temperature and rainfall (Chamaillé-Jammes et al. 2006, Marquis et al. 2008, Le Galliard et al. 2010); (2) features of capital breeders, including a decrease of stored lipids during reproduction (Avery 1974) and a short period between emergence and ovulation (Bauwens and Verheyen 1985); and (3) features of income breeders, including food assimilation during vitellogenesis (Avery 1975, Mugabo et al. in press) and maternal effects during gestation (*e.g.* Massot and Clobert 1995, Marquis et al. 2008). We used thirteen years of field work to test the effects of climatic conditions (temperature and rainfall) during energy storage, vitellogenesis, and early gestation, and to test the effects of intrinsic factors (body size, previous body condition, previous parturition date) on reproductive output (litter size, litter mass and offspring mass). Previous studies addressed the effects of current climate on reproductive investment (Marquis et al. 2008, Le Galliard et al. 2010). For the first time, we therefore specifically test the importance of the previous year in this annually breeding lizard. If common lizards are capital breeders, we predict that climatic conditions during energy storage, female body condition of the previous year and/or parturition date of the previous year determine reproductive investment. A correlation with climatic conditions during vitellogenesis and/or gestation would suggest income breeding.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***(a) Model species***

*L. vivipara* is a small (50-70 mm adult snout-vent length, SVL) ground-dwelling lizard that is widely distributed across Eurasia. We studied viviparous populations located in the Massif Central mountain range (South-eastern France) where the reproductive cycle is annual (Fig. 1). In this area, activity of adult starts around mid-April for males and in early May for females. Emergence from hibernation of females is highly synchronized. Mating occurs 0-3 days after emergence and reproductive investment (vitellogenesis) occurs on average during the first three weeks of May (Bauwens and Verheyen 1985). During gestation, a primitive chorioallantoic placenta allows respiratory, aqueous and mineral exchanges between mother and embryos (Panigel 1956, Stewart et al. 2009). Parturition occurs after an average gestation period of 2 months, *i.e.* in late July to mid-August. Mean litter size is five (range from 1 to 12) including nonviable offspring (fertilised or unfertilised eggs where only yolk is visible,

undeveloped embryos, and stillborns), and live offspring. Live offspring hatch immediately after parturition and are thereafter autonomous. Adult females replenish their lipid stores during the summer immediately after parturition and gradually enter into hibernation in September (Avery 1974, Bauwens 1981).

**(b) Population survey and rearing conditions**

Longitudinal data on reproductive strategies were obtained from a long-term mark-recapture survey conducted each year from 1990 to 2002 in a population of the Mont-Lozère (1420 m a.s.l., 44°23'03''N, 3°52'40''E) that consists of two contiguous zones with different habitat features (Clobert et al. 1994). Adult females were captured on average one month before parturition (June), identified or marked by toe-clipping, and kept in the laboratory until parturition (rearing conditions as in Massot and Clobert 1995). After parturition, litter size was recorded and females and their live offspring were weighed. Females were then released together with their live offspring at the original capture location 3-5 days after parturition. We recorded litter size for all litters (viable and not viable litters). For litters that exclusively contained viable offspring, we calculated litter mass as the sum of all offspring body masses and offspring mass as litter mass divided by litter size.

**(c) Climatic data**

Temperature and rainfall data were recorded by Météo-France at a meteorological station situated at a similar altitude, 50 km south of the study site (Mont Aigoual, 1567 m a.s.l., 44°07' N, 3°35' E, see Chamaillé-Jammes et al. 2006, Marquis et al. 2008). We used daily maximum temperature and daily cumulative amount of precipitation as descriptors of thermoregulation opportunities and habitat humidity (Huey 1982). For each reproductive year, we calculated mean values for different periods of the reproductive cycle, namely (i) during the previous summer activity season (energy storage period), (ii) during vitellogenesis, and (iii) during the early gestation period *in natura* (see Fig. 1 for more details). Correlations between climatic variables are reported in the supplementary material Appendix 1. We tested the effects of temperature during energy storage and temperature during early gestation separately and together, to address potential collinearity issues caused by a significant correlation between these climatic variables. Effects were all robust and collinearity was therefore not a strong issue in our analyses.

#### ***(d) Statistical analyses***

We analysed variation in the litter mass, litter size, and offspring mass at birth of exclusively viable litters ( $n = 157$ ) and variation in litter size of all litters ( $n = 239$ ) with mixed-effects linear models accounting for random variation between years (Pinheiro and Bates 2000). A first random-effect model was fitted to assess inter-annual variation. Next, a mixed-effect model was fitted to test for intrinsic effects. We included postpartum body condition of the previous reproductive season [corpulence(t-1)], parturition date of the previous reproductive season [parturition(t-1)], and female SVL during the current reproductive season [SVL(t)]. Body condition was calculated as residuals of a linear regression of body mass against SVL. We also added a zone effect because previous studies have reported spatial differences in life history traits (Clobert et al. 1994). For offspring mass, we also modelled a potential trade-off with litter size. Since litter size and maternal SVL are correlated (Pearson's  $r = 0.66$ ,  $P < 0.0001$ ), we included relative litter size in the model (residuals of a linear regression of litter size against maternal SVL). To test for potential differences between exclusively viable litters and litters comprising at least one nonviable offspring (hereafter called “mixed” litters), we included a categorical effect when analysing all litters. The full model included additive and first-order interaction terms. A first minimum adequate model was selected using both backward elimination and forward selection of higher order interactions based on AIC. Finally, additive effects of climatic conditions were added to the first minimum adequate model. A second minimum adequate model was then selected using the same procedure as mentioned above. We report only significant effects using F tests based on restricted maximum likelihood conditional estimates of variance. Estimates  $\pm$  SE are shown for fixed effects and 95% CI are given for random effects.

#### ***(e) Trade-off between offspring mass and litter size***

We also modelled the trade-off between offspring mass and litter size in more detail. We run correlations between offspring mass and residual litter size for each year (Pearson correlations). We also run correlations on log-transformed variables to make the results comparable with current literature (e.g. Christians 2000). Van Noordwijk and de Jong's model (1986) predicts that more negative correlations should be found when variation in resource acquisition is low compared to variation in resource allocation. According to the adaption of this model to the offspring mass-number trade-off by Christians (2000), we calculated variation in allocation among females as variance of  $(\log(\text{offspring mass})/(\log(\text{litter mass})))$  and variation in reproductive investment as the variance of  $(\log(\text{litter mass}))$ . These variables were

calculated for each year. To avoid confounding effects, we used residuals from the regressions of investment and allocation on female SVL (Brown 2003). We expect a correlation between ‘variance ratio’ (*i.e.* the ratio of allocation variance to investment variance) and the strength of the correlation between offspring mass and litter size (Pearson’s  $r$ ). This analysis was performed both with the whole dataset (including also the females not recaptured on two successive years) and the restricted dataset (used in the other analyses). Since the results were not qualitatively different, we report the results with the restricted dataset for homogeneity with the other analyses.

## RESULTS

We collected reproductive data for 239 females from 12 years, including 157 exclusively viable litters and 82 mixed litters (see supplementary material Appendix 2 for annual sample sizes). We found no effect of temperature or zone in all tested models (Table 1). The mass and size of exclusively viable litters were positively correlated with rainfall during vitellogenesis (Table 1, Fig. 2), as well as with current female body size and with female postpartum body condition the previous year (Fig. 3a). However, offspring mass was only explained by residual litter size (litter size corrected by the maternal body size, Table 1). The size of all litters (mixed and exclusively viable) also increased with rainfall during vitellogenesis and female body size, but in addition was influenced by the interaction between the parturition date the previous year, postpartum body condition the previous year and litter success of the current year (Table 1). For exclusively viable litters, the interaction between parturition date and postpartum body condition the previous year was not significant, being consistent with the analysis reported above (partial test:  $F_{1,141} = 1.54$ ,  $P = 0.22$ ). For mixed litters, the interaction between parturition date and postpartum body condition the previous year was significant (partial test:  $F_{1,66} = 7.73$ ,  $P = 0.0071$ , Fig. 3b): in this case, body condition had a positive effect on litter size for females giving birth late in the season but not for early breeders (Fig. 3b).

Annual factors explained between 3.5 and 12.7% of the total variance in reproductive traits (Table 2). Intrinsic factors (body size and condition) explained a large part of the inter-annual variation in litter size (for exclusively viable litters and all litters) and litter mass (Table 2), but inter-annual variation in offspring mass remained similar compared to the total variation when significant intrinsic factors (residual litter size) were included in the model (Table 2). The effect of rainfall during vitellogenesis, which was significant for litter mass and litter size, explained all remaining inter-annual variance in these two reproductive traits (Table 2).

The correlations between residual litter size and offspring body mass were always negative despite annual variation in their strength (Table 3). Our predictions were confirmed, there is a correlation between the variance ratio and the Pearson's  $r$  of the correlation between litter size and offspring size (Pearson's  $r = -0.860$ , range =  $[-0.960; -0.566]$ , p-value = 0.0003). These results are equivalent with log transformed values of the offspring mass and number trade-off (supplementary material Appendix 3). We also obtain qualitatively similar results when analysing the whole dataset. In this case, the correlations between the residual litter size and offspring body mass are not significantly different from zero (although negative) in only 4 years.

## **DISCUSSION**

Our study led to three major findings. First, offspring mass at birth was only influenced by a negative correlation with litter size, the strength of which however varied between years depending on the variance ratio between resource allocation and resource investment. Second, reproductive investment was not influenced by climatic conditions during the energy storage period or after vitellogenesis, but rainfall during vitellogenesis was positively correlated with reproductive investment. Despite the ectothermic life style of common lizards, thermal conditions, assessed by daily maximal temperatures, had no effect. Finally, reproductive investment was dependent on body size, previous postpartum body condition and duration of the energy storage period (estimated by the parturition date of the previous year).

### ***(a) Offspring mass and litter size trade-off***

In natural conditions, it may be difficult to detect trade-offs because animals vary in their resource stores and resource acquisition efficiency (Doughty and Shine 1997, Glazier 1999). More than two decades ago, van Noordwijk and de Jong (1986) suggested that the trade-offs will be more difficult to detect if variation in resources acquisition is high relative to variation in resources allocation. This hypothesis has been tested in the case of the egg size vs. number trade-off in different species and situations. First, Christians (2000) used these predictions to explain the strength of this trade-off at the inter-specific level by comparing various clades of waterfowl (order Anseriformes). This prediction has also been confirmed at the intra-specific level between years or different populations of the same species both in scorpions (Brown 2003) and lizards (Jordan and Snell 2002). Finally, in the common lizard, Uller and Olsson (2005) compared field and laboratory data for a given year. They showed that the strength of

the trade-offs was higher under laboratory conditions, *i.e.* when variation in resources acquisition was lower. Our study on a multi-annual data set also confirms the predictions of the van Noordwijk and de Jong model (1986) because annual variation in resources acquisition explained well the annual variation in the strength of the trade-off between offspring mass and offspring number.

Offspring mass was not influenced by previous female reproduction and not by climatic conditions before, during or after vitellogenesis. It was only constrained by the trade-off with litter size (see also Bleu et al. 2011b). Despite annual variations in the strength of this trade-off, we did not detect variation in offspring mass independently from this trade-off. One explanation could be that constraints limit the ability of females to adjust offspring mass. However, in the common lizard, it has been shown previously that offspring size and mass may be adjusted during gestation, for example in response to an experimental increase in female stress (Meylan and Clobert 2005). Thus, the possibility of offspring mass adjustment exists but our study suggests that there is no such adjustment in response to the climatic factors we tested. Actually, an increased food intake caused by better climatic conditions during vitellogenesis or gestation may not be invested in offspring mass, as suggested by an experimental manipulation of food intake during gestation which showed no effect of the treatment on offspring mass (Massot and Clobert 1995). Extra resources acquired during gestation may be invested in female somatic growth, resulting in higher postpartum body condition (Gregory 2006, Le Galliard et al. 2010).

### ***(b) Climatic factors***

The climatic conditions experienced during energy storage (summer activity season of the previous year) had no effect on reproductive investment. Since climatic conditions affect resource availability and lizard physiology, this suggests: (i) that climatic conditions experienced during this period did not constrain resource acquisition and/or (ii) that reproduction may be fuelled with resources stored even before this period and/or (iii) that it may depend on resources acquired during the reproductive event, *i.e.* income breeding. This finding is in line with an experimental manipulation in the common lizard: manipulation of food intake after parturition (during energy storage) revealed no effect of food availability during this period on reproductive investment the following year (Mugabo et al. in press). Moreover, climatic conditions experienced during gestation did not affect reproductive investment and offspring mass like in previous studies on a larger data set (Marquis et al. 2008, Le Galliard et al. 2010). This result supports the hypothesis that constraints exist on the

adjustment of litter size. As suggested by a previous study, the reproductive tract of the common lizard may not allow resorption of the embryos (Bleu et al. 2011a). Thus, despite viviparity, adjustment of litter size after ovulation may not be possible.

Females adjusted their reproductive investment to the amount of rainfall experienced during vitellogenesis. The influence of temporal variation in rainfall during vitellogenesis is not surprising in a lizard species adapted to wet habitats. Previous studies have indicated that rainfall conditions can have intergenerational effects on female reproductive strategies and direct effects on offspring growth and survival (Marquis et al. 2008, Le Galliard et al. 2010). Habitat dryness also hinders individual growth rates and fecundity (Lorenzon et al. 2001). The effect of rainfall during vitellogenesis on reproductive investment may indicate that income resources affect reproductive strategies if stronger rainfall during vitellogenesis is associated with higher food intake. Another alternative interpretation is that rainfall influences the use of stored resources during vitellogenesis, such that females made stronger and more efficient use of their stored resources with stronger rainfall. The distinction between income and climate-dependent capital breeding will require further testing either by measuring body composition and resource allocation with isotopic analysis (*e.g.* Warner et al. 2008) or by manipulating the food intake during vitellogenesis (*e.g.* Lourdais et al. 2003).

The absence of any significant effect of temperature is surprising because the common lizard is an ectothermic species. One explanation for this is that female lizards can buffer variations in the temperature of their habitats by active thermoregulation and thus may not be so strongly constrained by temporal variation in thermal conditions (Webb et al. 2006). Yet, poor thermal conditions during gestation are associated with low postpartum body condition and delayed parturition in the common lizard (Le Galliard et al. 2010), which means that climate conditions have direct and indirect effects on gestation. The effects of basking opportunities and thermal conditions during gestation have been studied in several other viviparous snake and lizard species (field studies: Lourdais et al. 2002, 2004, Cadby et al. 2010, experimental studies: Shine and Harlow 1993, Doughty and Shine 1998, Shine and Downes 1999, Swain and Jones 2000, Wapstra 2000, Caley and Schwarzkopf 2004, Hare and Cree 2010). These studies all reported that litter size was not influenced by thermal conditions during gestation, but some found effects on offspring characteristics at birth (*e.g.* scale number, Lourdais et al. 2004) and all reported that temperatures influence gestation length.



### **(c) *Intrinsic factors***

In this study, we also investigated the effects of three intrinsic factors that can influence reproductive investment, namely current body size, postpartum body condition of the previous year, and parturition date of the previous reproductive event. Body size was positively correlated with current reproductive investment. Body size may limit a female's reproductive output due to size-dependent availability of abdominal space (Qualls and Shine 1995). Furthermore, larger lizards are usually more efficient foragers (González-Suárez et al. 2011) and thus have more resources to allocate to reproduction than smaller lizards, leading to a positive relationship between body size, fat body reserves and reproductive investment (Avery 1974, 1975). We also found a positive effect of postpartum body condition the previous year on current reproductive investment, which indicates capital breeding as in other species (*e.g.* Doughty and Shine 1997, Festa-Bianchet 1998). This long-term effect of body condition is somewhat surprising since lizards store resources during the summer after reproduction and may compensate for a low postpartum body condition, unless feeding rate is positively correlated with body condition and a low postpartum body condition indicates a low individual quality. In addition, we found a complex condition-dependent effect of the parturition date the previous year on current reproductive effort for females that produced not fully successful litters. Litter size was constrained by postpartum body condition of the previous year when females gave birth late in the previous season, but not when females gave birth early in the previous season. This illustrates that earlier breeding and parturition may be advantageous for subsequent reproduction for some females only, in this case the females producing not fully successful litters.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to the students who helped collect data and to the *Parc National des Cévennes* and the *Office National des Forêts* for providing good conditions during fieldwork. We thank *Météo-France* for providing the climate data used in this study. Financial support was received from the *Agence Nationale de la Recherche* (grant 07-JCJC-0120 to J.F.L.G and grant 07-BLAN-0217 to M. M. and J. C.), the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2005-01187, CGL2008-01522, and Programa Ramón y Cajal to P. S. F.), the Swiss National Science Foundation (PPOOP3\_128375) and the *Ministère de l'Éducation Supérieure et de la Recherche* (Ph.D grant to J. B.).

## LITERATURE CITED

- Avery, R. A. 1974. Storage lipids in the lizard *Lacerta vivipara*: a quantitative study. - J. Zool. 173: 419-425.
- Avery, R. A. 1975. Clutch size and reproductive effort in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. - Oecologia 19: 165-170.
- Bauwens, D. 1981. Survivorship during hibernation in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. - Copeia 1981: 741-744.
- Bauwens, D. and Verheyen, R. F. 1985. The timing of reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*: differences between individual females. - J. Herpetol. 19: 353-364.
- Bleu, J. et al. 2011a. Mating does not influence reproductive investment, in a viviparous lizard. - J. Exp. Zool. Part A in press.
- Bleu, J. et al. 2011b. Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard. - Proc. R. Soc. B in press.
- Bonnet, X. et al. 2001. Short-term versus long-term effects of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. - Oikos 92: 297-308.
- Brown, C. A. 2003. Offspring size-number trade-offs in scorpions: an empirical test of the van Noordwijk and de Jong model. - Evolution 57: 2184-2190.
- Cadby, C. D. et al. 2010. Multi-scale approach to understanding climate effects on offspring size at birth and date of birth in a reptile. - Integr. Zool. 5: 164-175.
- Caley, M. J. and Schwarzkopf, L. 2004. Complex growth rate evolution in a latitudinally widespread species. - Evolution 58: 862-869.
- Chamaillé-Jammes, S. et al. 2006. Global warming and positive fitness response in mountain populations of common lizards *Lacerta vivipara*. - Global Change Biol. 12: 392-402.
- Charnov, E. L. et al. 1995. Optimal offspring sizes in small litters. - Evol. Ecol. 9: 57-63.
- Christians, J. K. 2000. Trade-offs between egg size and number in waterfowl: an interspecific test of the van Noordwijk and de Jong model. - Funct. Ecol. 14: 497-501.
- Clobert, J. et al. 1994. Determinants of dispersal behavior: the common lizard as a case study. - In: Vitt, L. J. and Pianka, E. R. (eds), Lizard ecology: historical and experimental perspectives. Princeton University Press, pp. 183-206.
- Doughty, P. and Shine, R. 1997. Detecting life history trade-offs: measuring energy stores in "capital" breeders reveals costs of reproduction. - Oecologia 110: 508-513.
- Doughty, P. and Shine, R. 1998. Reproductive energy allocation and long-term energy stores in a viviparous lizard (*Eulamprus tympanum*). - Ecology 79: 1073-1083.
- Festa-Bianchet, M. 1998. Condition-dependent reproductive success in bighorn ewes. - Ecol. Lett. 1: 91-94.
- Glazier, D. S. 1999. Trade-offs between reproductive and somatic (storage) investments in animals: a comparative test of the Van Noordwijk and De Jong model. - Evol. Ecol. 13: 539-555.
- González-Suárez, M. et al. 2011. Disentangling the effects of predator body size and prey density on prey consumption in a lizard. - Funct. Ecol. 25: 158-165.

- Gregory, P. T. 2006. Influence of income and capital on reproduction in a viviparous snake: direct and indirect effects. - *J. Zool.* 270: 414-419.
- Hadley, G. L. et al. 2007. Evaluation of reproductive costs for Weddell seals in Erebus Bay, Antarctica. - *J. Anim. Ecol.* 76: 448-458.
- Hanssen, S. A. et al. 2005. Cost of reproduction in a long-lived bird: incubation effort reduces immune function and future reproduction. - *Proc. R. Soc. B* 272: 1039-1046.
- Hare, K. M. and Cree, A. 2010. Exploring the consequences of climate-induced changes in cloud cover on offspring of a cool-temperate viviparous lizard. - *Biol. J. Linn. Soc.* 101: 844-851.
- Houston, A. I. et al. 2007. Capital or income breeding? A theoretical model of female reproductive strategies. - *Behav. Ecol.* 18: 241-250.
- Huey, R. B. 1982. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. - In: Gans, C. and Pough, F. H. (eds), *Biology of the reptilia*. Academic Press, pp. 25-91.
- Jordan, M. A. and Snell, H. L. 2002. Life history trade-offs and phenotypic plasticity in the reproduction of Galapagos lava lizards (*Microlophus delanonis*). - *Oecologia* 130: 44-52.
- Koivula, M. et al. 2003. Cost of reproduction in the wild: manipulation of reproductive effort in the bank vole. - *Ecology* 84: 398-405.
- Le Galliard, J.-F. et al. 2010. Cohort variation, climate effects and population dynamics in a short-lived lizard. - *J. Anim. Ecol.* 79: 1296-1307.
- Le Galliard, J.-F. et al. Ecological effects of climate change on European reptiles. - In: Brodie, J. F. et al. (eds), *Conserving wildlife populations in a changing climate*. University of Chicago Press, in press.
- Lorenzon, P. et al. 2001. The contribution of phenotypic plasticity to adaptation in *Lacerta vivipara*. - *Evolution* 55: 392-404.
- Lourdais, O. et al. 2002. Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of a viviparous snake. - *J. Anim. Ecol.* 71: 470-479.
- Lourdais, O. et al. 2003. When does a reproducing female viper (*Vipera aspis*) “decide” on her litter size? - *J. Zool.* 259: 123-129.
- Lourdais, O. et al. 2004. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. - *Oikos* 104: 551-560.
- Marquis, O. et al. 2008. Intergenerational effects of climate generate cohort variation in lizard reproductive performance. - *Ecology* 89: 2575-2583.
- Massot, M. and Clobert, J. 1995. Influence of maternal food availability on offspring dispersal. - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 37: 413-418.
- Meylan, S. and Clobert, J. 2005. Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. - *Horm. Behav.* 48: 44-52.
- Mugabo, M. et al. Direct and socially-mediated effects of food availability late in life on life-history variation in a short-lived lizard. - *Oecologia* in press.
- 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.* (XI) 18: 569-668.

- Pinheiro, J. C. and Bates, D. M. 2000. Mixed-effects models in S and S-PLUS. - Springer-Verlag.
- Qualls, C. P. and Shine, R. 1995. Maternal body-volume as a constraint on reproductive output in lizards: evidence from the evolution of viviparity. - *Oecologia* 103: 73-78.
- Reading, C. J. 2004. The influence of body condition and prey availability on female breeding success in the smooth snake (*Coronella austriaca Laurenti*). - *J. Zool.* 264: 61-67.
- Richner, H. and Tripet, F. 1999. Ectoparasitism and the trade-off between current and future reproduction. - *Oikos* 86: 535-538.
- Roff, D. A. 2002. Life history evolution. - Sinauer Associates.
- Shine, R. 2005. Life-history evolution in reptiles. - *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 23-46.
- Shine, R. and Harlow, P. 1993. Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. - *Oecologia* 96: 122-127.
- Shine, R. and Downes, S. J. 1999. Can pregnant lizards adjust their offspring phenotypes to environmental conditions? - *Oecologia* 119: 1-8.
- Stephens, P. A. et al. 2009. Capital breeding and income breeding: their meaning, measurement, and worth. - *Ecology* 90: 2057-2067.
- Stewart, J. R. et al. 2009. Calcium provision to oviparous and viviparous embryos of the reproductively bimodal lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. - *J. Exp. Biol.* 212: 2520-2524.
- Swain, R. and Jones, S. M. 2000. Maternal effects associated with gestation conditions in a viviparous lizard, *Niveoscincus metallicus*. - *Herpetol. Monogr.* 14: 432-440.
- Uller, T. and Olsson, M. 2005. Trade-offs between offspring size and number in the lizard *Lacerta vivipara*: a comparison between field and laboratory conditions. - *J. Zool.* 265: 295-299.
- Uller, T. et al. 2009. Evaluation of offspring size-number invariants in 12 species of lizard. - *J. Evol. Biol.* 22: 143-151.
- van Noordwijk, A. J. and de Jong, G. 1986. Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. - *Am. Nat.* 128: 137-142.
- Wapstra, E. 2000. Maternal basking opportunity affects juvenile phenotype in a viviparous lizard. - *Funct. Ecol.* 14: 345-352.
- Warner, D. A. et al. 2008. Lizards combine stored energy and recently acquired nutrients flexibly to fuel reproduction. - *J. Anim. Ecol.* 77: 1242-1249.
- Webb, J. K. et al. 2006. The adaptive significance of reptilian viviparity in the tropics: testing the maternal manipulation hypothesis. - *Evolution* 60: 115.
- Winkler, D. W. and Wallin, K. 1987. Offspring size and number: a life history model linking effort per offspring and total effort. - *Am. Nat.* 129: 708-720.

## TABLES

**Table 1. Effects of intrinsic and climatic factors on reproductive traits.** Final models were selected starting with full models including intrinsic factors [current body size: SVL(t), postpartum body condition following the previous reproductive event: Corpulence(t-1), parturition date of the previous reproductive event: Parturition(t-1), litter success: Success], zone of habitat and climatic factors (rainfall and temperatures during energy storage, vitellogenesis and gestation, see Fig. 1 for details). Residual litter size was calculated as the residuals of a linear regression between litter size and maternal SVL. Non-significant effects ( $P > 0.08$ ) are not presented and random effects are presented in Table 2.

Effects	Estimate	F	DF	P
<b>Litter mass</b>				
SVL(t)	$0.058 \pm 0.005$	149.62	1,143	< 0.0001
Corpulence(t-1)	$0.132 \pm 0.050$	7.10	1,143	0.0086
Rainfall during vitellogenesis	$0.015 \pm 0.005$	9.45	1,10	0.0117
<b>Size of exclusively viable litters</b>				
SVL(t)	$0.311 \pm 0.029$	118.28	1,143	< 0.0001
Corpulence(t-1)	$0.748 \pm 0.299$	6.26	1,143	0.0135
Rainfall during vitellogenesis	$0.089 \pm 0.030$	8.86	1,10	0.0139
<b>Size of all litters (mixed and exclusively viable litters)</b>				
SVL(t)	$0.306 \pm 0.024$	167.47	1,219	< 0.0001
Corpulence(t-1)	$1.268 \pm 0.473$	8.94	1,219	0.0031
Parturition(t-1)	$-0.030 \pm 0.019$	1.74	1,219	0.1881
Success	$-0.357 \pm 0.178$	0.44	1,219	0.5093
Corpulence(t-1) $\times$ Parturition(t-1)	$0.239 \pm 0.078$	9.34	1,219	0.0025
Corpulence(t-1) $\times$ Success	$-0.496 \pm 0.577$	4.54	1,219	0.0341
Parturition(t-1) $\times$ Success	$0.019 \pm 0.025$	0.35	1,219	0.5525
Corpulence(t-1) $\times$ Parturition(t-1) $\times$ Success	$-0.192 \pm 0.089$	4.62	1,219	0.0327
Rainfall during vitellogenesis	$0.090 \pm 0.025$	12.94	1,10	0.0049
<b>Offspring mass</b>				
Residual litter size	$-0.008 \pm 0.001$	59.66	1,144	< 0.0001

**Table 2. Annual variations of reproductive traits.** Estimates of year random effect for litter mass, size of exclusively viable litters, offspring mass, and size of all litters. Estimates are given as standard deviations calculated from a random model with no fixed effect (“annual variation” model), a mixed effect model with significant individual factors (“individual factors” model) and a mixed effect model with significant individual and climatic factors (“final best model”, Table 1). Terminology:  $\sigma_{\text{annual}}$  = year effect standard deviation,  $\sigma_{\text{residual}}$  = residual standard deviation, ICC = intraclass correlation coefficient (% of total variance), LRT = likelihood ratio test.  $\sim 0$  indicates an estimate at the boundary of the parameter space.

	$\sigma_{\text{annual}}$	$\sigma_{\text{residual}}$	ICC	LRT	P
<b>Litter mass</b>					
Annual variation	0.0085 [0.0019 ; 0.0368]	0.081 [0.064 ; 0.102]	9.50	4.95	0.0260
Individual factors	0.0021 [0.0002 ; 0.0223]	0.043 [0.034 ; 0.054]	4.66	1.17	0.2786
Final best model	$\sim 0$	0.042 [0.036 ; 0.053]	0		
<b>Size of exclusively viable litters</b>					
Annual variation	0.37 [0.10 ; 1.35]	2.54 [2.01 ; 3.19]	12.71	7.89	0.0050
Individual factors	0.041 [8.8e-4 ; 1.89]	1.56 [1.24 ; 1.97]	2.56	0.35	0.5542
Final best model	$\sim 0$	1.52 [1.21 ; 1.90]	0		
<b>Size of all litters</b>					
Annual variation	0.40 [0.12 ; 1.27]	2.81 [2.34 ; 3.38]	12.46	13.24	0.0003
Individual factors	0.11 [0.02 ; 0.57]	1.60 [1.32 ; 1.93]	6.43	3.25	0.0716
Final best model	$\sim 0$	1.53 [1.28 ; 1.83]	0		
<b>Offspring mass*</b>					
Annual variation	0.1e-4 [0.1e-5 ; 1.6e-4]	3.5e-4 [2.8e-4 ; 4.4e-4]	3.47	1.03	0.3109
Individual factors	0.9e-5 [0.8e-6 ; 1.1e-4]	2.5e-4 [2.0e-4 ; 3.2e-4]	3.51	1.08	0.2994

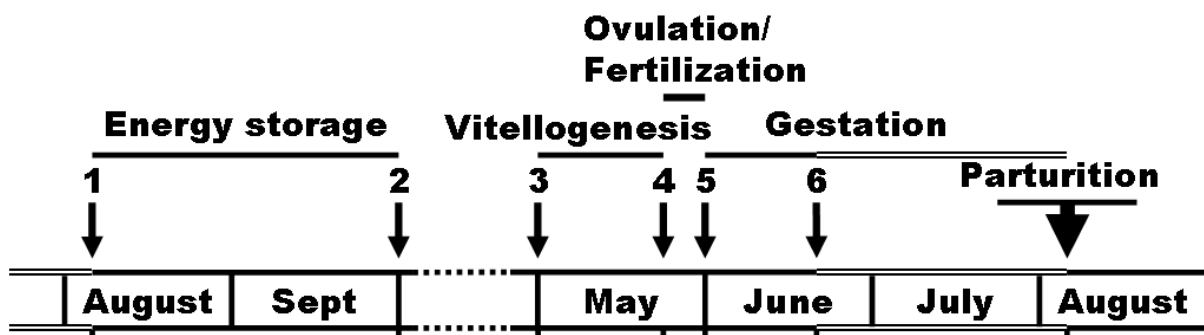
\* Effects of climatic conditions were not significant for offspring mass

**Table 3. Annual variations in the offspring mass and number trade-off.** The trade-off was investigated only in exclusively viable litters (n = 157). We calculated correlation between offspring mass and residual litter size for each year (see supplementary material Appendix 3 for log transformed values). Significant correlations are in bold (P < 0.05). Then according to Christians (2000), we calculated the variance ratio as the ratio of the variance in allocation [*i.e.* var{log(offspring mass)/log(litter mass)}] to the variance in investment [*i.e.* var{log(litter mass)}].

<b>Year</b>	<b>n</b>	<b>Pearson's r</b>	<b>Range</b>	<b>P</b>	<b>Variance ratio</b>
1991	11	-0.415	-0.813 0.246	0.204	0.0190
1992	10	-0.313	-0.787 0.394	0.379	0.0152
<b>1993</b>	<b>21</b>	<b>-0.493</b>	<b>-0.762 -0.078</b>	<b>0.023</b>	<b>0.0189</b>
1994	18	-0.226	-0.627 0.269	0.366	0.0133
<b>1995</b>	<b>13</b>	<b>-0.713</b>	<b>-0.908 -0.267</b>	<b>0.006</b>	<b>0.0246</b>
<b>1996</b>	<b>15</b>	<b>-0.611</b>	<b>-0.855 -0.143</b>	<b>0.016</b>	<b>0.0195</b>
<b>1997</b>	<b>12</b>	<b>-0.870</b>	<b>-0.963 -0.592</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.0451</b>
1998	11	-0.475	-0.837 0.174	0.140	0.0169
<b>1999</b>	<b>11</b>	<b>-0.705</b>	<b>-0.917 -0.182</b>	<b>0.015</b>	<b>0.0246</b>
2000	12	-0.319	-0.755 0.312	0.312	0.0163
2001	10	-0.305	-0.784 0.402	0.392	0.0138
2002	13	-0.451	-0.802 0.133	0.122	0.0148

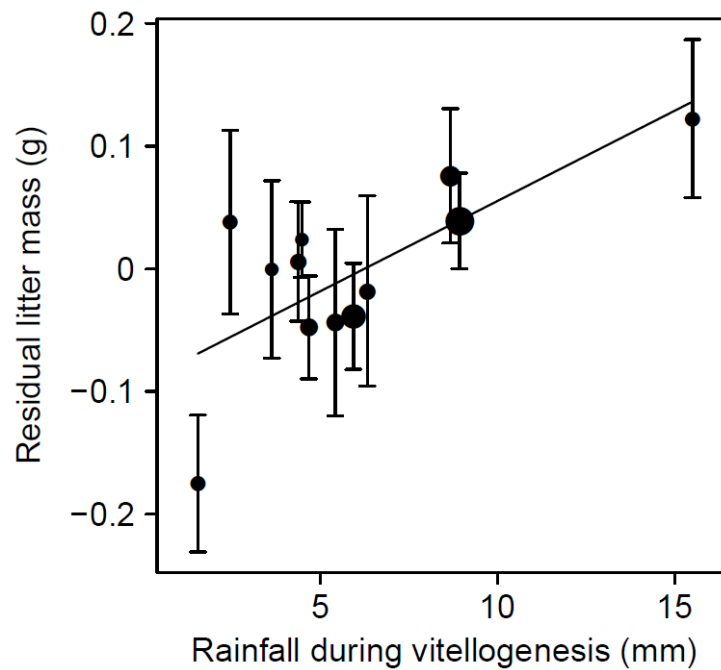
## FIGURES

**Figure 1. Reproductive cycle of the common lizard at Mont Lozère.** During the course of our study, lizards were captured during mid-gestation in June and maintained in the laboratory until parturition (hollow lines). We calculated average climatic conditions (i) during energy storage and thus from parturition (date 1: 8<sup>th</sup> August) to the start of hibernation (date 2: 30<sup>th</sup> September), (ii) during vitellogenesis: from 1<sup>st</sup> of May (date 3) to 21<sup>st</sup> of May (date 4), and (iii) during gestation *in natura*: from 1<sup>st</sup> of June (date 5) to capture (date 6: 21<sup>st</sup> June).

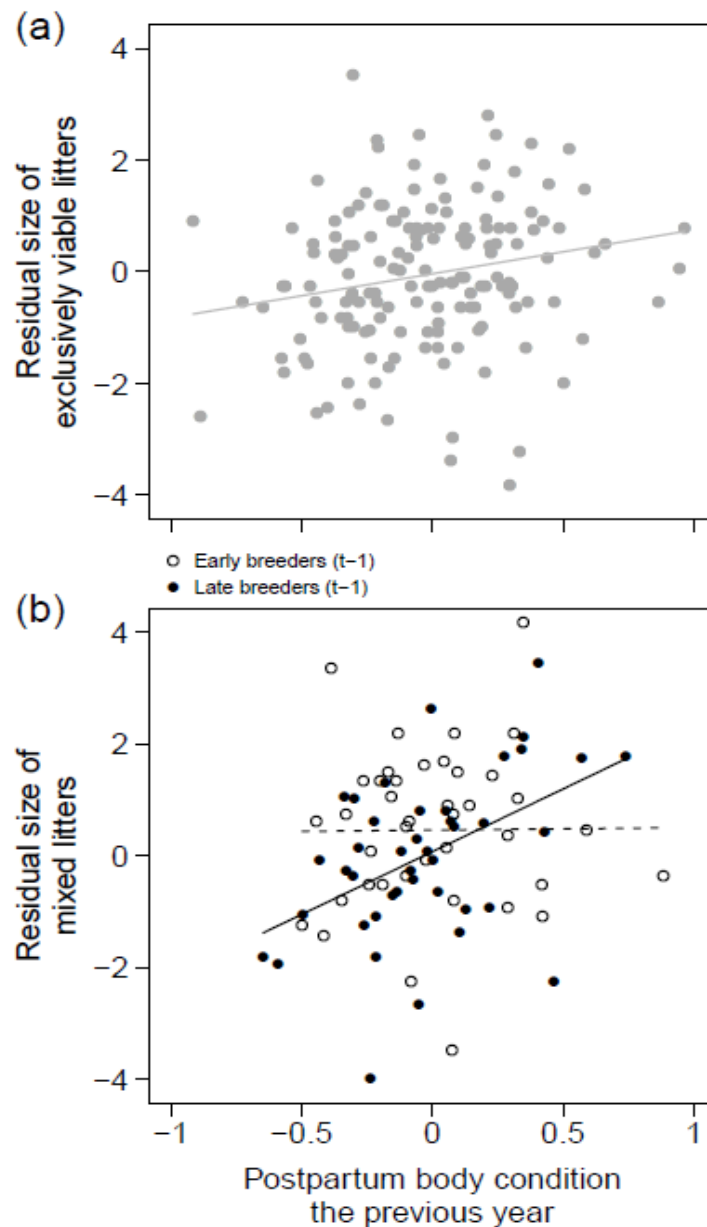




**Figure 2. Variation in litter mass.** Residual litter mass (residuals of litter mass from a linear regression against maternal SVL and previous postpartum body condition, see Table 1) is shown as means ( $\pm$  SE) per year. Dot size is proportional to sample size (range = 10-21). The solid line represents model predictions from Table 1. The regression slope was robust to the exclusion of the year with the highest rainfall (slope =  $0.016 \pm 0.007$ ,  $F_{1,9} = 2.18$ ,  $P = 0.057$ ).



**Figure 3. Variation in litter size.** (a) Size of exclusively viable litters ( $n = 157$ ) increased with postpartum body condition of the previous year. The solid line indicates model predictions (Table 1). (b) Postpartum body condition and parturition date of the previous year determined the size of mixed litters. Model predictions for early breeding females (parturition date < mean parturition date) are represented using a dashed line. A solid line is used for late breeders (parturition date > mean parturition date). Slope estimates obtained from the model in Table 1 were positive and significant for late breeders ( $n = 42$ , slope =  $2.225 \pm 0.648$ ,  $P = 0.0007$ ) and not significantly different from zero in early breeders ( $n = 40$ , slope =  $0.063 \pm 0.690$ ,  $P = 0.93$ ). Data for litter sizes are residuals of a linear regression between litter size and maternal SVL.



## SUPPLEMENTARY MATERIALS

### Appendix 1. Correlation of rainfall and temperature data.

Pairwise correlations of temperature (TP) and rainfall (RF) data between life stages within years (sample size = 12 years). We show the Pearson's product moment correlation coefficient in the upper triangular matrix and the p-value (without correction for multiple testing) in the lower triangular matrix. Significant correlations are plotted in bold ( $P < 0.05$ ). Life stages are labeled as followed (see Figure 1 for more details): 1 = energy storage the previous year, 2 = vitellogenesis the current year, 3 = gestation the current year.

	TP1	TP2	TP3	RF1	RF2	RF3
TP1		0.524	<b>-0.590</b>	-0.128	-0.237	0.302
TP2	<i>0.080</i>		-0.246	0.089	0.226	0.093
TP3	<b><i>0.0436</i></b>	<i>0.441</i>		0.202	0.381	-0.269
RF1	<i>0.692</i>	<i>0.783</i>	<i>0.528</i>		0.432	-0.287
RF2	<i>0.459</i>	<i>0.479</i>	<i>0.222</i>	<i>0.160</i>		-0.378
RF3	<i>0.340</i>	<i>0.773</i>	<i>0.398</i>	<i>0.365</i>	<i>0.226</i>	

## Appendix 2. Sample sizes.

The population was sampled every year from 1990 to 2002. We included in the analysis only females that were captured on two successive years.

Year t	Number of captured females	Number of recaptured females (captured on year t-1 and t)
1990	101	--
1991	87	16
1992	82	20
1993	121	29
1994	81	28
1995	89	21
1996	80	23
1997	67	19
1998	65	14
1999	76	17
2000	79	17
2001	65	19
2002	76	16
Total	1069	239

Note that 9 females appeared 3 times in the dataset (they were captured 3 times in 2 successive years), 41 females appeared 2 times in the dataset (they were captured 2 times in 2 successive years) and 130 females appeared 1 time in the dataset (they were captured once in 2 successive years). Since most of the females appeared only once, we did not take into account the non-independence of the other females.

### Appendix 3. Trade-off between offspring mass and number.

We calculated correlation between log(offspring mass) and residual litter size (defined as the residuals of log(litter size) on log(maternal SVL)) for each year. Significant correlations are in bold. See Table 3 for details on the variance ratio (it is calculated as described in Table 3 and has been reported here only for clarity). There is a correlation between the variance ratio and the Pearson's  $r$  of the correlation between litter size and offspring mass (Pearson's  $r = -0.869$ , range = [-0.963; -0.589], p-value = 0.0002).

Year	$n$	Pearson's $r$	Range	P	Variance ratio
1991	11	-0.438	-0.822 0.219	0.178	0.0190
1992	10	-0.155	-0.715 0.526	0.668	0.0152
<b>1993</b>	<b>21</b>	<b>-0.492</b>	<b>-0.762 -0.076</b>	<b>0.024</b>	<b>0.0189</b>
1994	18	-0.258	-0.647 0.238	0.301	0.0133
<b>1995</b>	<b>13</b>	<b>-0.668</b>	<b>-0.891 -0.184</b>	<b>0.013</b>	<b>0.0246</b>
<b>1996</b>	<b>15</b>	<b>-0.593</b>	<b>-0.848 -0.115</b>	<b>0.012</b>	<b>0.0195</b>
<b>1997</b>	<b>12</b>	<b>-0.890</b>	<b>-0.969 -0.647</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.0451</b>
1998	11	-0.427	-0.817 0.233	0.191	0.0169
<b>1999</b>	<b>11</b>	<b>-0.678</b>	<b>-0.909 -0.132</b>	<b>0.022</b>	<b>0.0246</b>
2000	12	-0.281	-0.736 0.349	0.377	0.0163
2001	10	-0.357	-0.806 0.351	0.311	0.0138
2002	13	-0.366	-0.763 0.231	0.218	0.0148

## **Annexe 3 : Une réduction expérimentale de la taille de portée révèle des coûts de la gestation et des effets décalés sur les descendants chez un lézard vivipare**

### **Appendix 3: Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard**

Josefa Bleu<sup>1</sup>, Manuel Massot<sup>1</sup>, Claudy Haussy<sup>1</sup> & Sandrine Meylan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CNRS ; UPMC ; ENS – UMR 7625, Laboratoire Ecologie et Evolution, 7 Quai St. Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>2</sup> IUFM de Paris – Université Sorbonne Paris IV, 10 rue Molitor, 75016 Paris, France.

Running title: Gestation costs in a viviparous lizard

**Article published** in Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences

# Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard

Josefa Bleu<sup>1,\*</sup>, Manuel Massot<sup>1</sup>, Claudy Haussy<sup>1</sup>  
and Sandrine Meylan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CNRS, UPMC, ENS—UMR 7625, Laboratoire Ecologie et Evolution, 7 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

<sup>2</sup>IUFM de Paris—Université Sorbonne Paris IV, 10 rue Molitor, 75016 Paris, France

Experimental studies have often been employed to study costs of reproduction, but rarely to study costs of gestation. Disentangling the relative importance of each stage of the reproductive cycle should help to assess the costs and benefits of different reproductive strategies. To that end, we experimentally reduced litter size during gestation in a viviparous lizard. We measured physiological and behavioural parameters during gestation and shortly after parturition, as well as survival and growth of females and their offspring. This study showed four major results. First, the experimental litter size reduction did not significantly affect the cellular immune response, the metabolism and the survival of adult females. Second, females with reduced litter size decreased their basking time. Third, these females also had an increased postpartum body condition. As postpartum body condition is positively related to future reproduction, this result indicates a gestation cost. Fourth, even though offspring from experimentally reduced litters had similar weight and size at birth as other offspring, their growth rate after birth was significantly increased. This shows the existence of a maternal effect during gestation with delayed consequences. This experimental study demonstrates that there are some costs to gestation, but it also suggests that some classical trade-offs associated with reproduction may not be explained by gestation costs.

**Keywords:** costs of reproduction; gestation; litter size reduction; maternal effect; surgery; viviparity

## 1. INTRODUCTION

Costs of reproduction are the trade-offs that exist between reproductive investment and survival and/or future reproduction [1,2]. In recent years, studies have focused on the ecological and physiological basis of these costs [3,4]. Such costs include increased oxidative stress (e.g. [5]) and metabolism (e.g. [6]), impaired immune function, and decreased growth, energy stores (e.g. [7]) and endurance (e.g. [8]). Reproductive effort can also have intergenerational effects: offspring quality may decrease when reproductive investment increases, owing to a trade-off between offspring number and quality [2]. Experiments have shown the existence of such a trade-off in mammals, reptiles and birds. For example, offspring from enlarged litters [9,10] or miniaturized eggs [11] have been shown to have a lower survival [10,11], be more stressed and have a lower immune performance [9]. Therefore, parental reproductive effort is linked to offspring quality. Moreover, small offspring can show a period of accelerated growth to compensate for their small initial size, but this catch-up growth may adversely affect several traits during their lifetime [12].

Different stages of the reproductive cycle may be associated with different costs. For example, in mammals, lactation is more costly than gestation (e.g. [13–16]), and in birds, most studies have investigated the costs associated

with chick rearing, although egg production and incubation also incur fitness costs [17]. Disentangling the relative importance of each stage may be important to assess the costs and benefits of different reproductive strategies. Viviparity (live-bearing) has evolved from oviparity (egg-laying) many times independently in vertebrates, and can be found in fishes, amphibians, mammals and squamate reptiles (lizards and snakes) [18]. Among squamate reptiles, viviparity has evolved more than 100 times independently [18]. This group is particularly well-suited for the study of gestation costs because: (i) viviparity has evolved relatively recently, and oviparous and viviparous females can even be found in the same species [18]; (ii) in most species, there is no parental care [19]; and (iii) most nutrients for embryo development are provided in the egg yolk (lecithotrophic viviparity [18]). Thus, the cost of resource investment in terms of egg and litter size and the cost of gestation can be decoupled.

Gestation costs in viviparous squamates may be attributed to an increase in metabolism, a shift in thermal preference and locomotor impairment [20–23]. It is also possible that some trade-offs documented between reproductive investment and other functions (e.g. immune function) may be explained by the effort during gestation. The study of gestation costs is generally based on comparisons between reproductive and non-reproductive females, or between reproductive and post-reproductive females [20–23]. However, in the first comparison, females may differ according to other variables than their reproductive state. In reptiles, non-reproductive females often have

\* Author for correspondence (josefa.bleu@snv.jussieu.fr).

Electronic supplementary material is available at <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2011.0966> or via <http://rspb.royalsocietypublishing.org>.

lower body condition than reproductive females (e.g. [24]), for example owing to poor health or because they belong to a different age class. When comparing performances of the same female before and after parturition, other confounding effects arise, such as seasonal variation in traits. More importantly, in all of these studies, differences in reproductive investment among females with different litter size are not independent of other differences among these females. For example, we can measure a positive correlation between reproductive investment and immune function, even if a trade-off (i.e. a negative correlation) exists between these traits, because they are both correlated with another female trait (such as resource-acquisition efficiency) [25,26]. Thus, without experiments, we cannot make definitive conclusions regarding causality. This is why the production of experimental phenotypes has dramatically enhanced the understanding of life-history evolution [27,28]. For example, it has been used to study clutch size and reproductive investment [29–34], but, to our knowledge, it has never been used to specifically investigate gestation costs. The rare experiments dealing with gestation costs have consisted in applying an experimental burden to non-reproductive females to investigate the causes of the decrease in locomotor performances during gestation [21,35].

The lack of experimental approaches motivated our study, in which we experimentally reduced litter size during gestation. The aim of this study was to assess behavioural, physiological and survival gestation costs of large litters, and to test whether litter size during gestation has inter-generational effects in a short-lived viviparous lizard, *Zootoca vivipara*. To this end, we surgically removed one of the two oviducts ('half-hysterectomy') of pregnant common lizard females. Costs of reproduction have already been studied in this species. Normal gestation is associated with a decrease in locomotor performance and a selection of lower body temperatures [36]. An effect of the treatment on female traits would reveal gestation costs of large litters, whereas an effect of the initial litter size (litter size before surgery) would suggest vitellogenesis costs (i.e. a correlation with the initial investment of the female). We specifically addressed the following questions. (i) Can we detect some physiological functions affected by gestation of large compared with small litters? If gestation is costly, we expect a higher immune response, a higher postpartum body condition and a lower metabolic rate in females with reduced litter size compared with control females. We did not expect a change in the thermoregulatory behaviour after litter size manipulation because remaining embryos may still have the same thermal requirements. (ii) Is there a survival cost of gestation of large compared with small litters? If this cost exists, females with a reduced litter size would have a better survival than the other females. (iii) Are offspring larger at birth when litter size is reduced? Indeed, a female might transfer additional nutrients to the developing embryos (e.g. calcium [37]), or space might be a constraint on offspring development. (iv) Is there an effect of litter size reduction during gestation on the survival and growth of offspring?

## 2. MATERIAL AND METHODS

### (a) *Model species*

*Zootoca vivipara* is a small (45–70 mm adult snout–vent length, SVL) ground-dwelling lizard, widely distributed across Eurasia.

It includes both oviparous and viviparous reproductive forms in allopatric populations [38]. We studied viviparous populations located in the Massif Central mountain range (southeastern France). In this area, activity starts for adult males around mid-April and for adult females in early May. Mating may occur as early as 0–3 days after female emergence, and reproductive investment (vitellogenesis) occurs on average during the first three weeks of activity [39]. During gestation, a primitive chorioallantoic placenta allows respiratory, aqueous and mineral exchanges between mother and embryos [37,40]. Parturition occurs when embryos are fully developed, after an average gestation period of two months. The mean litter size is 5 (range from 1 to 12). Live offspring hatch immediately from their soft-shelled eggs and are thereafter autonomous. Lizards enter into hibernation gradually in late September.

### (b) *Capture and rearing conditions*

We captured 56 and 46 pregnant females in mid-June 2009 and 2010, respectively, at Mont-Lozère (1420 m a.s.l., 44°23'01" N, 3°52'18" E). Females were marked by toe-clipping and brought to a field laboratory until parturition (mid-July to early August). Females were kept in individual terraria (18 × 12 × 12 cm) with a shelter, first with damp soil as substrate, and then with paper (see below). A 25 W spotlight provided opportunities for thermoregulation for 6 h daily (from 09.00 to 12.00 h and from 14.00 to 17.00 h), creating a thermal gradient from 24.7°C to 37.4°C in the terrarium. Water was provided *ad libitum* and one *Pyralis* sp. larva (average live weight  $\pm$  s.d. = 0.189  $\pm$  0.051 g,  $n$  = 30; average dry weight  $\pm$  s.d. = 0.075  $\pm$  0.025 g,  $n$  = 30) was offered per week. Immediately after parturition, mothers and their offspring were separated and measured. Within 4 days, the females were released at their capture point and offspring were released randomly at four different points on the site. Experimental procedures and rearing conditions were identical for both experimental years.

### (c) *Experimental treatment: litter size reduction during gestation*

Females were randomly allocated to each treatment group: operated females from which approximately half of the eggs were removed, hereafter called litter-reduced (LR) females ( $n$  = 30 in 2009 and  $n$  = 12 in 2010); sham-operated females from which no eggs were removed, hereafter called sham (S) females ( $n$  = 11 in 2009 and  $n$  = 10 in 2010); and control females that were not manipulated, hereafter called control (C) females ( $n$  = 15 in 2009 and  $n$  = 24 in 2010). The S females allowed us to control for the effect of surgery. The experimental groups did not differ in SVL, body weight or average litter size at the beginning of the experiment (all  $p$  > 0.14). The manipulation was performed around mid-gestation (embryos removed were at stages 29–34 [41]).

Manipulated (LR and S) females were anaesthetized for about 15 min, inhaling 3 per cent isoflurane (Forene, Abbott, France), wiped with 70 per cent ethanol on the abdomen and placed on a sterile surgical board. A 10–15 mm-long incision was made 5 mm laterally of the mid-ventral line. For LR females, one of the two oviducts was lifted out of the incision by gently pressing the abdomen and cut (half-hysterectomy) to remove eggs. The oviducts of S females were not manipulated. Females were sutured using a surgical thread (coated Vicryl Rapide, Covéto, France; reference 665593) and wiped with Betadine (povidone-iodine). They were allowed to wake up in a separate room in a terrarium with paper as substrate



and were brought back to the rearing room when completely awake, about 30 min after surgery. From then on, all females were kept with paper as the substrate (to prevent infection and healing problems after surgery).

#### (d) Short-term effect of litter size reduction

##### (i) Behaviour

One week after the treatment, the activity of each lizard was measured seven times by a naive observer over 5 days, one or two times per day between 10.00 and 11.00 h or 15.00 and 16.00 h. The observer noted whether the lizard was sheltering (under the shelter or the substrate, i.e. the paper), full-basking or half-basking (the head under the light and the rest of the body hidden; as described in the study of Cote *et al.* [42]). We distinguished half-basking from full-basking as the behaviours may differ in thermoregulatory efficiency (female body temperature) or 'predation risk'.

##### (ii) Metabolism

Standard metabolic rate (SMR) was measured on average 5 days before parturition for a subset of females from each treatment (2009:  $n = 15$  (LR), 7 (S), 8 (C); 2010:  $n = 5$  (LR), 7 (S), 15 (C)). SMR was measured as the minimum rate of oxygen consumption under post-absorptive conditions in the inactive phase of the daily cycle [43]. We measured the volume of dioxygen consumed per mass unit and per time unit ( $\text{ml O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). This methodology assumes a constant ratio between energy production and oxygen consumption, a condition currently accepted [44]. Oxygen consumption was measured using an open airflow respirometer from Sable Systems (Las Vegas, NV, USA), comprising a two-channel pump PP-2, two mass flow controller electronic units MFC-2, an eight-channel multiplexer TR-RM8, an FC-10a Oxygen analyser and the subsampler/pump/mass flow meter unit TR-SS3. We placed animals individually in 200 ml darkened chambers with airflow of  $20 \text{ ml min}^{-1}$ . Oxygen consumption was measured at room temperature every minute over 30 min. The temperature could not be controlled and was on average  $29.0^\circ\text{C}$  (s.d. =  $1.7^\circ\text{C}$ ). The volume of oxygen consumed by each animal was calculated from the difference between the oxygen rate in the ambient air and that at the exit of the chamber. The value used for each individual was the minimal measurement. All lizards had been deprived of food for at least 3 days before the measurements and were placed inside the chamber at least 1 h before the beginning of the observations to acclimate.

##### (iii) Proinflammatory potential

Immunocompetence was estimated after parturition with the phytohaemagglutinin-induced skin-swelling test. Phytohaemagglutinin (PHA) swelling response is complex, including both innate and adaptive components of the immune system [45,46]. Thus, PHA swelling response is not solely based on T-cell proliferation; it evaluates the general ability of an individual to mount an inflammatory response [45]. One day after parturition, we injected subcutaneously 0.04 ml of a solution of phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; reference D5773) containing  $2.5 \text{ mg ml}^{-1}$  of PHA (Sigma-Aldrich; reference L8754) in the right posterior leg (2009:  $n = 27$  (LR), 10 (S), 14 (C); 2010:  $n = 12$  (LR), 9 (S), 23 (C)). Differences in sample sizes reflect a missing value. Before and 12 h after the injection, we measured thickness of the leg to the nearest 0.01 mm with a spessimeter (ID-C Absolute Digimatic, Mitutoyo, France; reference 547-301). PHA swelling

response was calculated as the change in thickness of the leg between the two measurements.

##### (iv) Corticosterone measurement

Surgery can be stressful for females. It has been shown previously that a prolonged increase of maternal stress during gestation modified the overall offspring phenotypes ([47] and references therein). Thus, two weeks after the manipulation, we checked whether LR and S females were more stressed than the C females by measuring circulating blood levels of corticosterone (2009:  $n = 15$  (LR), 7 (S), 9 (C); 2010:  $n = 11$  (LR), 10 (S), 23 (C)). Differences in sample sizes reflect a missing value owing to insufficient blood volume. Blood samples (40–60  $\mu\text{l}$  whole blood) were collected from the post-orbital sinus using two to three 20  $\mu\text{l}$  microhaematocrit tubes. They were taken within 3 min of the removal of an animal from its cage to avoid handling-induced increases in plasma corticosterone levels [48]. Blood samples were centrifuged. The plasma was transferred to 0.5 ml Eppendorf tubes and stored in a freezer at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Corticosterone was assayed using a competitive enzyme immunoassay with corticosterone EIA kits (IDS, France; reference AC-14F1).

##### (e) Reproductive traits

Parturition dates, realized fecundity (litter size at parturition) and litter success were recorded. Initial fecundity was calculated as the sum of the realized fecundity and the number of eggs removed by surgery. Live offspring ( $n = 335$ ) were marked by toe-clipping, measured for SVL (to the nearest millimetre), weighed (to the nearest milligram) and sexed by ventral scale count [49]. Females were weighed after parturition.

##### (f) Delayed effect of litter size reduction on growth and survival

After being released in the field, some offspring and adult females belonging to the 2009 cohort were recaptured in September of the year of release and in June of the following year (table 1). The number of days of recapture was equal during these two recapture sessions (11 days). At each recapture, we weighed adults and measured all individuals. Juvenile growth rates before hibernation were calculated as the change in SVL (SVL at recapture – SVL at birth) divided by the time interval (date of recapture – date of birth). Adult weight gain before hibernation was calculated as the change in weight (weight at recapture – postpartum weight) divided by the time interval (date of recapture – parturition date).

##### (g) Statistical analyses

All models were implemented in R 2.13.0 statistical software (<http://cran.r-project.org/>). They included the following additive fixed effects: (i) treatment; (ii) female SVL; (iii) initial fecundity corrected for female SVL (standardized initial fecundity), which represents the effect of the initial investment of females; (iv) parturition date, because females may differ depending on their reproductive stage; and (v) their first-order interactions with treatment. The random part included a year effect. Models were simplified using backward elimination of the non-significant terms. For the behaviours, we first analysed the proportion of time spent basking (half- or full-basking), and then we analysed the proportion of time spent full-basking when the lizard was basking. These analyses were conducted with mixed-effects

Table 1. Sample sizes during the recapture sessions. Individuals from the experiment conducted in 2009 were recaptured at two different times: in September of the same year (before hibernation) and in June of the following year. The numbers of identified recaptured individuals are indicated.

	adult females			juveniles		
	July–August 2009 (release)	September 2009 (recapture)	June 2010 (recapture)	July–August 2009 (release)	September 2009 (recapture)	June 2010 (recapture)
C						
female	11	4	5	22	1	7
male				36	5	5
S						
female	11	2	3	19	4	5
male				28	5	5
LR						
female	30	13	13	23	6	6
male				43	9	8
total	52	19	21	171	30	36

logistic regressions including a binomial error term (*lmer* procedure). Parameters were estimated with a Laplace approximation of the maximum likelihood, and fixed effects were tested with  $\chi^2$ -tests [50]. Litter success was analysed as a binomial variable (litters with all viable offspring versus litters with at least one failure) with a logistic regression including a binomial error term. Corticosterone levels, metabolism, postpartum female body condition, PHA response, parturition dates, SVL and body condition at birth of offspring were analysed with mixed effects linear models (*lme* procedure). Parameters were estimated with the restricted maximum-likelihood approach and fixed effects were tested with marginal *F*-tests [51]. The analysis of parturition dates included only an effect of the treatment and of female SVL. The analysis of metabolism also included an effect of the measurement chamber and an effect of the room temperature during measurement, because metabolism is affected by temperature. SVL of offspring at birth also included an effect of offspring sex. Offspring body condition at birth also included an effect of offspring sex and of offspring SVL. The random part of those two models included a maternal identity effect nested in the year effect.

Juvenile growth rates and adult weight gain before hibernation were analysed with linear models (*lm* procedure). We tested the following fixed effects: (i) experimental treatment, (ii) standardized initial fecundity and (iii) parturition date or birth date. For the analysis of juvenile growth rate, we also included juvenile sex and initial SVL to control for decelerating growth curves [52]. For the analysis of adult weight gain, we also included female SVL. However, the weight gain may also depend on the postpartum body condition (postpartum weight corrected for female SVL) of the female. As postpartum body condition and the experimental treatment are correlated (see §3), their effects cannot be tested in the same model. Thus, adult weight gain was analysed with two models, one including the treatment and one including the postpartum body condition. For those models, we did not test interactions because of the small sample sizes.

The assumptions of normality and homogeneity of variances were checked for all models. In one analysis (offspring body condition at birth) we detected heterogeneity of variances across the experimental groups. This heteroscedasticity was corrected using the *varIdent* function in the *lme* procedure [51].

#### (i) Survival analyses

We performed separate survival analyses for adult females, juvenile males and juvenile females. Survival estimates were obtained independently of capture probabilities, using a capture–mark–recapture method based on the open population model of Cormack–Jolly–Seber. This model produces apparent survival estimates resulting from mortality and emigration. We tested the effect of the treatment and of the standardized initial fecundity in separate analyses. The standardized initial fecundity was transformed in a categorical variable: high (positive residuals) or low (negative residuals) standardized initial fecundity. We used the program MARK v. 6.0 to fit models [53], and models were compared with the Akaike information criterion corrected for small sample size (AICc [53]). The best model is the one most consistent with the data while using the fewest number of parameters (i.e. giving the lowest AICc). It is considered that two models differ when their difference of AICc is higher than 2 [54]. The goodness-of-fit of the time-dependent Cormack–Jolly–Seber models were tested with the bootstrap procedure (1000 simulations) provided by the program MARK [53], and we did not find significant over-dispersion in the data (all  $p > 0.11$ ).

### 3. RESULTS

Our treatment reduced litter size by 49.6 per cent (s.e. = 11.4%, range = 25–80%). On average, LR females gave birth to 2.37 (s.e. = 0.21) fewer offspring compared with C and S females. Our treatment had no effect on litter success ( $\chi^2 = 4.61$ ,  $p = 0.10$ ), which was only negatively related to female SVL ( $\chi^2 = 4.16$ ,  $p = 0.042$ ). We had 35 per cent of the litters with at least one failure. Our treatment had no effect on parturition dates ( $F_{2,96} = 0.38$ ,  $p = 0.686$ ).

#### (a) Short-term effects of litter reduction on female performances

##### (i) Behaviour and physiological measurements

The proportion of time spent basking was not significantly affected by the treatment ( $\chi^2 = 3.10$ ,  $p = 0.21$ ), and it depended only positively on female SVL ( $\chi^2 = 6.71$ ,  $p = 0.0096$ ) and parturition date ( $\chi^2 = 23.90$ ,  $p < 0.001$ ). Three females (two C and one S) were always

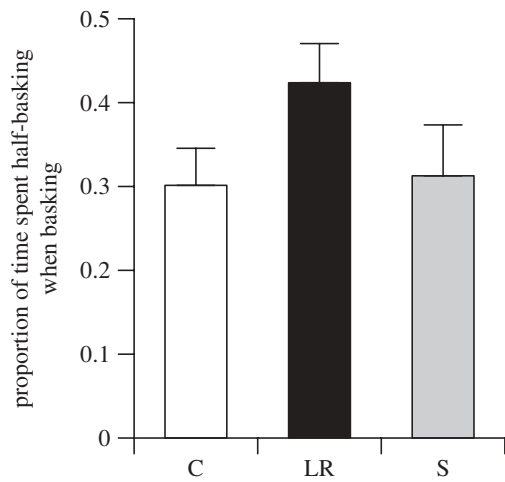


Figure 1. Mean ( $\pm$  s.e.) proportion of time spent half-basking when the female was basking per treatment group. Pairwise comparisons showed that LR females spent more time half-basking than S females ( $p = 0.0027$ ) and C females ( $p = 0.0022$ ). S and C females were similar ( $p = 0.65$ ).

sheltering and were thus not included in the following analysis of the basking behaviour. The treatment significantly affected the proportion of time spent full-basking when the female was basking ( $\chi^2 = 12.71$ ,  $p < 0.001$ ). When basking, LR females spent more time half-basking than the other females (figure 1). The proportion of time spent full-basking when the female was basking did not significantly depend on parturition date ( $\chi^2 = 0.002$ ,  $p = 0.96$ ) or female size ( $\chi^2 = 0.17$ ,  $p = 0.68$ ). In none of these models were the interactions significant (all  $p > 0.22$ ) nor was the standardized initial fecundity (all  $p > 0.07$ ). Metabolism, corticosterone levels and PHA responses were not affected by the treatment (table 2).

#### (ii) Reproductive traits

Postpartum body condition (body mass statistically controlled for SVL) was influenced by the treatment ( $F_{2,96} = 6.03$ ,  $p = 0.0034$ ). LR females were more corpulent than S and C females (figure 2). Moreover, female postpartum body condition was negatively correlated with standardized initial fecundity ( $F_{1,96} = 6.44$ ,  $p = 0.013$ ). Interactions and parturition date were not significant (all  $p > 0.27$ ). Concerning juvenile characteristics, body condition at birth was not affected by the treatment ( $F_{2,87} = 1.41$ ,  $p = 0.25$ ). Offspring body condition at birth was negatively correlated with female standardized initial fecundity ( $F_{1,90} = 24.91$ ,  $p < 0.0001$ ), and male offspring were more corpulent than females ( $F_{1,240} = 15.21$ ,  $p < 0.0001$ ). The other variables tested or the interactions were not significant (all  $p > 0.11$ ). We observed the same pattern for offspring size: there was no effect of the treatment ( $F_{2,88} = 1.25$ ,  $p = 0.29$ ), but a significant effect of female standardized initial fecundity ( $F_{1,90} = 8.75$ ,  $p = 0.0039$ ) and sex ( $F_{1,241} = 93.23$ ,  $p < 0.0001$ , males are shorter).

#### (b) Delayed effects on adult females and juveniles

##### (i) Adult weight gain and survival

Female weight gain between parturition and hibernation was neither dependent on the treatment ( $F_{2,14} = 0.17$ ,

$p = 0.69$ ) nor on postpartum body condition ( $F_{1,16} = 0.64$ ,  $p = 0.44$ ). Moreover, it was not affected by the date of parturition or SVL (all  $p > 0.40$ ). For the survival analysis regarding the experimental treatment, our best model included a time and a treatment effect (best AICc for model  $\Phi_{\text{time+treatment}}$  and  $p_{\text{time}}$ ; electronic supplementary material, S1A). S females had a lower probability of survival ( $0.36 \pm \text{s.e.} = 0.18$ ) than LR ( $0.89 \pm \text{s.e.} = 0.16$ ) and C ( $0.85 \pm \text{s.e.} = 0.22$ ) females. However, other models, with no effect of the treatment, had the same support in the data (electronic supplementary material, S1A). A specific likelihood-ratio test showed a marginally significant difference between the best model and a model dependent on time only ( $\chi^2 = 5.35$ ,  $p = 0.069$ ). Regarding the standardized initial fecundity, female survival before hibernation was not affected by this trait (see electronic supplementary material, S1B).

##### (ii) Juvenile growth rates and survival

Juveniles' growth before hibernation was dependent on the treatment of their mother ( $F_{2,27} = 4.40$ ,  $p = 0.022$ ), with juveniles from LR females exhibiting faster growth (figure 3). All the other variables tested were non-significant ( $p > 0.20$ ). Survival of juvenile males before hibernation was not dependent on the standardized initial fecundity (electronic supplementary material, S2A) nor on the maternal treatment (electronic supplementary material, S3A). Survival of juvenile females was also independent of maternal standardized initial fecundity (best AICc for model  $\Phi_{\text{time}}$  and  $p_{\text{time}}$ ); however, other models had comparable AICc (electronic supplementary material, S2B). Specific likelihood-ratio tests showed no difference between the best model ( $\Phi_{\text{time}}$  and  $p_{\text{time}}$ ) and other models ( $\chi^2 = 1.42$ ,  $p = 0.23$  for  $\Phi_{\text{time+fecundity}}$  and  $p_{\text{time}}$ ,  $\chi^2 = 1.39$ ,  $p = 0.24$  for  $\Phi_{\text{time}}$  and  $p_{\text{time+fecundity}}$ ). When we tested the effect of the treatment, we found an effect (best AICc for model  $\Phi_{\text{time}}$  and  $p_{\text{treatment+time}}$ ; electronic supplementary material, S3B). This model was significantly different from the model with no effect of the treatment ( $\chi^2 = 6.18$ ,  $p = 0.046$ ). Juvenile females seemed to have different capture probabilities depending on their treatment (C =  $0.069 \pm \text{s.e.} = 0.069$ , S =  $0.31 \pm \text{s.e.} = 0.16$ , LR =  $0.48 \pm \text{s.e.} = 0.19$ ).

## 4. DISCUSSION

We experimentally studied gestation costs in a viviparous lizard, using half-hysterectomy surgery, which consists of reducing the litter size by half. The act of surgery did not affect any of the traits analysed (sham-operated and control females were similar), and neither surgery nor egg removal affected litter success. Moreover, despite a definitive ablation, LR females were still able to breed the following year (11 LR females from the 2009 experiment were recaptured in 2010 and kept in the laboratory until parturition: their mean litter size was 3.0). Thus, we are confident that our treatment had no deleterious effects on gestation and reproduction abilities.

This study showed four major results concerning litter size reduction during gestation. First, litter size reduction did not significantly influence survival, cellular immune response and metabolism of the adult females. Second, we observed that the females with a reduced litter

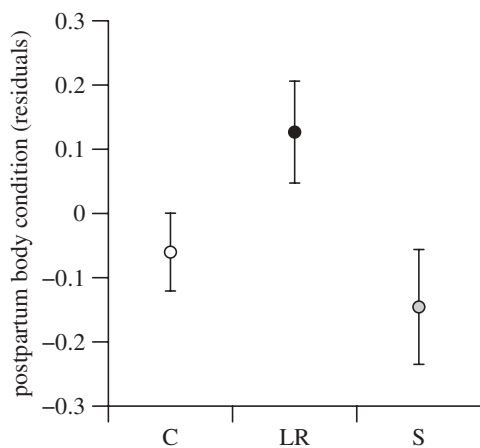


Figure 2. Mean ( $\pm$ s.e.) female body condition after parturition (residuals from a regression between female body weight and female SVL) per treatment group. LR females were more corpulent than S females ( $p = 0.0011$ ) and C females ( $p = 0.0338$ ). S and C females were similar ( $p = 0.1335$ ).

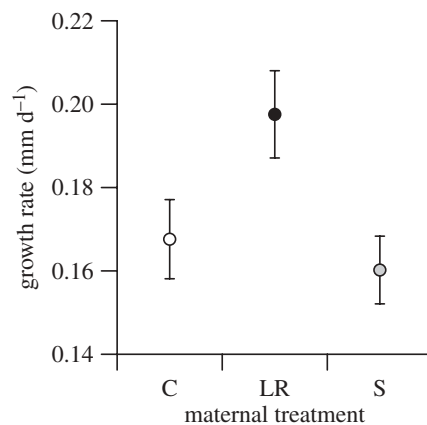


Figure 3. Mean ( $\pm$ s.e.) juvenile growth rates ( $\text{mm d}^{-1}$ ) before hibernation per maternal treatment group. Pairwise comparisons showed that juveniles from LR females had a higher growth rate than juveniles from S females ( $p = 0.011$ ) and than juveniles from C females ( $p = 0.064$ , marginally significant). Juvenile growth rates of juveniles from S and C females were similar ( $p = 0.64$ ).

Table 2. Physiological parameters. Effect of treatment, female size (SVL), standardized initial fecundity, parturition date and room temperature (when relevant; see §2g) on the metabolism, the corticosterone levels and the PHA response. The interactions are not shown but have been tested and were not significant (all  $p > 0.12$ ). Non-significant effects were eliminated sequentially; thus, in this table, we show the tests of the effects during model selection. Significant effects are in bold ( $p < 0.05$ ), marginally significant effects are underlined ( $p < 0.10$ ).

	treatment	SVL	standardized initial fecundity	parturition date	room temperature
metabolism	$F_{2,50} = 0.88$ , $p = 0.420$	$F_{1,52} = 1.56$ , $p = 0.218$	$F_{1,45} = 0.72$ , $p = 0.402$	<b><math>F_{1,53} = 7.04</math>,</b> <b><math>p = 0.011</math></b>	<b><math>F_{1,53} = 14.80</math>,</b> <b><math>p &lt; 0.001</math></b>
corticosterone level	$F_{2,69} = 1.68$ , $p = 0.194$	$F_{1,68} = 0.87$ , $p = 0.353$	$F_{1,71} = 2.29$ , $p = 0.135$	<u><math>F_{1,72} = 3.18</math>,</u> <u><math>p = 0.079</math></u>	—
PHA response	$F_{2,88} = 1.60$ , $p = 0.207$	<u><math>F_{1,91} = 3.47</math>,</u> <u><math>p = 0.066</math></u>	$F_{1,90} = 2.10$ , $p = 0.151$	<b><math>F_{1,91} = 5.87</math>,</b> <b><math>p = 0.017</math></b>	—

changed their thermoregulatory behaviour. Third, they also had an increased postpartum mass. Fourth, even though offspring from experimentally reduced litters had similar weight and size at birth to other offspring, their growth rate before hibernation was significantly increased. We discuss those results in the context of reproductive cost.

#### (a) Survival cost and physiological adjustments

Survival has been shown to be influenced by reproductive effort, as suggested by experimental yolkectomy in reptiles [7,8,30,55], and specifically in the common lizard by a study showing that a higher investment in reproduction early in life is correlated with a shorter lifespan [56]. We could expect reduction of litter size during gestation to induce an increase in survival. Yet we observed no effect of our manipulation on survival. First, this result may be an artefact owing to our small sample sizes at recapture. Second, this could indicate that most of the reproduction cost on female survival is associated with vitellogenesis. This hypothesis is also supported by a study of oviparous and viviparous female, *Lerista bougainvillii* [57]. This study showed that survival rates after reproduction were similar for both reproductive modes in outdoor enclosures

[57]. An experiment combining a manipulation of the reproductive effort during vitellogenesis and gestation in a viviparous lizard will be necessary to test this hypothesis.

We also found that the proinflammatory potential was not modified. PHA swelling response may be correlated with individual quality and is traded off with other functions [58], such as reproduction (recent experimental evidence [7]). In our study, the proinflammatory potential was not affected by our manipulation, suggesting that females with a reduced litter did not invest more energy in the part of the immune system triggered by the PHA swelling test. Gestation is also usually associated with an increase in the metabolic rate, for two reasons: embryos are metabolically active, and maternal physiology is changed to support the litter (this is called the maintenance cost of gestation [20]). However, mass-independent metabolism may be independent of litter size, as shown in a viper [22]. In our study, mass-independent metabolism was not different among females. This result therefore suggests that the maintenance cost of gestation is independent of litter size.

Contrary to survival rates, immune response and metabolism, thermoregulatory behaviour was significantly affected by litter size reduction. Females adjust (i.e. increase or decrease) their body temperatures during

gestation to optimize embryonic development [19]. In *Z. vivipara*, pregnant females select lower body temperatures than non-pregnant females or males, both in a thermal gradient [36] and in the field [59]. This selection for lower temperatures may allow females to avoid too high temperatures (which may have detrimental effects on their embryos [60,61]) and/or to reduce the risk of predation. Considering constraints on embryos, we predicted that our experimental litter size reduction would not affect the thermoregulatory behaviour of females. Indeed, the embryos have the same thermal requirements whatever their number, as previously observed in a viper and in *Z. vivipara* (females selected temperatures independently of their litter mass [22,36]). Surprisingly, we showed that females with a reduced litter size spent more time in half-basking than control and sham females. The half-basking strategy is thought to be less efficient than the full-basking one. However, this does not imply that females using this strategy have a different temperature. Indeed, females with a reduced litter size are lighter, so their surface to volume ratio is higher than control females. They may thus heat faster [62] and need less basking time to reach the optimal temperatures for the embryos. In reptiles, and more particularly in the common lizard, gestation length is influenced by maternal thermoregulation [63]. As parturition dates were not different between females, it reinforces the idea that they did not select different temperatures. Finally, half-basking also reduces the exposure to predators. If this result also applies in a natural environment, females with reduced litter size may show an increased survival.

#### **(b) Future reproductive cost and female body condition**

We observed that females with a reduced litter size were more corpulent after parturition. As females with a reduced litter size have fewer embryos to carry and maintain, they may allocate more energy to their own maintenance and growth. Another explanation could be that females have different feeding rates. Indeed, pregnant females have a digestive tract more constrained than non-reproductive females, and eat less (e.g. [57]). However, this hypothesis is not supported by our data, as the number of larvae eaten was not different among females ( $F_{2,98} = 0.94$ ,  $p = 0.39$ ). Corpulence is an essential aspect of female future reproductive effort because common lizard females breed annually and postpartum body condition is positively correlated with litter size of the following year (J. Bleu, J.-F. Le Galliard, P. S. Fitze, S. Meylan & M. Massot 2011, unpublished data). Females with a reduced litter size, which are able to reach a higher corpulence after parturition, may thus be able to invest more in their future reproduction.

Another observation of our study is that the investment at vitellogenesis (i.e. initial fecundity) was negatively correlated with female postpartum mass, independently of female treatment. Vitellogenesis requires a large amount of resources, mainly fat [64]. The fact that females were not able to compensate entirely for their investment during vitellogenesis suggests that egg investment is an important cost of reproduction, in particular as not even females with reduced litter size compensated for their initial investment. In our lecithotrophic viviparous

species, the cost of egg investment and gestation can be decoupled. This is not the case in other viviparous species that ovulate small eggs and that transfer nutrients to their embryos during gestation, as in mammals and some reptiles. Moreover, in mammals, nutrients are also invested after birth in the offspring during lactation. This may explain why, in mammals, studies have focused on the cost of lactation [13–16,65–67] or on the total cost of reproduction [31,32]. Nevertheless, it seems that the investment in the offspring is more costly than the production of the offspring (i.e. vitellogenesis is more costly than gestation in lecithotrophic viviparous species, and lactation is more costly than gestation in mammals).

#### **(c) Intergenerational costs of gestation**

Juvenile size and weight at birth were not dependent on litter size reduction and were only correlated with initial fecundity. First, this suggests that space is not a constraint on embryo development, because embryos from operated females had more space available but did not become larger juveniles. A previous study on the same species has also suggested that space is not a constraint [68]. Furthermore, juvenile characteristics could depend on the amount of nutrients received. Even though most nutrients necessary for embryo development are provided in the egg yolk (during vitellogenesis), some other nutrients, such as calcium, are transferred by the mother during gestation [37]. Embryos of reduced litters may receive more of those transferred nutrients. As juveniles from reduced litters were not significantly larger, we have no concrete evidence that they received more nutrients.

Interestingly, juveniles from females with a reduced litter size grew faster between birth and hibernation. First, juveniles from reduced litters may have stored more nutrients and exploited those extra reserves after birth. This hypothesis is only applicable to nutrient stores that are not detectable through a measure of size or weight, such as a calcium store. Second, maternal effects may have also modified behavioural offspring traits, such as foraging strategy (active versus sit-and-wait foraging) or the ability to catch prey. Indeed, maternal effects during gestation can affect the whole offspring phenotype, including offspring behaviour (e.g. [69]). Third, in wild populations, the environmental conditions experienced by the mother during gestation can affect the growth rate of the juvenile after birth. In particular, juvenile growth rate is positively correlated with the amount of rainfall [63]. However, in our laboratory experiment, this parameter was fixed and cannot explain our observation.

Size has several implications for reptile life-history traits. There is a weak positive relationship between juvenile size and survival in the common lizard [63]; yet, in our study, juveniles from reduced litters did not show higher survival rates. Nevertheless, being larger gives undeniable advantages later in life as size is often correlated with age at maturity and with litter size for adult females [56,70]. Thus, if the difference in size persists long enough, juveniles from reduced litters may be more competitive adults. In any case, it is very hard to draw conclusions on the quality of juveniles from reduced litters with respect to their entire lifespan, because accelerated growth may also be associated with underlying physiological cost that will be expressed later in life, such as elevated metabolic rate in adulthood [71].

## 5. CONCLUSION

This experimental study reveals the existence of some gestation costs in a viviparous lizard. Litter size during gestation is associated with a decrease of female postpartum body condition, which is known to decrease the size of their subsequent litter. Moreover, females with reduced litters decrease their time spent exposed during thermoregulation, which might affect their survival during gestation in natural conditions. Furthermore, we have shown that offspring from reduced litters grow faster after birth. Thus, maternal effects during gestation can have delayed consequences and can shape their offspring phenotype after birth.

We are grateful to the Parc National des Cévennes and the Office National des Forêts for providing facilities during our field seasons. We thank the students who helped collecting data, especially Lydie Blottière, Adélaïde Roguet and Mélodie Tort. The Agence Nationale de la Recherche (ANR) (grant 07-BLAN-0217 to M.M.) and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (PhD grant to J.B.) supported this study. All experiments complied with the current laws of France.

## REFERENCES

- 1 Stearns, S. C. 1989 Trade-offs in life-history evolution. *Funct. Ecol.* **3**, 259–268. (doi:10.2307/2389364)
- 2 Roff, D. A. 2002 *Life history evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- 3 Zera, A. J. & Harshman, L. G. 2001 The physiology of life history trade-offs in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **32**, 95–126. (doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114006)
- 4 Harshman, L. G. & Zera, A. J. 2007 The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 80–86. (doi:10.1016/j.tree.2006.10.008)
- 5 Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. & Sorci, G. 2004 Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol. Lett.* **7**, 363–368. (doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00594.x)
- 6 Angilletta, M. J. & Sears, M. W. 2000 The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Funct. Ecol.* **14**, 39–45. (doi:10.1046/j.1365-2435.2000.00387.x)
- 7 Cox, R. M., Parker, E. U., Cheney, D. M., Liebl, A. L., Martin, L. B. & Calsbeek, R. 2010 Experimental evidence for physiological costs underlying the trade-off between reproduction and survival. *Funct. Ecol.* **24**, 1262–1269. (doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01756.x)
- 8 Miles, D. B., Sinervo, B. & Frankino, W. A. 2000 Reproductive burden, locomotor performance, and the cost of reproduction in free ranging lizards. *Evolution* **54**, 1386–1395. (doi:10.1111/j.0014-3820.2000.tb00570.x)
- 9 Ilmonen, P., Hasselquist, D., Langefors, Å. & Wiehn, J. 2003 Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. *Oecologia* **136**, 148–154. (doi:10.1007/s00442-003-1243-2)
- 10 Oksanen, T. A., Koivula, M., Koskela, E. & Mappes, T. 2007 The cost of reproduction induced by body size at birth and breeding density. *Evolution* **61**, 2822–2831. (doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00245.x)
- 11 Sinervo, B. 1999 Mechanistic analysis of natural selection and a refinement of Lack's and Williams's principles. *Am. Nat.* **154**, S26–S42. (doi:10.1086/303281)
- 12 Metcalfe, N. B. & Monaghan, P. 2001 Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol. Evol.* **16**, 254–260. (doi:10.1016/S0169-5347(01)02124-3)
- 13 Clutton-Brock, T. H., Albon, S. D. & Guinness, F. E. 1989 Fitness costs of gestation and lactation in wild mammals. *Nature* **337**, 260–262. (doi:10.1038/337260a0)
- 14 Michener, G. R. 1989 Reproductive effort during gestation and lactation by Richardson's ground squirrels. *Oecologia* **78**, 77–86. (doi:10.1007/BF00377200)
- 15 Künkele, J. 2000 Energetics of gestation relative to lactation in a precocial rodent, the guinea pig (*Cavia porcellus*). *J. Zool.* **250**, 533–539. (doi:10.1111/j.1469-7998.2000.tb00794.x)
- 16 Dufour, D. L. & Sauter, M. L. 2002 Comparative and evolutionary dimensions of the energetics of human pregnancy and lactation. *Am. J. Hum. Biol.* **14**, 584–602. (doi:10.1002/ajhb.10071)
- 17 Visser, M. E. & Lessells, C. M. 2001 The costs of egg production and incubation in great tits (*Parus major*). *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**, 1271–1277. (doi:10.1098/rspb.2001.1661)
- 18 Blackburn, D. G. 1999 Viviparity and oviparity: evolution and reproductive strategies. In *Encyclopedia of reproduction* (eds E. Knobil & J. D. Neill), pp. 994–1003. London, UK: Academic Press.
- 19 Shine, R. 2005 Life-history evolution in reptiles. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **36**, 23–46. (doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152631)
- 20 De Marco, V. & Guille, L. J. 1992 Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovi*). *J. Exp. Zool.* **262**, 383–390. (doi:10.1002/jez.1402620404)
- 21 Olsson, M., Shine, R. & Bak-Olsson, E. 2000 Locomotor impairment of gravid lizards: is the burden physical or physiological? *J. Evol. Biol.* **13**, 263–268. (doi:10.1046/j.1420-9101.2000.00162.x)
- 22 Ladyman, M., Bonnet, X., Lourdaux, O., Bradshaw, D. & Naulleau, G. 2003 Gestation, thermoregulation, and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: evidence for fecundity-independent costs. *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 497–510. (doi:10.1086/376420)
- 23 Lin, C.-X., Zhang, L. & 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. (doi:10.1016/j.zool.2007.06.005)
- 24 Naulleau, G. & Bonnet, X. 1996 Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. *Oecologia* **107**, 301–306. (doi:10.1007/BF00328446)
- 25 van Noordwijk, A. J. & de Jong, G. 1986 Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *Am. Nat.* **128**, 137–142. (doi:10.1086/284547)
- 26 Glazier, D. S. 1999 Trade-offs between reproductive and somatic (storage) investments in animals: a comparative test of the Van Noordwijk and De Jong model. *Evol. Ecol.* **13**, 539–555. (doi:10.1023/A:1006793600600)
- 27 Sinervo, B. & Huey, R. B. 1990 Allometric engineering: an experimental test of the causes of interpopulational differences in performance. *Science* **248**, 1106–1109. (doi:10.1126/science.248.4959.1106)
- 28 Sinervo, B., Zamudio, K., Doughty, P. & Huey, R. B. 1992 Allometric engineering: a causal analysis of natural selection on offspring size. *Science* **258**, 1927–1930. (doi:10.1126/science.258.5090.1927)
- 29 Sinervo, B. & Licht, P. 1991 Hormonal and physiological control of clutch size, egg size, and egg shape in side-blotched lizards (*Uta stansburiana*): constraints on the evolution of lizard life histories. *J. Exp. Zool.* **257**, 252–264. (doi:10.1002/jez.1402570216)
- 30 Sinervo, B. & DeNardo, D. F. 1996 Costs of reproduction in the wild: path analysis of natural selection and

- experimental tests of causation. *Evolution* **50**, 1299–1313. (doi:10.2307/2410670)
- 31 Oksanen, T. A., Jonsson, P., Koskela, E. & Mappes, T. 2001 Optimal allocation of reproductive effort: manipulation of offspring number and size in the bank vole. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**, 661–666. (doi:10.1098/rspb.2000.1409)
- 32 Oksanen, T. A., Koskela, E. & Mappes, T. 2002 Hormonal manipulation of offspring number: maternal effort and reproductive costs. *Evolution* **56**, 1530–1537. (doi:10.1111/j.0014-3820.2002.tb01463.x)
- 33 Cox, R. M. 2006 A test of the reproductive cost hypothesis for sexual size dimorphism in Yarrow's spiny lizard *Sceloporus jarrovi*. *J. Anim. Ecol.* **75**, 1361–1369. (doi:10.1111/j.1365-2656.2006.01160.x)
- 34 Cox, R. M. & Calsbeek, R. 2010 Severe costs of reproduction persist in *Anolis* lizards despite the evolution of a single-egg clutch. *Evolution* **64**, 1321–1330. (doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00906.x)
- 35 Shine, R. 2003 Effects of pregnancy on locomotor performance: an experimental study on lizards. *Oecologia* **136**, 450–456. (doi:10.1007/s00442-003-1281-9)
- 36 Le Galliard, J.-F., Le Bris, M. & Clobert, J. 2003 Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Funct. Ecol.* **17**, 877–885. (doi:10.1046/j.0269-8463.2003.00800.x)
- 37 Stewart, J. R., Eca, T. W. & Heulin, B. 2009 Calcium provision to oviparous and viviparous embryos of the reproductively bimodal lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *J. Exp. Biol.* **212**, 2520–2524. (doi:10.1242/jeb.030643)
- 38 Surget-Groba, Y. et al. 2001 Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Mol. Phylogenet. Evol.* **18**, 449–459. (doi:10.1006/mpev.2000.0896)
- 39 Bauwens, D. & Verheyen, R. F. 1985 The timing of reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*: differences between individual females. *J. Herpetol.* **19**, 353–364. (doi:10.2307/1564263)
- 40 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. (XI)* **18**, 569–668.
- 41 Dufaure, J. P. & Hubert, J. 1961 Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Arch. Anat. Micros. Morphol. Exp.* **50**, 309–328.
- 42 Cote, J., Clobert, J., Montes Poloni, L., Haussy, C. & Meylan, S. 2010 Food deprivation modifies corticosterone-dependent behavioural shifts in the common lizard. *Gen. Comp. Endocrinol.* **166**, 142–151. (doi:10.1016/j.ygcen.2009.11.008)
- 43 Andrews, R. M. & Pough, F. H. 1985 Metabolism of squamate reptiles: allometric and ecological relationships. *Physiol. Zool.* **58**, 214–231.
- 44 Schmidt-Nielsen, K. 1997 *Animal physiology: adaptation and environment*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- 45 Vinkler, M., Bainová, H. & Albrecht, T. 2010 Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Funct. Ecol.* **24**, 1081–1086. (doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01711.x)
- 46 Tella, J. L., Lemus, J. A., Carrete, M. & Blanco, G. 2008 The PHA test reflects acquired T-Cell mediated immunocompetence in birds. *PLoS ONE* **3**, e3295. (doi:10.1371/journal.pone.0003295)
- 47 Meylan, S. & Clobert, J. 2005 Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. *Horm. Behav.* **48**, 44–52. (doi:10.1016/j.yhbeh.2004.11.022)
- 48 Dauphin-Villemant, C. & Xavier, F. 1987 Nychthemeral variations of plasma corticosteroids in captive female *Lacerta vivipara* Jacquin: influence of stress and reproductive state. *Gen. Comp. Endocrinol.* **67**, 292–302. (doi:10.1016/0016-6480(87)90183-3)
- 49 Lecomte, J., Clobert, J. & Massot, M. 1992 Sex identification in juveniles of *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia* **13**, 21–25. (doi:10.1163/156853892X00193)
- 50 Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H. & White, S. S. 2009 Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 127–135. (doi:10.1016/j.tree.2008.10.008)
- 51 Pinheiro, J. C. & Bates, D. M. 2000 *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. New York, NY: Springer.
- 52 Andrews, R. M. 1982 Patterns of growth in reptiles. In *Biology of the reptilia* (eds C. Gans & F. H. Pough), pp. 273–320. New York, NY: Academic Press.
- 53 White, G. C. & Burnham, K. P. 1999 Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* **46**, S120–S139. (doi:10.1080/00063659909477239)
- 54 Burnham, K. P. & Anderson, D. R. 1998 *Model selection and inference: a practical information-theoretical approach*. New York, NY: Springer.
- 55 Landwer, A. J. 1994 Manipulation of egg production reveals costs of reproduction in the tree lizard (*Urosaurus ornatus*). *Oecologia* **100**, 243–249. (doi:10.1007/BF00316951)
- 56 Massot, M., Clobert, J., Montes-Poloni, L., Haussy, C., Cubo, J. & Meylan, S. In press. An integrative study of ageing in a wild population of common lizards (*Lacerta vivipara*). *Funct. Ecol.* (doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01837.x)
- 57 Qualls, C. P. & Shine, R. 1998 Costs of reproduction in conspecific oviparous and viviparous lizards, *Lerista bougainvillii*. *Oikos* **82**, 539–551. (doi:10.2307/3546374)
- 58 Martin, L. B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J. R., Klasting, K. C. & Wikelski, M. 2006 Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Funct. Ecol.* **20**, 290–299. (doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x)
- 59 Heulin, B. 1987 Temperature diurne d'activité des mâles et des femelles de *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia* **8**, 393–400. (doi:10.1163/156853887X00162)
- 60 Maderson, P. F. A. & Bellairs, A. d'A. 1962 Culture methods as an aid to experiment on reptile embryos. *Nature* **195**, 401–402. (doi:10.1038/195401b0)
- 61 Mathies, T. & Andrews, R. M. 1997 Influence of pregnancy on the thermal biology of the lizard, *Sceloporus jarrovi*: why do pregnant females exhibit low body temperatures? *Funct. Ecol.* **11**, 498–507. (doi:10.1046/j.1365-2435.1997.00119.x)
- 62 Carrascal, L. M., López, P., Martín, J. & Salvador, A. 2010 Basking and antipredator behaviour in a high altitude lizard: implications of heat-exchange rate. *Ethology* **92**, 143–154. (doi:10.1111/j.1439-0310.1992.tb00955.x)
- 63 Le Galliard, J.-F., Marquis, O. & Massot, M. 2010 Cohort variation, climate effects and population dynamics in a short-lived lizard. *J. Anim. Ecol.* **79**, 1296–1307. (doi:10.1111/j.1365-2656.2010.01732.x)
- 64 Avery, R. A. 1974 Storage lipids in the lizard *Lacerta vivipara*: a quantitative study. *J. Zool.* **173**, 419–425. (doi:10.1111/j.1469-7998.1974.tb04124.x)
- 65 Speakman, J. R. 2008 The physiological costs of reproduction in small mammals. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**, 375–398. (doi:10.1098/rstb.2007.2145)
- 66 Bårdsen, B., Fauchald, P., Tveraa, T., Langeland, K. & Nieminen, M. 2009 Experimental evidence of cost of lactation in a low risk environment for a long-lived mammal. *Oikos* **118**, 837–852. (doi:10.1111/j.1600-0706.2008.17414.x)

- 67 Valencak, T. G., Tataruch, F. & Ruf, T. 2009 Peak energy turnover in lactating European hares: the role of fat reserves. *J. Exp. Biol.* **212**, 231–237. (doi:10.1242/jeb.022640)
- 68 Uller, T. & Olsson, M. 2005 Trade-offs between offspring size and number in the lizard *Lacerta vivipara*: a comparison between field and laboratory conditions. *J. Zool.* **265**, 295–299. (doi:10.1017/s0952836904006326)
- 69 Belliure, J., Meylan, S. & Clobert, J. 2004 Prenatal and postnatal effects of corticosterone on behavior in juveniles of the common lizard, *Lacerta vivipara*. *J. Exp. Zool. Part A* **301A**, 401–410. (doi:10.1002/jez.a.20066)
- 70 Uller, T. & Olsson, M. 2009 Offspring size and timing of hatching determine survival and reproductive output in a lizard. *Oecologia* **162**, 663–671. (doi:10.1007/s00442-009-1503-x)
- 71 Criscuolo, F., Monaghan, P., Nasir, L. & Metcalfe, N. B. 2008 Early nutrition and phenotypic development: ‘catch-up’ growth leads to elevated metabolic rate in adulthood. *Proc. R. Soc. B* **275**, 1565–1570. (doi:10.1098/rspb.2008.0148)



## ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIALS

**ESM1. Survival analysis and model selection in adult females.** AICc (Akaike Information Criterion corrected for small sample size) are reported for different models. We tested the effect of the capture session (time effect, t) and either (ESM1 A) the treatment (TRT) or (ESM1 B) the standardised initial fecundity (categorical effect of high or low fecundity, fec), alone or in combination, on the survival probability ( $\Phi$ ) and capture probability (p). The lowest and comparable values of AICc ( $\Delta\text{AICc} < 2$ ) are reported in bold.

<b>A) Treatment</b>						
	$\Phi$	TRT * t	TRT + t	TRT	t	constant
<b>p</b>						
TRT * t		149.22	149.22	152.40	150.09	150.09
TRT + t		149.22	145.44	149.11	145.32	145.44
TRT		150.81	145.64	147.47	145.72	<b>143.91</b>
t		144.62	<b>142.14</b>	144.36	<b>142.93</b>	<b>142.93</b>
constant		147.17	<b>142.34</b>	<b>142.92</b>	<b>143.13</b>	<b>142.22</b>
<b>B) Initial fecundity</b>						
	$\Phi$	Fec * t	Fec + t	Fec	t	constant
<b>p</b>						
Fec * t		149.35	149.35	149.35	147.00	147.00
Fec + t		149.35	146.96	146.96	144.68	144.79
Fec		149.76	147.37	146.07	145.10	<b>144.12</b>
t		147.41	145.12	145.15	<b>142.93</b>	<b>142.93</b>
constant		147.64	145.32	144.37	<b>143.13</b>	<b>142.22</b>

**ESM2. Survival analysis and model selection in juvenile males (A) and juvenile females (B).** AICc (Akaike Information Criterion corrected for small sample size) are reported for different models. We tested the effect of the capture session (time effect, t) and the maternal standardised initial fecundity (categorical effect of high or low fecundity, fec), alone or in combination, on the survival probability ( $\Phi$ ) and capture probability (p). The lowest and comparable values of AICc ( $\Delta\text{AICc} < 2$ ) are reported in bold.

<b>A) juvenile males</b>						
	$\Phi$	Fec * t	Fec + t	Fec	t	constant
<b>p</b>						
<b>Fec * t</b>	205.72	205.72	205.72	205.72	204.32	204.32
<b>Fec + t</b>	205.72	205.72	203.51	203.88	202.15	202.15
<b>Fec</b>	205.72	205.72	203.51	201.89	202.15	200.02
<b>t</b>	204.22	204.22	202.20	202.24	200.11	200.11
<b>constant</b>	204.28	204.28	202.22	200.11	200.11	<b>198.01</b>
<b>B) juvenile females</b>						
	$\Phi$	Fec * t	Fec + t	Fec	t	constant
<b>p</b>						
<b>Fec * t</b>	145.79	145.79	145.79	145.79	<b>143.60</b>	<b>143.60</b>
<b>Fec + t</b>	145.79	145.79	<b>144.14</b>	<b>144.76</b>	<b>143.73</b>	<b>144.24</b>
<b>Fec</b>	150.65	150.65	148.97	147.15	146.76	145.55
<b>t</b>	<b>143.49</b>	<b>143.49</b>	<b>143.69</b>	<b>144.15</b>	<b>142.89</b>	<b>142.89</b>
<b>constant</b>	148.30	148.30	146.89	145.21	<b>144.71</b>	<b>143.56</b>

**ESM3. Survival analysis and model selection in juvenile males (A) and juvenile females (B).** AICc (Akaike Information Criterion corrected for small sample size) are reported for different models. We tested the effect of the capture session (time effect, t) and the maternal treatment (TRT), alone or in combination, on the survival probability ( $\Phi$ ) and capture probability (p). The lowest and comparable values of AICc ( $\Delta\text{AICc} < 2$ ) are reported in bold.

<b>A) juvenile males</b>						
	$\Phi$	TRT * t	TRT + t	TRT	t	constant
<b>p</b>						
TRT * t		212.02	212.02	212.02	207.66	207.66
TRT + t		212.02	207.66	207.64	203.33	203.42
TRT		212.17	207.64	205.46	203.41	201.24
t		208.10	203.93	203.95	200.11	200.11
constant		208.28	203.93	201.83	200.11	<b>198.01</b>
<b>B) juvenile females</b>						
	$\Phi$	TRT * t	TRT + t	TRT	t	constant
<b>p</b>						
TRT * t		148.72	148.72	149.90	145.69	145.69
TRT + t		148.72	145.85	146.62	<b>141.23</b>	<b>141.94</b>
TRT		157.18	152.25	150.18	147.98	146.67
t		145.84	146.65	147.39	<b>142.89</b>	<b>142.89</b>
constant		153.27	148.48	147.91	144.71	143.56

**Annexe 4 : Méthodes et résultats d'une diminution expérimentale de la taille de portée pendant la gestation à l'aide d'une manipulation hormonale**

**Appendix 4: Methods and results of an experimental litter size reduction during gestation via a hormonal manipulation**

## METHODS

### *(a) Capture and rearing conditions*

We studied viviparous populations of the common lizard (*Zootoca vivipara*) located in the Massif Central mountain range (South-eastern France). We captured 52 pregnant females in mid-June 2010 at Mont-Lozère (1260 m a.s.l., 44°22'16''N, 03°47'47''E), females were marked by toe-clipping, and brought to a field laboratory until parturition (mid-July to early August). Females were kept in individual terraria (18 x 12 x 12 cm) with a shelter and with damp soil as substrate. A 25-W spotlight provided opportunities for thermoregulation for 6 hours daily, water was provided *ad libitum* and 1 *Pyralis* sp. Larva was offered per week (see **appendix 4 for more details**). Immediately after parturition, mothers and their offspring were separated and measured. Within 4 days, the females were released at their capture point and offspring were released randomly at 10 different points on the site.

### *(b) Experimental treatment: litter size reduction during gestation*

The experimental reduction of litter during gestation was achieved by an injection of arginine vasotocin (AVT, Sigma-Aldrich, V0130). Previous studies on reptiles have successfully used this drug to induced parturition in viviparous lizards, at very different concentrations across species (Guillette et al. 1991; Atkins et al. 2006). We injected intraperionally 20 µL of a solution at 0.02µg/µL AVT diluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, reference D 5773). Females were randomly allocated to each treatment group: 31 AVT-injected females and 21 unmanipulated control females (C). The experimental groups did not differ in SVL, body weight and litter size at the beginning of the experiment (all  $P > 0.50$ ). The manipulation was performed around mid-gestation (embryos removed were approximately at stages 32-37.5 (Dufaure & Hubert 1961)).

The experimental treatment resulted in four different groups of females: 21 control females (C); 12 females that received an AVT-injection but did not react, i.e. they did not lay eggs following the injection (hereafter called AC); 13 females that reacted to the injection and laid some of their eggs (hereafter called ALR); and finally 6 females that laid all their eggs following injection (hereafter called ALTR). The females that did not react to the injection of AVT (the AC females) may allow us to control for the effects of AVT that are not related to parturition, if the drug was nonetheless active in these females.

***(c) Short-term and long-term effects of litter size reduction***

We recorded almost the same variable as in our previous experiment (see **appendix 4 for more details**): thermoregulatory behaviour, pro-inflammatory potential, reproductive traits, growth and survival. Moreover, in this experiment, we recorded the endurance capacity of the females. Endurance capacity was measured 3 or 4 days after the treatment. After warming up for at least 30 min, we induced the females to run at the pace of the belt (0.5 km/h) by gently tapping on the hind leg (Le Galliard et al. 2003; Sinervo et al. 2007). A lamp suspended above the belt was used to maintain the body temperatures of lizards. The time lizards maintained their position on the treadmill until exhaustion was our estimate of endurance.

***(d) Statistical analyses***

All models were implemented in R 2.13.0 statistical software (<http://cran.r-project.org/>). They included the following additive fixed effects: (i) treatment; (ii) female SVL; (iii) initial fecundity corrected for female SVL (standardised initial fecundity), which represents the effect of the initial investment of females and (v) their first-order interactions with treatment. Models were simplified using backward elimination of the non-significant terms. The same procedures as described in **appendix 4** were used, except that the models did not contain a year random effect. Endurance was log-transformed to achieve normality. The methods for the survival analyses have been described in details in **appendix 4**.

## **RESULTS**

On average, we reduced litter size of 67.39 % (SE = 29.17 %, range from 14.29 % to 100 %) or, if we do not count the ALTR females, of 52.34 % (SE = 22.35 %, range from 14.29 % to 83.33 %). ALR females gave birth on average to 2.83 (SE = 0.51) fewer young.

***(a) Preliminary tests: differences among females prior to the treatment***

We already checked that females were randomly distributed in the experimental groups. However, since the females did not show the same reaction to the AVT-injection, we also compared the four groups of females. ALR, ALTR, AC and C females did not differ in SVL, body weight and litter size at the beginning of the experiment (all  $P > 0.88$ ). There are no differences between the females that could explain why some females reacted (partially or totally) to the AVT-injection and some did not. Their size, corpulence and fecundity are not

statistically different at the moment of injection. Thus, the reaction to the AVT-injection seems to be not correlated to the female condition and to the reproductive investment. It is possible that females at a more advance stage of gestation will be more responsive to the AVT injection. To test this hypothesis, we determined the stage of some eggs according to the classification of Dufaure and Hubert (1961) (Table 1). The stage of the eggs is not significantly different between ALTR and ALR females ( $F_{1,11} = 1.3706$ ;  $P = 0.2664$ ).

**Table 1.** Stages of some eggs from ALR and ALTR females at the moment of injection. When multiple eggs from one female have been collected, the mean is used.

	ALTR females	ALR females
min	32.5	34
max	37.33	37.25
mean	35.02	35.98
Number of females	6	7

*(b) Short-term effects of litter size reduction*

**Parturition dates**

The AVT females (without the ALTR females) have an earlier parturition date: they gave birth 2.19 days (SE = 0.82 days) sooner than the control females ( $F_{1,44} = 7.09$ ;  $P = 0.0108$ ). We did not include the ALTR females since they gave birth to all their litter at the time of the AVT-injection. Thus, the AVT-injection had an effect on both the ALR and AC females.

**Thermoregulatory behaviour**

Our variables did not explain the basking behaviour of the females. When the females are basking, they spend more time full-basking vs. half-basking according to their size ( $F_{1,48} = 8.91$  ;  $P = 0.0045$ ).

**Endurance**

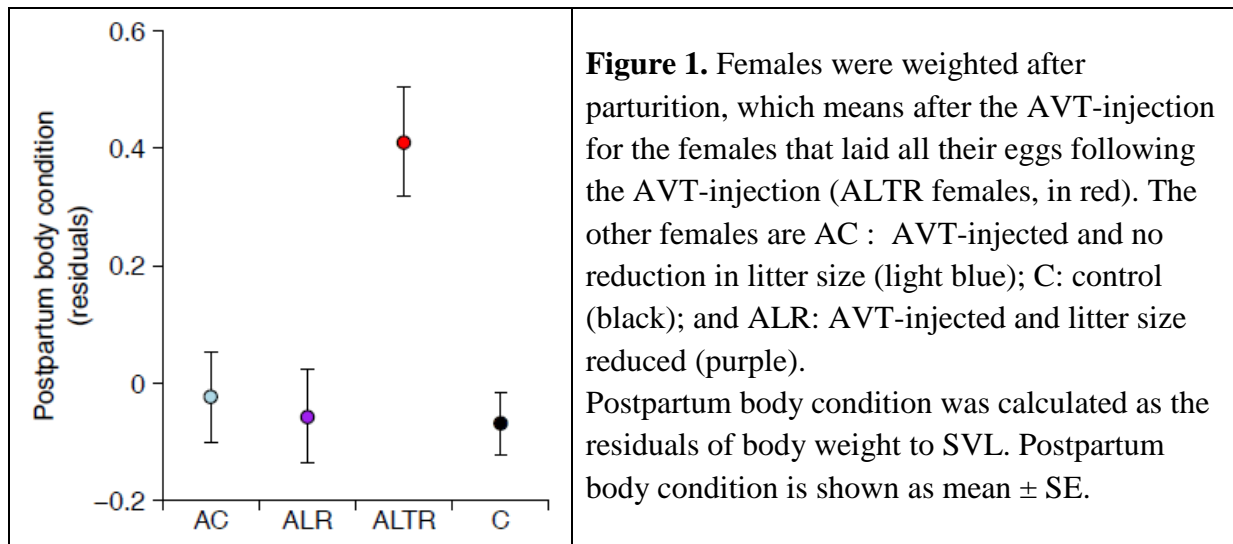
There is no drastic effect of the experimental litter size reduction on the endurance capacity of the females (Table 2). It means that the ALR and ALTR females, which carry a much lighter litter, do not have a better endurance.

**Table 2.** Locomotor performances. We compared the endurance capacity between the different groups of females. Model selection is described in the methods section.

	F-value	Df	P-value
Treatment	4.37	3,41	0.0093
Initial residual fecundity	3.52	1,41	0.0677
Treatment x initial residual fecundity	2.77	3,41	0.0538

### Postpartum body condition

Postpartum body condition (body mass statistically corrected for SVL) is different between the females ( $F_{3,47} = 5.73$ ,  $P = 0.0020$ ). Contrasts showed that the ALTR females are different from all the other females (ALTR and C:  $P = 0.0002$ ; ALTR and ALR  $P = 0.0007$ ; ALTR and AC  $P = 0.0016$ ) whereas the other females are not different (Figure 1).



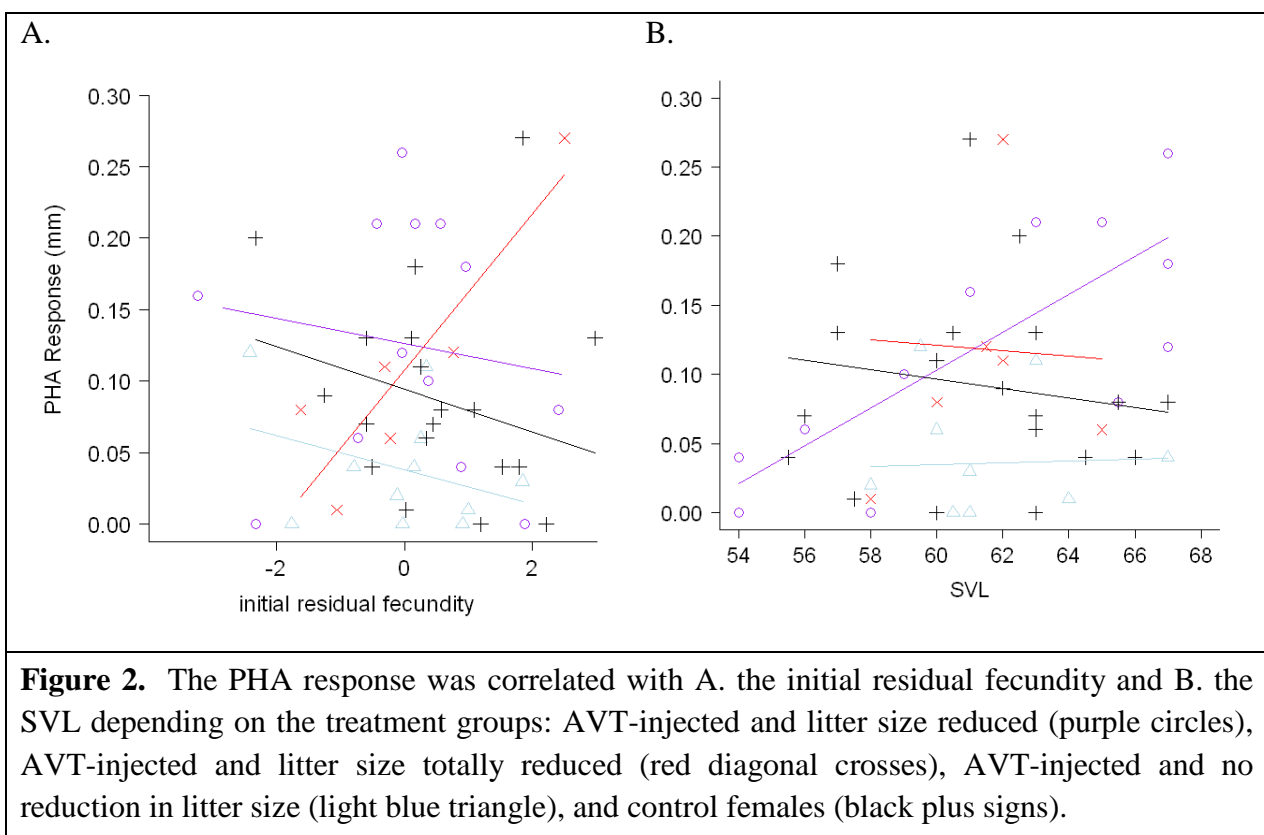
### PHA response

The PHA response is correlated to the initial residual fecundity and to female SVL depending on their treatment (Table 3). The initial residual fecundity is not correlated to the PHA response in the C, AC and ALR females (all  $P > 0.18$ ). However, in the ALTR females it is positively correlated ( $P = 0.0114$ ) (Figure 2). This pattern needs to be confirmed with a larger sample size because it is not robust: if the highest value of the ALTR females is removed, the interaction is not significant anymore ( $F_{3,37} = 0.30$ ,  $P = 0.8244$ ). Finally, PHA response is positively correlated to female size in the ALR females ( $P = 0.0006$ ), whereas in the other females there is no correlation (all  $P > 0.43$ ) (Figure 2).



**Table 3.** Final best model for the PHA response. Model selection is described in the methods section. Significant effects are in bold ( $P < 0.05$ ).

	F-value	Df	P-value
Treatment	3.12	3,38	0.0371
SVL	0.01	1,38	0.9187
Initial residual fecundity	0.54	1,38	0.4667
Treatment x SVL	3.40	3,38	<b>0.0274</b>
Treatment x initial residual fecundity	3.16	3,38	<b>0.0356</b>



### Juvenile characteristics

The litter success is not affected by our treatment ( $\text{Chisq}=3.85$ ,  $\text{df}=2$ ,  $P=0.1458$ ), the sex ratio of the litter is also not significantly different ( $F_{2,24} = 2.48$ ,  $P = 0.1048$ ). Juvenile length at birth was dependent on juvenile sex ( $F_{1,136} = 52.46$ ,  $P < 0.0001$ ; maternal initial residual fecundity :  $F_{1,36} = 2.36$ ,  $P = 0.1331$ ). Male juveniles are shorter than female juveniles. Juvenile body condition (body mass statistically corrected for SVL) was also dependent on juvenile sex ( $F_{1,135} = 12.34$ ,  $P = 0.0006$ ; maternal initial residual fecundity :  $F_{1,36} = 2.03$ ,  $P = 0.1633$ ). Males are more corpulent.

*(c) Long-term effects of litter size reduction*

**Table 4.** Number of recaptured adult females and juveniles

		<b>Adult females</b>			<b>Juveniles</b>		
		<b>July 2010 (release)</b>	<b>August-Sept. 2010 (recapture)</b>	<b>May 2011 (recapture)</b>	<b>July 2010 (release)</b>	<b>August- Sept. 2010 (recapture)</b>	<b>May 2011 (recapture)</b>
<b>C</b>	<b>female</b>	21	10	8	54	14	12
	<b>male</b>				46	14	14
<b>AC</b>	<b>female</b>	12	7	7	27	6	6
	<b>male</b>				30	8	10
<b>ALR</b>	<b>female</b>	13	7	6	7	4	3
	<b>male</b>				10	3	2
<b>ALTR</b>	<b>female</b>	6	4	3			
<b>Total</b>		52	28	24	174	49	47

## Growth of adult and juveniles

We analyzed the weight gain of adult females between release and the recapture at the end of the summer. There was no differences ( $F_{3,23} = 0.96$ ,  $P = 0.4281$ ). We also compared the growth rate of juveniles. There was an important effect of sex ( $F_{1,44} = 7.47$ ,  $P = 0.0090$ ), with females growing faster but only a marginal effect of the treatment ( $F_{2,44} = 2.83$ ,  $P = 0.0700$ ) and of initial SVL ( $F_{1,44} = 3.29$ ,  $P = 0.0765$ ).

## Survival analyses

The survival of the adult females is not correlated at all to the investment during gestation. Our treatment did not enhance the survival of the females (**Table 5 A**). The survival of the juvenile females is not correlated to the maternal treatment; however there is an effect on the recapture rate (**Table 5 B**). Several models have a comparable AICc for juvenile males. There may be an effect of the treatment on the survival of juvenile males but it is not a very clear result (**Table 5 C**).

**Table 5. Survival analysis and model selection in A. adult females B. juvenile females and C. juvenile males.** AICc (Akaike Information Criterion corrected for small sample size) are reported for different models. We tested the effect of the capture session (time effect, t) and the treatment (TRT) alone or in combination, on the survival probability ( $\Phi$ ) and capture probability (p). The lowest and comparable values of AICc ( $\Delta AICc < 2$ ) are reported in bold.

<b>A. Adult females</b>						
	$\Phi$	TRT * t	TRT + t	TRT	t	constant
<b>p</b>						
TRT * t		168.18	168.176	168.18	161.29	161.29
TRT + t		168.18	160.33	160.40	154.16	154.20
TRT		168.18	160.39	157.86	154.22	151.91
t		160.25	152.99	153.10	148.52	148.52
constant		160.25	153.11	150.78	148.52	<b>146.36</b>

<b>B. Juvenile females</b>						
	$\Phi$	TRT * t	TRT + t	TRT	t	constant
<b>p</b>						
TRT * t		206.99	206.99	207.37	204.94	205.08
TRT + t		206.99	203.01	202.12	<b>200.50</b>	<b>200.64</b>
TRT		206.99	203.03	202.25	<b>200.75</b>	<b>199.31</b>
t		209.16	205.76	205.76	202.87	202.87
constant		209.41	205.77	204.43	202.87	201.68

<b>C. Juvenile males</b>						
	$\Phi$	TRT * t	TRT + t	TRT	t	constant
<b>p</b>						
TRT * t		212.31	212.31	214.71	213.68	213.94
TRT + t		212.31	<b>208.16</b>	213.83	209.87	210.82
TRT		212.64	<b>208.22</b>	213.48	209.92	213.52
t		213.06	211.04	211.65	<b>207.72</b>	<b>207.72</b>
constant		213.99	211.08	213.72	<b>207.76</b>	209.97

## LITERATURE CITED

- Atkins, N., Jones, S. M., & Guillette, L. J. 2006. Timing of parturition in two species of viviparous lizard: influences of beta-adrenergic stimulation and temperature upon uterine responses to arginine vasotocin (AVT). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, **176**, 783-792.
- Dufaure, J. P., & Hubert, J. 1961. Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, **50**, 309-328.
- Le Galliard, J.-F., Le Bris, M., & Clobert, J. 2003. Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional*

*Ecology*, **17**, 877-885.

**Guillette, L. J., Dubois, D. H., & Cree, A.** 1991. Prostaglandins, oviducal function, and parturient behavior in nonmammalian vertebrates. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **260**, R854 -R861.

**Sinervo, B., Heulin, B., Surget-Groba, Y., Clobert, J., Miles, D. B., Corl, A., Chaine, A., & Davis, A.** 2007. Models of density-dependent genic selection and a new rock-paper-scissors social system. *The American Naturalist*, **170**, 663-680.

## **Annexe 5 : Coûts du début de la reproduction chez des lézards ovipares et vivipares conspécifiques : une étude expérimentale**

### **Appendix 5: Early costs of reproduction in conspecifics viviparous and oviparous lizards: an experimental study**

Josefa Bleu<sup>1</sup>, Benoit Heulin<sup>2</sup>, Claudy Haussy<sup>1</sup>, Sandrine Meylan<sup>1,3</sup> & Manuel Massot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS ; UPMC ; ENS – UMR 7625, Laboratoire Ecologie et Evolution, 7 Quai St. Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>2</sup> CNRS – UMR 6553, Station Biologique de Paimpont, 35380 Paimpont, France.

<sup>3</sup> IUFM de Paris – Université Sorbonne Paris IV, 10 rue Molitor, 75016 Paris, France.

Running headline: oviparity, viviparity and reproductive costs

**Article submitted** for publication in *Functional Ecology*

## ABSTRACT

1. Reproduction entails costs, but different stages of the reproductive cycle may be associated with different costs. Disentangling the relative importance of each stage may be important to assess the costs and benefits of different reproductive strategies.
2. We studied the early costs of reproduction in oviparous and viviparous lizard females of the same bimodal reproductive species (*Zootoca vivipara*). Oviparous females retain their eggs during approximately one third of the gestation time of viviparous females. We compared the females during the period of vitellogenesis and egg-retention that is shared by the two reproductive modes. We used a hormone (arginin vasotocin) to induce parturition in viviparous females at the moment of egg-laying for oviparous females.
3. An immune challenge was performed in half of the females to study the trade-offs between reproduction and immune performance, and between the different components of the immune system. We expected that different reproductive costs may result in the detection of different trade-offs.
4. Oviparous and viviparous females did not show clear-cut differences in response to the immune challenge. However, we found behavioral and physiological differences. Viviparous females spent more time thermoregulating partially hidden than oviparous females, and viviparous females gained more weight than oviparous females.
5. The higher weight gain of viviparous females indicates that the first third of egg-retention is less costly for viviparous females than for oviparous females. This may be due to the fact that the secretion of a thick eggshell results in additional costs for the oviparous females. This may also indicate that viviparous females are able to save and to accumulate energy at the beginning of gestation to cope with the costs of the end (last two third) of gestation. Such an ability to compensate the costs of a longer egg-retention period may account for the very frequent evolution of viviparity in squamate reptiles.

Keywords: viviparity, cost of reproduction, bimodal reproduction, squamate reptiles, trade-off, immune challenge, AVT-induced parturition

## INTRODUCTION

Reproductive strategies influence reproductive success and are thus a central topic of evolutionary ecology (Stearns 1992). The evolutionary shift from oviparity (where females lay eggs containing incompletely developed embryos) to viviparity (where females give birth to live young) has occurred independently in many lineages of vertebrates. However, it is worth noting that this evolutionary transition has occurred far more often (more than 100 times) in squamate reptiles (*i.e.* lizards and snakes) than in all other lineages of vertebrates (34 times) (Blackburn 2000). Squamates are also of particular interest because they exhibit an important diversity of both oviparous and viviparous reproductive modes. Viviparous species vary in their pattern of embryonic nutrition: from species that provide all nutrients in the egg yolk (lecithotrophy) to species that transfer almost all nutrients via a complex placenta (placentotrophy) (Blackburn 2000). Oviparous species vary in their stage of embryonic development at oviposition: from females that retain eggs *in utero* only briefly after ovulation to females that retain them for most of the embryonic development (Shine 1983a; De Marco 1993; Blackburn 1995; Smith & Shine 1997; Andrews & Mathies 2000). Moreover, some species of squamate reptiles exhibit both oviparous and viviparous reproductive modes, therefore making those species ideal models for comparative studies. *Zootoca* (formerly *Lacerta*) *vivipara* (Fig.1) is one of the three squamate species known to be reproductively bimodal (Heulin, Osenegg, & Lebouvier 1991; Smith & Shine 1997; Fairbairn *et al.* 1998).

Among current theories on the evolution of viviparity in Squamates, the most widely accepted hypothesis predicts that viviparity often evolves as an adaptation to cold climate (reviews in Tinkle & Gibbons 1977; Shine 1985). This hypothesis is based on the fact that eggs can develop more rapidly at (high) maternal body temperatures than at (low) soil temperatures (Shine 1983b). Early birth dates, due to accelerated development in viviparous species, may be adaptive under cold climate because it can increase the survival of embryos and newborn young: for example, it may reduce the embryonic mortality due to autumn frosts, predation, or desiccation during incubation, and it may enable offspring to accumulate important energy reserves before hibernation. Viviparity also allows a maternal control of the offspring phenotypes mediated, for examples, by female thermoregulation (Shine 1995), female feeding rate (*e.g.* Massot & Clobert 1995) or female stress (*e.g.* Meylan & Clobert 2005). However, gestation also incurs costs: increase in metabolism, locomotor impairment and a shift in thermoregulation (De Marco & Guillette 1992; Olsson, Shine, & Bak-Olsson



2000; Le Galliard, Le Bris, & Clobert 2003; Ladyman *et al.* 2003; Lin, Zhang, & Ji 2008). With regard to this, it is worth noting that many oviparous females also retain their eggs *in utero* for a non negligible time period (see above), and that it also results in metabolic costs (*e.g.* Angilletta & Sears 2000) or locomotor costs (*e.g.* Miles, Sinervo, & Frankino 2000). Moreover, oviparity also incurs some specific costs, such as eggshell production (*e.g.* Packard, Tracy, & Roth 1977).

Most previous studies on egg-retention costs in squamates are based on correlative comparisons of reproductive and non reproductive animals or on comparisons of the same female before and after parturition (citations above) and do not allow direct comparisons of oviparous and viviparous performances. The aim of our study is to compare the oviparous and viviparous reproductive costs during the period that is shared by the two reproductive modes (*i.e.* up to the occurrence of egg-laying of oviparous females). The recent evolution of viviparity in the common lizard (*Zootoca vivipara*) and the co-existence of allopatric oviparous and viviparous populations in this species (Surget-Groba *et al.* 2001), provides us an exceptional opportunity for such comparisons: it allows us to compare oviparous and viviparous performances, while minimizing the confounding effect of phylogenetical and ecological differences. In addition, to further minimize possible life-cycle differences, we used a protocol of hibernation in the laboratory allowing us to synchronize the spring reproductive cycles (emergence, vitellogenesis, copulation and ovulation) of the oviparous and viviparous females of this lizard species (Heulin *et al.* 2005). We monitored weight gain during the entire experiment. We expect mass loss to be more important in the more costly reproductive mode. We also measured the thermoregulatory behaviour and body temperatures of the females during the period of egg-retention. It is interesting to monitor females' thermoregulation because it is known that during reproduction squamate females change their behaviour and their selected body temperature (Shine 2005).

In this study we also manipulated the immune system of the individuals. Immunological defenses against pathogens may compete for a host's resources that are required for other resource-demanding processes, such as reproduction and self-maintenance (Sheldon & Verhulst 1996). There is a growing interest in links between individual immune system performance and fitness-related traits, such as reproductive effort (*e.g.* Svensson *et al.* 1998; Bonneaud *et al.* 2003; Cox *et al.* 2010). Thus, we experimentally induced an immune challenge in half of the females (injection of a solution of sheep red blood cells and anti-Newcastle disease vaccine, see methods). The rationale of this treatment is that different costs of reproduction may result in differences when facing an immune challenge, possibly

highlighting mechanisms that differ between oviparous and viviparous females. However, the vertebrate immune system is very complex including innate and acquired immunity (Demas *et al.* 2011). Thus, we measured different component of the immune system that may be affected by our experimental immune challenge which triggers a humoral immune response (B cells, acquired immunity). In particular, we measured the complement activity (innate immunity) and the pro-inflammatory potential (PHA test, mix of T cells, acquired immunity, and innate immunity (Vinkler, Bainová, & Albrecht 2010)). This will allow us to investigate possible trade-offs between different components of the immune system and reproductive mode.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **(a) *The species***

*Zootoca vivipara* (Fig.1) is a small-sized (adults of 45-75 mm snout-vent length) ground-dwelling lacertid, generally living in moist habitats. Details on the reproductive cycle, life-history, and geographic distribution of its natural oviparous and viviparous populations have been published elsewhere (Heulin *et al.* 1991; Heulin, Osenegg-Leconte, & Michel 1997; Surget-Groba *et al.* 2001).

Females from oviparous populations retain their egg in utero for 30 % of the total embryonic developmental time, that is up to the end of the organogenesis phase (embryos at stages 31-33 of the terminology of Dufaure and Hubert (1961)) (Heulin *et al.* 1991). The oviparous eggshell is composed of a thick (40-50  $\mu\text{m}$ ) layer of fibrous protein overlain by a layer (5 $\mu\text{m}$ ) of calcium carbonate (Heulin 1990; Stewart, Heulin, & Surget-Groba 2004).

Parturition of viviparous females occurs when embryos are fully developed (end of the exponential growth phase = stage 40 of the terminology of Dufaure and Hubert (1961)). The viviparous embryos and their yolks also remain enveloped in eggshells during the entire gestation period. However the viviparous eggshell is very thin (7- 9  $\mu\text{m}$ ) and is only composed of fibrous protein (*i.e.* no layer of calcium carbonate) (Heulin 1990; Stewart *et al.* 2004). Panigel (1956)' experiments (*i.e.* successful incubation and development of viviparous embryos removed from the uterus) revealed that the embryonic nutrition is predominantly lecithotrophic (from nutrients contained in the yolk).

### **(b) Capture and rearing conditions**

Lizards were collected in late August 2010: oviparous females ( $N = 23$ ) and males ( $N = 15$ ) from the Aubisque slope, south-western France in the Pyrénées mountains ( $42^{\circ}58'21''\text{N}$ ,  $0^{\circ}20'43''\text{W}$ ; 1570 m a.s.l.); viviparous females ( $N = 25$ ) and males ( $N = 15$ ) from the Mont-Lozère, south-eastern France in the Massif Central mountains ( $44^{\circ}22'16''\text{N}$ ,  $03^{\circ}47'47''\text{E}$ , 1260 m a.s.l.). Animals were transported to Station Biologique de Paimpont ( $48^{\circ}00'13''\text{N}$ ,  $2^{\circ}13'44''\text{W}$ ; 150 m a.s.l.). The lizards were kept active during September, maintained in hibernation from October to February, and bred afterwards, as described previously (Heulin *et al.* 2005). Under these rearing conditions the timing of follicular growth, vitellogenesis, ovulation, and early embryonic development (from segmentation to stage 31-33) are similar in oviparous and viviparous females (Heulin *et al.* 2005).

Females were removed from hibernation in February 2011 (see Table 1) and paired with males from the same population two weeks later. Animals were maintained in individual terraria under standardised laboratory conditions: food (*Tenebrio* larva and crickets) and water were provided *ad libitum*, and a 40-W spotlight provided opportunities for thermoregulation for 6 hours daily (from 06h00 to 12h00). Females were measured for snout-vent length (SVL, to the nearest mm) and weighed regularly (to the nearest mg, see Table 1). All lizards were released at their initial capture locations at the end of the experiment.

### **(c) Experimental procedure**

An immune challenge was induced in half of the females at the beginning of egg-retention, *i.e.* after mating and vitellogenesis (Table 1). We vaccinated the females with 20  $\mu\text{l}$  of an anti-Newcastle disease vaccine (anti-NDV, Nobilis, Paramyxo P201) and 40  $\mu\text{L}$  of a 2% suspension of sheep red blood cells (SRBC, Biomérieux, 55823). The suspension contained on average  $5 \times 10^8$  SRBC in sterile phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, reference D 5773). Control females received an injection of 60  $\mu\text{L}$  of PBS. In vertebrates, the injection of an antigen elicits the humoral immune response and the production of antibodies (Svensson, Sinervo, & Comendant 2001a; Meylan, Haussy, & Voituron 2010). The use of two antigens is common in immunological studies (*e.g.* Svensson, Sinervo, & Comendant 2001b; Hanssen *et al.* 2004). We used SRBC because it has been used previously successfully in the common lizard (Meylan *et al.* 2010). We initially planned to use the anti-NDV vaccine in order to measure accurately the production of antibodies by means of an ELISA assay (*e.g.* Bonneaud *et al.* 2004). Unfortunately we did not succeed in applying this assay on our lizard.

Then, during egg-retention, non-invasive measures of thermoregulation were performed (see below). Finally, egg-laying of oviparous females occurred in late March (see Table 1). At the same period, parturition, in viviparous females, was induced with Arginine vasotocin (AVT, Sigma-Aldrich, V0130). Previous studies on reptiles have successfully used this drug to induced parturition in viviparous lizards, at very different concentrations across species (Guillette, Dubois, & Cree 1991; Atkins, Jones, & Guillette 2006). Based on prior tests, we injected intraperitoneally 60  $\mu$ L of AVT diluted in PBS (0.02 $\mu$ g/ $\mu$ L). If the parturition did not occur or was incomplete, we repeated the AVT injection for several (up to 10) days. However, some viviparous females did not lay all their eggs, even after multiple AVT injection, and were therefore excluded from the analyses of variables measured after egg-laying (weight, immunocompetence, see below). Oviparous females also received one injection of AVT after natural egg-laying, to control for confounding effects of the AVT-injection on the variables measured after egg-laying.

In oviparous females, only one female laid undeveloped eggs (eggs with no visible embryos). Matings were less successful in viviparous females. On the 25 viviparous females, 13 laid undeveloped eggs and 12 laid fertilized eggs. This did not impair our study, since we previously showed that, in viviparous populations, females that produced undeveloped eggs and females that produced live young have a comparable investment in reproduction (fecundity) and show the same reproductive costs (early locomotor impairment, selected body temperature during gestation, postpartum body mass)(Bleu *et al.* 2011a). Nevertheless, when appropriate, we performed some tests to verify that there were no differences between fertilized and unfertilized viviparous females.

#### ***(d) Thermoregulation***

Our behavioural observations (total of 72 per lizard) started one week after vaccination, and were done during 9 days distributed over the egg-retention period (Table 1). For each day we noted the thermoregulatory behaviour of each lizard, every 15 minutes, from 10h00 to 12h00. The observer noted (1) if the lizard was active or hidden in the shelter, (2) if the lizard was basking or not (*e.g.* eating, walking in the terrarium). If the lizard was basking, the observer also distinguished between full-basking and half-basking (the head under the light and the rest of the body hidden; as described in Cote *et al.* 2010). We distinguished half-basking from full-basking, because these 2 behaviours may possibly be associated to differences in the thermoregulatory efficiency (body temperature) or in the “predation risk”. At 3 different days, we measured the body temperature of each female (at the end of the

behavioural observations, *i.e.* at 12h00). Females were captured by hand and we immediately measured the external temperature on the back of the female with an infrared thermometer (Model RAYST25XXEU, Raytek, Santa Cruz, CA, USA). In small lizards, and in particular in *Z. vivipara*, the external temperature is very similar to the internal temperature (Herczeg *et al.* 2006).

**(e) Immunocompetence**

The day after egg-laying, blood samples (40–60  $\mu$ l whole blood) were collected from the post-orbital sinus using two to three 20  $\mu$ l microhaematocrit tubes. Blood samples were centrifuged. The plasma was transferred to 0.5 ml Eppendorf tubes and stored in a freezer at -20°C until analysis. The day after bleeding, we measured the pro-inflammatory potential of the females. This was estimated with the phytohaemagglutinin-induced skin-swelling test (PHA test), as described in (Bleu *et al.* 2011b). The complement is a component of the innate immune system involved in the lysis of foreign cells (Demas *et al.* 2011). Thus, levels of circulating complement are classically estimated by the levels of cell lysis (Matson, Ricklefs, & Klasing 2005; Møller & Haussy 2007). Our quantification of the level of cell lysis was based on serial dilution: we determined the dilution point at which no lysis reaction is observed. Plasma samples were thawed and homogenized using a vortex. Samples were serially diluted 7 times (no dilution, dilution 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128). Into each well of a 96 U-shape well assay plates, 10  $\mu$ L of PBS and 10  $\mu$ l of one of the plasma dilutions were pipetted. On each assay plates, one well contained a sample of erythrocytes, thus serving as a negative control, and some wells contained anti-SRBC at different concentrations (Sigma-Aldrich, S1389), thus serving as positive controls. Subsequently 20  $\mu$ L of a 1% solution of fresh SRBC (stored at 4°C) was added to each well. The assay plate was then covered and shaken for 10 s, followed by incubation for 120 min at room temperature. Finally, the assay plate was read and scanned. Wells are assumed to be positive when there is no sign of whole blood (the action of complement has destroyed the red blood cells and only left haemoglobin). All tests were carried out blindly by CH with respect to the phenotype and the treatment of the female lizards.

**(f) Weight**

Females were weighted at emergence, at the beginning of egg-retention and just after egg-laying (Table 1). Body weight growth was calculated as the change in weight (postpartum

weight - weight at emergence) divided by the time interval (egg-laying date - emergence date).

*(g) Statistical analyses*

All models were implemented in R 2.13.0 statistical software (<http://cran.r-project.org/>). First, we conducted partial tests depending on the reproductive modes to exclude colinearity issue due to the body size difference between oviparous and viviparous females (see Results). These models included: (i) immune treatment (vaccination), (ii) female size (SVL), (iii) fecundity corrected for female size (residual fecundity), and (iv) their first-order interactions with the treatment. Models were simplified using backward elimination of the non-significant terms. For the behaviours, we first analyzed the proportion of time spent active (basking or not), then the proportion of time spent basking when the lizard was active, and finally the proportion of full-basking when the lizard was basking. These analyses were conducted with the glm procedure for logistic regressions, and they included a quasi-binomial error term (to correct for over-dispersion). Then, we tested whether the temperature was correlated with the proportion of time spent active, basking, or full-basking in a linear model. Since we had 3 measures of temperatures for each female, we used the mean temperature. We also know their behaviours 15 minutes before the measurement. To take into account these last behaviours, we created a “score of thermoregulation” which was the sum of the 3 behaviours: 2 for thermoregulation, 1 for half thermoregulation and 0 for hidden females. Thus the score was comprised between 0 and 6. This score of thermoregulation was added as a covariate in the linear model.

Mean temperature, weight growth, PHA response and lysis response (square-root transformed to achieve normality) were analyzed with linear models (lm procedure). Fixed effects were tested with marginal F-tests and estimates are shown with standard errors. We analyzed “full” models including all the individuals and the reproductive mode as a covariate. In these models, the residual fecundity was not tested because it was not significant in the partial models. The same procedure as described above for the partial tests was followed. We used partial and full models to understand the effect of SVL, since it was correlated to the reproductive modes. The results were concordant in both analyses, thus colinearity was not a strong issue. In the results section, we present the results of the partial tests only when a significant effect was found.

## RESULTS

We had 13 control (C) and 10 vaccinated (V) oviparous females and 13 C and 12 V viviparous females. All the 23 oviparous females laid all their eggs, whereas only 14 (8 C and 6 V) of the 25 AVT-treated viviparous females laid all their eggs. Viviparous females that laid all their eggs received 1 to 10 AVT injections (mean = 3.6, SD = 2.9). Among the 11 viviparous females that only laid partially their eggs after the AVT injections, 5 of them finally gave birth (*i.e.* normal parturition) to their young by the end of April. Hence, it was possible to know the total litter size of these viviparous females.

Oviparous and viviparous females differ in initial SVL. Viviparous females are longer (estimate =  $4.74 \pm 0.82$ ,  $F_{1,46} = 33.78$ ,  $P < 0.0001$ ). There was no difference in the initial SVL between vaccinated females and control females (for viviparous:  $F_{1,23} = 0.41$ ,  $P = 0.5266$ ; for oviparous:  $F_{1,21} = 0.27$ ,  $P = 0.6064$ ). As classically in our species (Massot *et al.* 2011), litter size was positively correlated to female size ( $F_{1,40} = 9.61$ ,  $P = 0.0035$ ) but this relationship was not dependent on the reproductive mode ( $F_{1,38} = 0.29$ ,  $P = 0.5954$ ).

### (a) Corpulence

At emergence, viviparous and oviparous females showed the same relationship between weight and SVL, and had a comparable weight at a given size (Fig. 2a). However, one month after emergence (*i.e.* after reproductive investment of vitellogenesis and just before the vaccination), viviparous females were heavier when larger and lighter when smaller than oviparous females: the slopes and the intercept were different (Fig. 2b). These differences persisted after egg-laying (Fig. 2c).

### (b) Body temperatures

Mean female temperature was  $30.62^{\circ}\text{C}$  (SD =  $1.15^{\circ}\text{C}$ ). Temperatures were correlated to female size, to the immune treatment (*i.e.* the vaccination) and to the reproductive mode (Table 2). The effect of SVL was the same in viviparous and oviparous females (no significant interactions, Table 2). Body temperatures were negatively related to size in vaccinated females but positively in control females, both in oviparous (interaction SVL and treatment:  $F_{1,19} = 13.39$ ,  $P = 0.0017$ ) and in viviparous females (interaction:  $F_{1,21} = 9.92$ ,  $P = 0.0048$ ) (Fig. 3). However, there is a significant interaction between reproductive mode and vaccination (Table 2). Thus, the slopes are not different but the intercepts are, which

means that at a given size, vaccinated viviparous females had a higher temperature than vaccinated oviparous females whereas it was the contrary for control females (Fig. 3). Nevertheless, since viviparous females were larger than oviparous females, there was no difference in mean body temperature between oviparous and viviparous females in the vaccinated samples ( $F_{1,20} = 0.073$ ,  $P = 0.7892$ ), nor in the control samples ( $F_{1,24} = 0.84$ ,  $P = 0.3683$ ).

We checked whether mean temperatures were related to the proportion of time a female exhibited a given thermoregulatory behaviour. Although body temperatures were not related specifically with the proportion of time spent active ( $F_{1,45} = 2.40$ ,  $P = 0.1282$ ), basking ( $F_{1,45} = 0.68$ ,  $P = 0.4154$ ) or full basking ( $F_{1,45} = 2.56$ ,  $P = 0.1169$ ), body temperatures were positively correlated with the “score of thermoregulation” ( $F_{1,46} = 8.53$ ,  $P = 0.0054$ ,  $r^2 = 0.16$ ). Our previous results (*i.e.* our models of Table 2 explaining body temperatures) were unchanged when we included the score of thermoregulation as a covariate.

#### ***(c) Thermoregulatory behaviour***

Females were active 86% of the time and they were almost always basking when active (96% of their active time). We found only an effect of the reproductive mode (Table 2): compared to oviparous females, viviparous females spent more time basking when active (97.6% SE = 0.6% vs. 94.0% SE = 1.2%) but they were more frequently half-basking when basking (65.0% SE = 4.5% vs. 49.6% SE = 5.2%). A partial test on viviparous females only, showed that fertilization did not significantly explain these female behaviours (basking:  $F_{1,23} = 1.47$ ,  $P = 0.24$ ; full-basking:  $F_{1,23} = 1.21$ ,  $P = 0.28$ ).

#### ***(d) Condition after egg-laying and immunocompetence***

Weight growth between the emergence of hibernation and the oviposition time was not affected by the vaccination but was significantly different between the reproductive modes (Table 2): viviparous females gained weight during the experiment ( $0.017 \pm 0.002$  g/day) contrary to the oviparous females ( $-0.002 \pm 0.002$  g/day). A partial test (*i.e.* on viviparous females only) showed that fertilization did not significantly affect female weight gain ( $F_{1,12} = 1.97$ ,  $P = 0.1855$ ).

Concerning the immunocompetence, PHA response was not significantly correlated to the measured variables, whereas lysis response seemed to depend both on the reproductive mode, female SVL and the treatment (Table 2). However, partial tests showed only a marginally significant interaction between SVL and treatment in viviparous females



( $F_{1,10} = 4.58$ ,  $P = 0.0581$ ), whereas this interaction was not significant in oviparous females ( $F_{1,17} = 2.79$ ,  $P = 0.1133$ ). The trend in viviparous females was a positive relationship between lysis and SVL in control females (estimate =  $0.55 \pm 0.39$ ) and a negative one in vaccinated females (estimate =  $- 0.60 \pm 0.37$ ).

## DISCUSSION

### (a) *Body size and weight gain before egg-laying*

The viviparous females used in this study had significantly larger body size than the oviparous ones, as previously observed for other oviparous and viviparous populations of *Zootoca vivipara* (e.g. Stewart, Ecaj, & Heulin 2009; Lindtke, Mayer, & Böhme 2010) and, also, for oviparous and viviparous populations of the other two reproductively bimodal species of squamates (Qualls & Shine 1995; Smith & Shine 1997). This has been interpreted as a morphological adaptation to the considerable increase of the volume of the eggs occurring at the end of the gestation (Qualls & Shine 1995).

Our results also showed that, there was no significant difference in corpulence between oviparous and viviparous females at the emergence from hibernation, whereas afterwards (during vitellogenesis and egg-retention) this difference became significant. We observed that oviparous females had lost weight whereas viviparous females had gained weight between their emergence from hibernation and the end of their egg-retention (*i.e.* at the time of normal egg-laying for oviparous, or of AVT-induced egg-laying for viviparous). Thus, the reproductive investment during this period (including vitellogenesis + egg-retention) was more costly for oviparous females than for viviparous females. With regard to fecundity, we showed that females carry a number of eggs proportional to their size, irrespective of the reproductive mode: there was no difference in the size-corrected fecundities of oviparous and viviparous females. Stewart *et al.* (2009) previously showed that there is no difference in the yolk content (mean dry mass 55mg) of the egg between the oviparous and viviparous forms, but that the eggshell was 8 times heavier in the oviparous form (dry mass 8mg) than in the viviparous form (1mg) of *Zootoca vivipara*. This additional reproductive investment (synthesis and secretion of a thicker oviparous eggshell) could account for a higher cost (lost of weight of the female) of early reproduction in oviparous than viviparous females of *Zootoca vivipara*.

**(b) Immunity trade-offs, body temperatures and thermoregulation**

The immune challenge performed in this study had no effect on the thermoregulatory behaviour, the PHA response and the weight growth, whereas it had a significant effect on the body temperature and, marginally, on the complement activity. We expected to detect a trade-off between the different component of the immune system because they may be in competition, such that an individual may not be able to invest both in a high innate immune response and in a high acquired immune response (*e.g.* Ujvari & Madsen 2011), or in a high cellular and humoral immune response (*e.g.* Meylan *et al.* 2010). Contrary to a previous study on the same species (Meylan *et al.* 2010), we did not detect an effect of the vaccination on the PHA response. The reasons of this discrepancy may be that, in our study, we vaccinated females earlier (*i.e.* Meylan *et al.* (2010) vaccinated the females at mid-gestation) and that the presence of *ad libidum* food may have allow the females to invest in both immune responses (*e.g.* French, DeNardo, & Moore 2007). Similarly, Blount *et al.* (2003) showed that there was no correlation between humoral and cellular immune response in a bird species. This suggests that the existence of such a trade-off is context- and species-dependent. Since the activity of the complement is important for stimulating acquired immunity (Zimmerman, Vogel, & Bowden 2010; Demas *et al.* 2011), we also expected a positive feedback of stimulation of the acquired immunity on the complement activity. However, our study revealed only a weak, marginal, positive effect of the vaccination on the lysis response, and only in viviparous females. Given the small sample size used for this assay, this relationship needs to be investigated further before concluding on the existence of possible differences between the two reproductive modes.

We did not find any effect of the immune challenge on the thermogulatory behaviours of the females. However, there was a size-dependent effect of the immune challenge on the mean body temperature of the females. In each reproductive mode, smaller females selected a higher body temperature when vaccinated. Mounting an immune response is costly and thus challenged females may need to select temperatures near their optimal temperatures (Zimmerman *et al.* 2010). Pregnant females of *Zootoca vivipara* select temperatures that are favorable for the embryonic development, but that are lower than their own (body) optimal temperature (Le Galliard *et al.* 2003). Hence, in our study, the pregnant females may have re-adjusted their body temperature (*i.e.* higher than the embryo optimal, but closer to their own optimal) in response to the immune challenge. The size-dependence of this effect may reflect the fact that all the females received the same amount of vaccine. Thus, proportionally, smaller females received more antigens (*i.e.* eliciting a stronger response). This size-

dependent effect of the immune-challenge on the body temperature also varies between the two reproductive modes: for any given size, control viviparous females had lower body temperatures than control oviparous females, whereas vaccinated viviparous females had higher body temperatures than vaccinated oviparous females. However, since viviparous females had larger body size than oviparous ones, there was no difference in mean body temperatures between vaccinated oviparous and vaccinated viviparous females, or between control oviparous and control viviparous females as also reported in a previous study (Heulin *et al.* 1991). In other words, the effect of the vaccination is the same in oviparous and viviparous females but is shifted according to the body size distribution specific to each reproductive mode.

Thermoregulatory behaviours differed between the two reproductive modes and this difference was not due to the body size differences. Viviparous females basked more often and used more the half-basking “strategy” than the oviparous females. This high frequency of half-basking could be related to the fact that, during gestation, viviparous females of *Zootoca vivipara* clearly rely on a cryptic behaviour to avoid predation (Bauwens & Thoen 1981). There is a need to gather comparable data (behaviour of oviparous females in nature) to test the prediction that, during egg-retention, the cryptic strategy is less frequently used in oviparous than in viviparous females. We previously show experimentally that, in viviparous females, a higher reproductive investment is related to a lower frequency of the half-basking behaviour during gestation and to a lower corpulence after parturition (Bleu *et al.* 2011b). Hence, although its physiological reasons are not yet understood, it seems that the frequency of half-basking is negatively correlated to the reproductive costs in *Zootoca vivipara* (Bleu *et al.* 2011b). This is consistent with some of the results obtained in the present study, that is the lower frequency of half basking behaviour and the lost of weight at egg-laying reflecting a higher cost of egg-retention in oviparous females (see above).

### **(c) Conclusions: oviparous vs. viviparous reproductive costs**

Our comparison of oviparous and viviparous females did not revealed clear-cut differences in response to the immune challenge between the 2 reproductive modes. Similarly, the mean body temperature did not differ between oviparous and viviparous females. Conversely, we found significant behavioural (*i.e.* the half basking strategy) and physiological (loss/gain in body weight) differences, indicating that oviparous females spend more energy than viviparous females during the period including the vitellogenesis and the first third of egg-retention (that is up to the normal time of oviparous egg-laying). The secretion of a thick

eggshell, which necessarily results in an additional cost for oviparous females, may - at least partially- account for the difference observed. During the same period, viviparous females could save some energy not only “passively” (by not producing a thick eggshell) but also, possibly, by some behavioural means (*e.g.* half basking, see above).

It is worth discussing here to what extent the energy saved by viviparous females during the first third of egg-retention is counter-balanced by energetic costs associated to the end (*i.e.* last two third) of gestation. Indeed, one can distinguish two phases in the embryonic development of squamates: the first third (up to embryo stages 30-33 in the terminology of Dufaure and Hubert (1961)) corresponds to a phase of differentiation and organogenesis with a low growth in mass of the embryo and a low water-uptake of the egg, whereas the last two thirds (up to the final embryo stage 40) correspond to the exponential growth phase of the embryo and to a high water-uptake of the egg, with a concomitant large increase in metabolic oxygen demand by embryo (Dmi’el 1970; Birchard *et al.* 1984; Xavier & Gavaud 1986; Vleck & Hoyt 1991). This results in additional costs of maintenance in the viviparous reproduction: pregnant females of viviparous species effectively increase their metabolic rate in response to the considerable increase in the mass of the eggs and in the metabolic demands of the growing embryo, during the last two third of their gestation (Guillette 1982; Birchard *et al.* 1984; Beuchat & Vleck 1990; De Marco & Guillette 1992). Comparatively, most species of oviparous squamates lay their eggs before the embryonic exponential growth phase (Shine 1983a; De Marco 1993; Blackburn 1995; Andrews & Mathies 2000) and, therefore, have no such additional maintenance costs. Interestingly, it was shown that the total cost of reproduction (up to normal egg-laying, or normal parturition) was similar in oviparous and in viviparous females of the reproductively bimodal lizard *Lerista bougainvilli* (Qualls & Shine 1998). The idea that a balance may exist between the early cost (higher for oviparous females) and the subsequent cost (higher for viviparous females) of reproduction in squamates is an interesting hypothesis. Such an ability for viviparous females to save energy at the beginning of reproduction and, hence, to compensate the costs of a longer egg-retention period, could account for the very frequent evolution of viviparity in squamate reptiles. Further research, allowing a precise quantification of the reproductive costs (*e.g.* including measurements of females’ metabolic rate during vitellogenesis, eggshell production and egg-retention), is needed to test this possibility.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Louis Graf and Marion Chatelain who took part in data collection, and to Hervé Amat who helped us with animal care. We also thank Paulina Artacho for discussions on temperature measurements. Authorizations n° 2010-0020 from the “Parc National des Cévennes”, n° 2010-112-02 from the “Préfecture de la Lozère”, n° 2010-031 from the “Parc National des Pyrénées” and n° 22/2010 from the “Préfecture des Pyrénées-Atlantiques” allowed us to capture wild animals for this study.

## LITERATURE CITED

- Andrews, R.M. & Mathies, T. (2000) Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. *Bioscience*, **50**, 227-238.
- Angilletta, M.J. & Sears, M.W. (2000) The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Functional Ecology*, **14**, 39-45.
- Atkins, N., Jones, S.M. & Guillette, L.J. (2006) Timing of parturition in two species of viviparous lizard: influences of beta-adrenergic stimulation and temperature upon uterine responses to arginine vasotocin (AVT). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, **176**, 783-792.
- Bauwens, D. & Thoen, C. (1981) Escape tactics and vulnerability to predation associated with reproduction in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology*, **50**, 733-743.
- Beuchat, C.A. & Vleck, D. (1990) Metabolic consequences of viviparity in a lizard, *Sceloporus jarrovi*. *Physiological Zoology*, **63**, 555-570.
- Birchard, G.F., Black, C.P., Schuett, G.W. & Black, V. (1984) Influence of pregnancy on oxygen consumption, heart rate and hematology in the garter snake: Implications for the “cost of reproduction” in live bearing reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **77**, 519-523.
- Blackburn, D.G. (1995) Saltationist and punctuated equilibrium models for the evolution of viviparity and placentation. *Journal of Theoretical Biology*, **174**, 199-216.
- Blackburn, D.G. (2000) Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **127**, 391-409.
- Bleu, J., Le Galliard, J.-F., Meylan, S., Massot, M. & Fitze, P.S. (2011a) Mating does not influence reproductive investment, in a viviparous lizard. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*.
- Bleu, J., Massot, M., Haussy, C. & Meylan, S. (2011b) Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Blount, J.D., Houston, D.C., Møller, A.P. & Wright, J. (2003) Do individual branches of immune defence correlate? A comparative case study of scavenging and non-scavenging birds. *Oikos*, **102**, 340-350.

- Bonneaud, C., Mazuc, J., Chastel, O., Westerdahl, H. & Sorci, G. (2004) Terminal investment induced by immune challenge and fitness traits associated with major histocompatibility complex in the house sparrow. *Evolution*, **58**, 2823-2830.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B. & Sorci, G. (2003) Assessing the cost of mounting an immune response. *The American Naturalist*, **161**, 367-379.
- Cote, J., Clobert, J., Montes Poloni, L., Haussy, C. & Meylan, S. (2010) Food deprivation modifies corticosterone-dependent behavioural shifts in the common lizard. *General and Comparative Endocrinology*, **166**, 142-151.
- Cox, R.M., Parker, E.U., Cheney, D.M., Liebl, A.L., Martin, L.B. & Calsbeek, R. (2010) Experimental evidence for physiological costs underlying the trade-off between reproduction and survival. *Functional Ecology*, **24**, 1262-1269.
- Demas, G.E., Zysling, D.A., Beechler, B.R., Muehlenbein, M.P. & French, S.S. (2011) Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *Journal of Animal Ecology*, **80**, 710-730.
- Dmi'el, R. (1970) Growth and metabolism in snake embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **23**, 761 -772.
- Dufaure, J.P. & Hubert, J. (1961) Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, **50**, 309-328.
- Fairbairn, J., Shine, R., Moritz, C. & Frommer, M. (1998) Phylogenetic relationships between oviparous and viviparous populations of an Australian lizard (*Lerista bougainvillii*, Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **10**, 95-103.
- French, S.S., DeNardo, D.F. & Moore, M.C. (2007) Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? *The American Naturalist*, **170**, 79-89.
- Le Galliard, J.-F., Le Bris, M. & Clobert, J. (2003) Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology*, **17**, 877-885.
- Guillette, L.J. (1982) Effects of gravidity on the metabolism of the reproductively bimodal lizard, *Sceloporus aeneus*. *Journal of Experimental Zoology*, **223**, 33-36.
- Guillette, L.J., Dubois, D.H. & Cree, A. (1991) Prostaglandins, oviducal function, and parturient behavior in nonmammalian vertebrates. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **260**, R854 -R861.
- Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I. & Erikstad, K.E. (2004) Costs of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **271**, 925-930.
- Herczeg, G., Gonda, A., Saarikivi, J. & Merilä, J. (2006) Experimental support for the cost-benefit model of lizard thermoregulation. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **60**, 405-414.
- Heulin, B. (1990) Étude comparative de la membrane coquillère chez les souches ovipare et vivipare du lézard *Lacerta vivipara*. *Canadian Journal of Zoology*, **68**, 1015-1019.
- Heulin, B., Osenege-Leconte, K. & 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., Oseneegg, K. & 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., Stewart, J.R., Surget-Groba, Y., Bellaud, P., Jouan, F., Lancien, G. & Deunff, J. (2005) Development of the uterine shell glands during the preovulatory and early gestation periods in oviparous and viviparous *Lacerta vivipara*. *Journal of Morphology*, **266**, 80-93.
- Ladyman, M., Bonnet, X., Lourdais, O., Bradshaw, D. & Naulleau, G. (2003) Gestation, thermoregulation, and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: evidence for fecundity-independent costs. *Physiological and Biochemical Zoology*, **76**, 497-510.
- Lindtke, D., Mayer, W. & Böhme, W. (2010) Identification of a contact zone between oviparous and viviparous common lizards (*Zootoca vivipara*) in central Europe: reproductive strategies and natural hybridization. *Salamandra*, **46**, 73-82.
- Lin, C.-X., Zhang, L. & 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.
- De Marco, V. (1993) Estimating egg retention times in sceloporine lizards. *Journal of Herpetology*, **27**, 453-458.
- De Marco, V. & Guillette, L.J. (1992) Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovi*). *Journal of Experimental Zoology*, **262**, 383-390.
- Massot, M. & Clobert, J. (1995) Influence of maternal food availability on offspring dispersal. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**, 413-418.
- Massot, M., Clobert, J., Montes-Poloni, L., Haussy, C., Cubo, J. & Meylan, S. (2011) An integrative study of ageing in a wild population of common lizards. *Functional Ecology*, **25**, 848-858.
- Matson, K.D., Ricklefs, R.E. & Klasing, K.C. (2005) A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developmental & Comparative Immunology*, **29**, 275-286.
- Meylan, S. & Clobert, J. (2005) Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. *Hormones and Behavior*, **48**, 44-52.
- Meylan, S., Haussy, C. & Voituron, Y. (2010) Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *General and Comparative Endocrinology*, **169**, 158-166.
- Miles, D.B., Sinervo, B. & Frankino, W.A. (2000) Reproductive burden, locomotor performance, and the cost of reproduction in free ranging lizards. *Evolution*, **54**, 1386-1395.
- Møller, A.P. & Haussy, C. (2007) Fitness consequences of variation in natural antibodies and complement in the Barn Swallow *Hirundo rustica*. *Functional Ecology*, **21**, 363-371.
- Olsson, M., Shine, R. & Bak-Olsson, E. (2000) Locomotor impairment of gravid lizards: is the burden physical or physiological? *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 263-268.
- Packard, G.C., Tracy, C.R. & Roth, J.J. (1977) The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, and the evolution of viviparity within the class Reptilia. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **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, Zoologie (XI)*, **18**, 569-668.

- Qualls, C.P. & 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. & Shine, R. (1998) Costs of reproduction in conspecific oviparous and viviparous lizards, *Lerista bougainvillii*. *Oikos*, **82**, 539-551.
- Sheldon, B.C. & Verhulst, S. (1996) Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 317-321.
- Shine, R. (1983a) Reptilian reproductive modes: the oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica*, **39**, 1-8.
- Shine, R. (1983b) Reptilian viviparity in cold climates: testing the assumptions of an evolutionary hypothesis. *Oecologia*, **57**, 397-405.
- Shine, R. (1985) The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. *Biology of the Reptilia* (eds C. Gans & F. Billett), pp. 605-694. John Wiley & Sons, New-York, NY.
- Shine, R. (1995) A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *The American Naturalist*, **145**, 809-823.
- Shine, R. (2005) Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 23-46.
- Smith, S.A. & Shine, R. (1997) Intraspecific variation in reproductive mode within the Scincid lizard *Saiphos equalis*. *Australian Journal of Zoology*, **45**, 435-445.
- Stearns, S.C. (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- 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**, 2520-2524.
- Stewart, J.R., Heulin, B. & Surget-Groba, Y. (2004) Extraembryonic membrane development in a reproductively bimodal lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Zoology*, **107**, 289-314.
- Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C.-P., Thorpe, R.S., Kupriyanova, L., Vogrin, N., Maslak, R., Mazzotti, S., Venczel, M., Ghira, I., Odierna, G., Leontyeva, O., Monney, J.-C. & Smith, N. (2001) Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 449-459.
- Svensson, E., Råberg, L., Koch, C. & Hasselquist, D. (1998) Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology*, **12**, 912-919.
- Svensson, E., Sinervo, B. & Comendant, T. (2001a) Density-dependent competition and selection on immune function in genetic lizard morphs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 12561-12565.
- Svensson, E., Sinervo, B. & Comendant, T. (2001b) Condition, genotype-by-environment interaction, and correlational selection in lizard life-history morphs. *Evolution*, **55**, 2053-2069.
- Tinkle, D.W. & Gibbons, J.W. (1977) The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous Publications University of Michigan*, **154**, 1-55.
- Ujvari, B. & Madsen, T. (2011) Do natural antibodies compensate for humoral immunosenescence in tropical pythons? *Functional Ecology*, **25**, 813-817.
- Vinkler, M., Bainová, H. & Albrecht, T. (2010) Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Functional Ecology*, **24**, 1081-1086.
- Vleck, C.M. & Hoyt, D.F. (1991) Metabolism and energetics of reptilian and avian embryos. *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles* (eds D.C.



Deeming & M.W.J. Ferguson), pp. 285-306. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Xavier, F. & Gavaud, J. (1986) Oviparity-viviparity continuum in reptiles; physiological characteristics and relation with environment. *Endocrine Regulations as Adaptive Mechanisms to the Environment* (eds I. Assenmacher & J. Boissin), pp. 79–93. CNRS, Paris, France.

Zimmerman, L.M., Vogel, L.A. & Bowden, R.M. (2010) Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 661-671.

## TABLES

**Table 1.** Schedule of the experiment. Oviparous and viviparous female lizards hibernated in the laboratory and were removed from hibernation at the same time to synchronize their reproductive cycle. Different parameters were measured to determine the costs of egg-retention in the two reproductive modes.

Dates	Reproductive stages and measurements
<b>Vitellogenesis</b>	
3 <sup>rd</sup> Feb.	End of hibernation, weighing
15 <sup>th</sup> Feb.-1 <sup>st</sup> March	Mating
<b>Egg-retention</b>	
2 <sup>nd</sup> March	Immune challenge (SRBC and anti-NDV injection), weighing
10 <sup>th</sup> -19 <sup>th</sup> March	Thermoregulation
<b>Egg-laying</b>	
22 <sup>nd</sup> March – 1 <sup>st</sup> April	First and last oviparous clutches: AVT-injection after natural oviposition
25 <sup>th</sup> March – 6 <sup>th</sup> April	First and last viviparous “eggs”: AVT-injection to induce parturition
Laying day	Weight and SVL
Day 1 after laying	Blood sample
Day 2 after laying	PHA test

**Table 2.** Effect of reproductive mode, the immune treatment (vaccination) and female size (SVL) on the variables measured during (A) egg retention and (B) after egg-laying. Non significant effects were eliminated sequentially, thus, in this table, we show the tests of the effects during model selection. Significant effects are in bold ( $P < 0.05$ ), marginally significant effects are underlined ( $P < 0.10$ ). The lysis response was square-root-transformed to achieve normality.

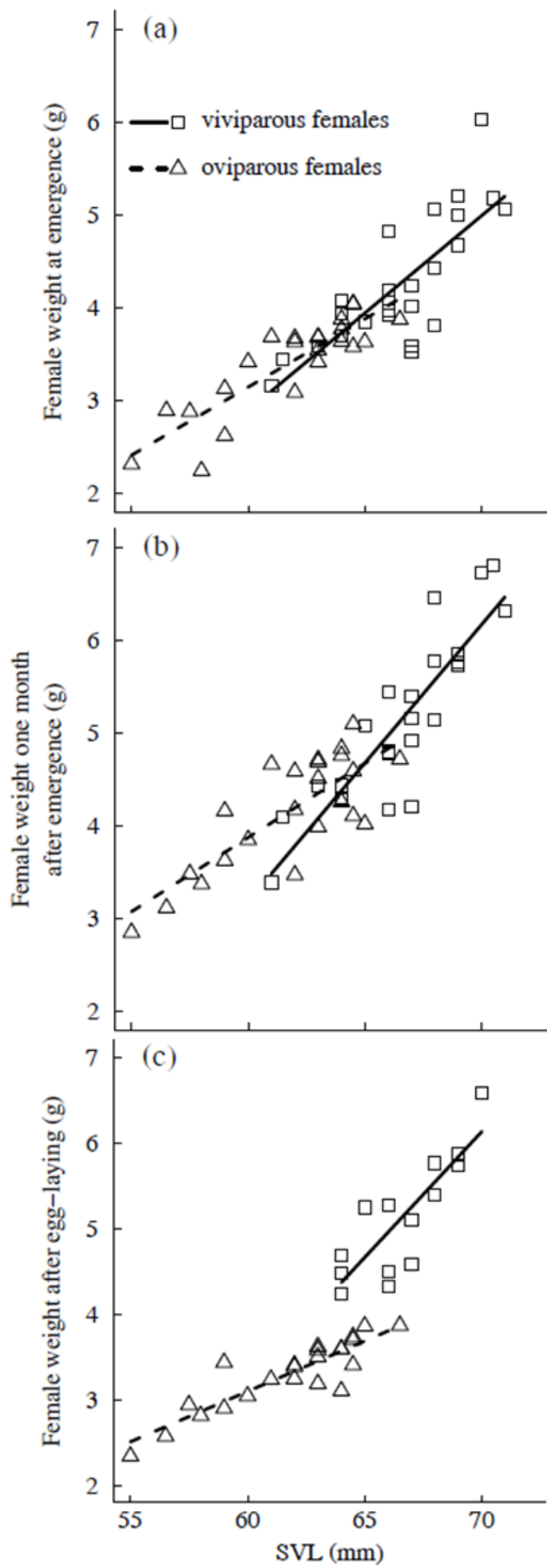
	Vaccination	Reproductive mode	Vaccination * Reproductive mode	SVL	Reproductive mode * SVL	Vaccination * SVL	Triple interaction
<b>A. During egg retention: thermoregulation</b>							
<b>Body temperature</b>	<b>F<sub>1,42</sub>=23.87,</b> <b>P&lt;0.0001</b>	<b>F<sub>1,42</sub>=6.89,</b> <b>P=0.0120</b>	<b>F<sub>1,42</sub>=13.15,</b> <b>P=0.0008</b>	<b>F<sub>1,42</sub>=9.18,</b> <b>P=0.0042</b>	F <sub>1,41</sub> =1.28, P=0.2636	<b>F<sub>1,42</sub>=24.69,</b> <b>P&lt;0.0001</b>	F <sub>1,40</sub> <0.01, P=0.9669
<b>Active</b>	F <sub>1,46</sub> =2.14, P=0.1503	F <sub>1,45</sub> =1.92, P=0.1731	F <sub>1,44</sub> =0.97, P=0.3298	F <sub>1,43</sub> =0.01, P=0.9094	F <sub>1,42</sub> =0.44, P=0.5131	F <sub>1,41</sub> =0.14, P=0.7098	F <sub>1,40</sub> =0.39, P=0.5372
<b>Basking</b>	F <sub>1,44</sub> =0.50, P=0.4837	<b>F<sub>1,46</sub>=10.21,</b> <b>P=0.0025</b>	F <sub>1,43</sub> =1.82, P=0.1848	<u>F<sub>1,45</sub>=3.20,</u> <u>P=0.0802</u>	F <sub>1,42</sub> =0.69, P=0.4124	F <sub>1,41</sub> =0.32, P=0.5771	F <sub>1,40</sub> =1.65, P=0.2057
<b>Full-basking</b>	F <sub>1,45</sub> =1.38, P=0.2463	<b>F<sub>1,46</sub>=5.38,</b> <b>P=0.0248</b>	F <sub>1,41</sub> =0.03, P=0.8734	F <sub>1,44</sub> =1.01, P=0.3213	F <sub>1,42</sub> =0.79, P=0.3805	F <sub>1,43</sub> =2.26, P=0.1404	F <sub>1,40</sub> =0.99, P=0.3266
<b>B. After egg laying: body mass and immunocompetence</b>							
<b>Weight growth</b>	F <sub>1,32</sub> =0.62, P=0.4370	<b>F<sub>1,35</sub>=57.70,</b> <b>P&lt;0.0001</b>	F <sub>1,30</sub> =0.82, P=0.3728	F <sub>1,34</sub> =0.36, P=0.5527	F <sub>1,33</sub> =2.25, P=0.1434	F <sub>1,31</sub> =1.34, P=0.2567	F <sub>1,29</sub> =0.60, P=0.4445
<b>PHA response</b>	F <sub>1,34</sub> =1.29, P=0.2641	F <sub>1,31</sub> =0.05, P=0.8238	F <sub>1,29</sub> =0.04, P=0.8481	F <sub>1,33</sub> =0.75, P=0.3941	F <sub>1,30</sub> =0.41, P=0.5267	F <sub>1,32</sub> =2.56, P=0.1191	F <sub>1,28</sub> =0.72, P=0.4029
<b>Lysis</b>	F <sub>1,29</sub> =0.30, P=0.5875	F <sub>1,29</sub> =1.88, P=0.1804	<b>F<sub>1,29</sub>=6.44,</b> <b>P=0.0168</b>	F <sub>1,29</sub> =0.11, P=0.7439	F <sub>1,29</sub> =1.86, P=0.1828	F <sub>1,29</sub> =0.39, P=0.5381	<b>F<sub>1,29</sub>=6.27,</b> <b>P=0.0182</b>

## FIGURES

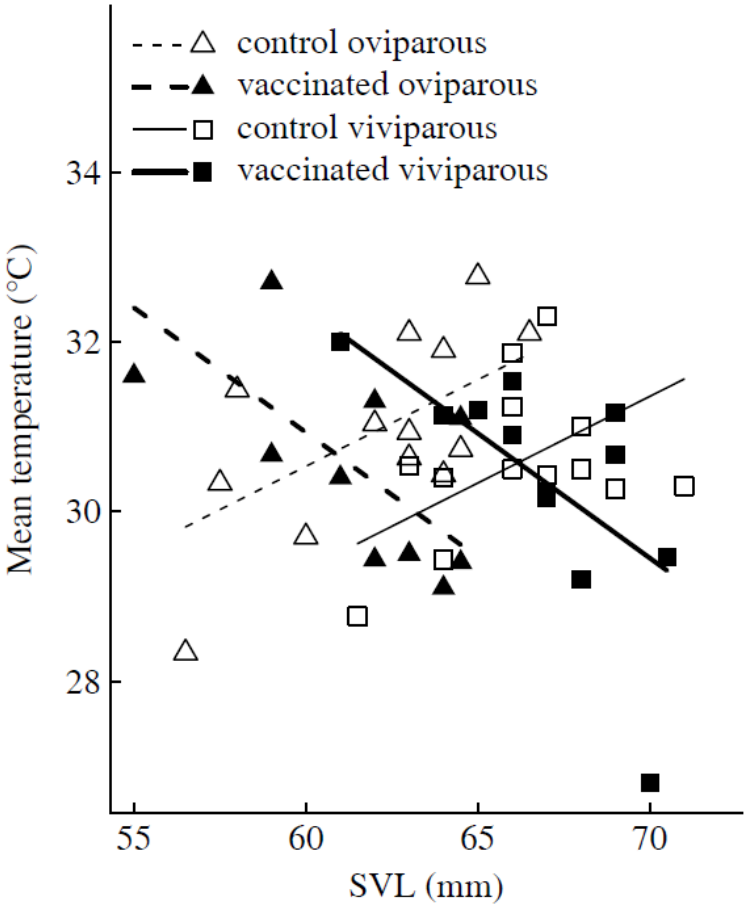
**Figure 1.** Photographs of common lizard females: a viviparous female from the Mont-Lozère (Photograph of J. Bleu).



**Figure 2.** Weight of oviparous and viviparous females at (a) emergence (3<sup>rd</sup> February 2011), (b) after reproductive investment (*i.e.* vitellogenesis, 2<sup>nd</sup> March 2011) and (c) after egg-laying. (a) The interaction between reproductive mode and SVL is not significant:  $F_{1,44} = 2.71$ ,  $P = 0.1068$ , the main factor reproductive mode is not significant:  $F_{1,44} = 2.67$ ,  $P = 0.1094$ , and the SVL is highly significant:  $F_{1,44} = 32.71$ ,  $P < 0.0001$ . (b) The interaction between reproductive mode and SVL is significant:  $F_{1,44} = 10.33$ ,  $P = 0.0025$ , the main factor reproductive mode is significant:  $F_{1,44} = 2.67$ ,  $P = 0.0023$ , and the SVL is highly significant:  $F_{1,44} = 30.62$ ,  $P < 0.0001$ . (c) The interaction between reproductive mode and SVL is significant:  $F_{1,34} = 15.84$ ,  $P = 0.0003$ , the main factor reproductive mode is significant:  $F_{1,34} = 12.96$ ,  $P = 0.0010$ , and the SVL is highly significant:  $F_{1,34} = 34.77$ ,  $P < 0.0001$ . Slopes from these statistical models are drawn on the figure.



**Figure 3.** Mean body temperatures. Body temperatures were measured 3 times with an infrared thermometer. Body temperatures depend on female size, female reproductive mode (oviparous and viviparous females) and the treatment (vaccinated and control females). See Table 2 for statistics. Slopes were estimated from the model in Table 2.



**Annexe 6 : Incubations *in vitro* d'embryons vivipares de lézards**

**Appendix 6: *In vitro* incubation of viviparous lizard embryos**

## METHODS

### *(a) Harvesting of the embryos*

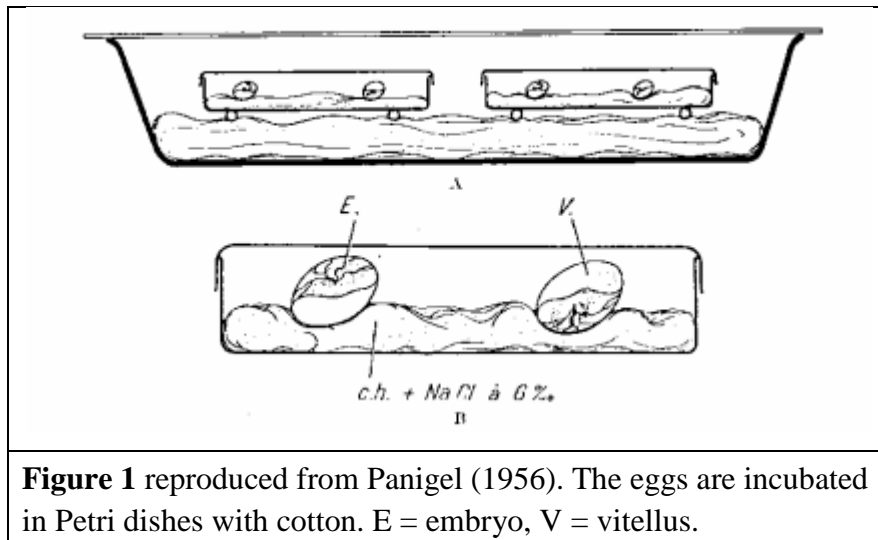
We harvested the “eggs” at approximately mid-development. In this lecithotrophic viviparous species, eggs consist of a developing embryo and a yolk sac (the vitellus) which are surrounded by a thin and soft transparent shell. The eggs were removed from the females with two methods: (1) the surgical procedure described in Appendix 4 and (2) the hormonal procedure described in Appendix 5. Briefly, the hormonal procedure consists of an AVT-injection which induces parturition. However, this method is less successful than the surgical procedure because approximately half of the eggs are damaged when laid experimentally and cannot be incubated. When we manage to incubate intact eggs, there is no difference of success rate depending on the method of harvesting.

### *(b) Incubation*

#### **Panigel’s publication**

Panigel (1956) described a method of egg incubation for viviparous eggs of the common lizard. The method is simple: the eggs are harvested at mid-development and are placed in a Petri dish containing only cotton wool moistened with NaCl at 6 ‰, and the Petri dish is placed in a large covered glass receptacle containing distilled water to maintain humidity (see **Figure 1**). The eggs are incubated at 27°C or room temperature (18-22°C). Panigel reported 3 successful hatchings out of 10 incubated eggs and a high mortality at the time of hatching for the other embryos. The development is more rapid at 27°C than at room temperature.

This method has been used by other embryologists (Holder & Bellairs 1962; Maderson & Bellairs 1962; Moffat & Bellairs 1964; Bryant & Bellairs 1970). In particular, Maderson and Bellairs (1962) reported that temperatures above 30°C are not suitable for successful incubation.



**Figure 1** reproduced from Panigel (1956). The eggs are incubated in Petri dishes with cotton. E = embryo, V = vitellus.

### Incubation during summer 2009

We used the same protocol as described by Panigel (1956): the eggs were incubated at 27°C in a Petri dish with cotton wool moistened with saline (NaCl 6 ‰). We placed 1 or 2 eggs in each Petri dish. Moreover, we also tested other culture media. Eggs were incubated either with saline or Tyrode solution. The Tyrode solution is composed of: 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.2g CaCl<sub>2</sub>, 0.1g MgCl<sub>2</sub>, 1g NaHCO<sub>3</sub>, 0.05g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1g of glucose in 1L of distilled water and is frequently used for incubation (Raynaud 1959a; Lutz & Dufaure 1960). We also tested the efficiency of neomycine (Raynaud 1959a; Raynaud 1959b) and albumen (Raynaud 1959a; Moffat & Bellairs 1964; Dufaure 1966; Holtzman & Halpern 1989) for their role in preventing infection. However, the use of neomycine or albumen did not improve the incubation, and thus in the results we will only present the differences between the Tyrode and saline solution.

In 2009, even if some development was observed, no embryos hatched successfully, and thus the method was adapted the following summer.

### Incubation during summer 2010

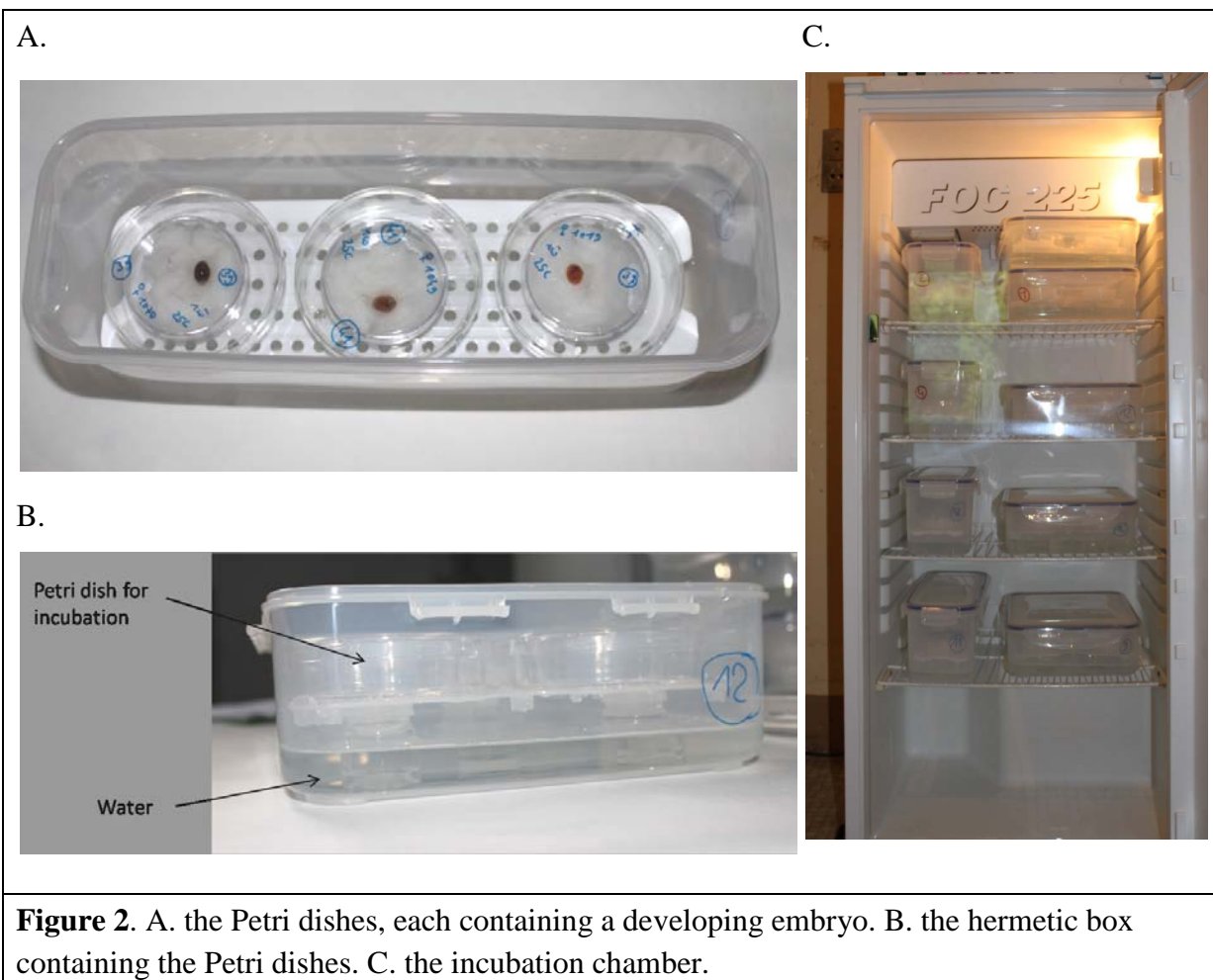
Most of the modifications of the incubation procedure were decided after discussions with James Stewart. In particular, J. Stewart told us that he managed to successfully incubate eggs only if the culture medium contained calcium (unpub. results). In this species, calcium is provided by the mother to the embryos, it is not contained in the yolk (Stewart et al. 2009).

Each egg was deposited in a separate Petri dish (60\*20 mm) in a nest-shaped cotton wool. This small Petri dish was placed inside a larger Petri dish (100\*20 mm) (**Figure 2A**). The Petri dishes are placed in a large hermetic box containing distilled water to maintain



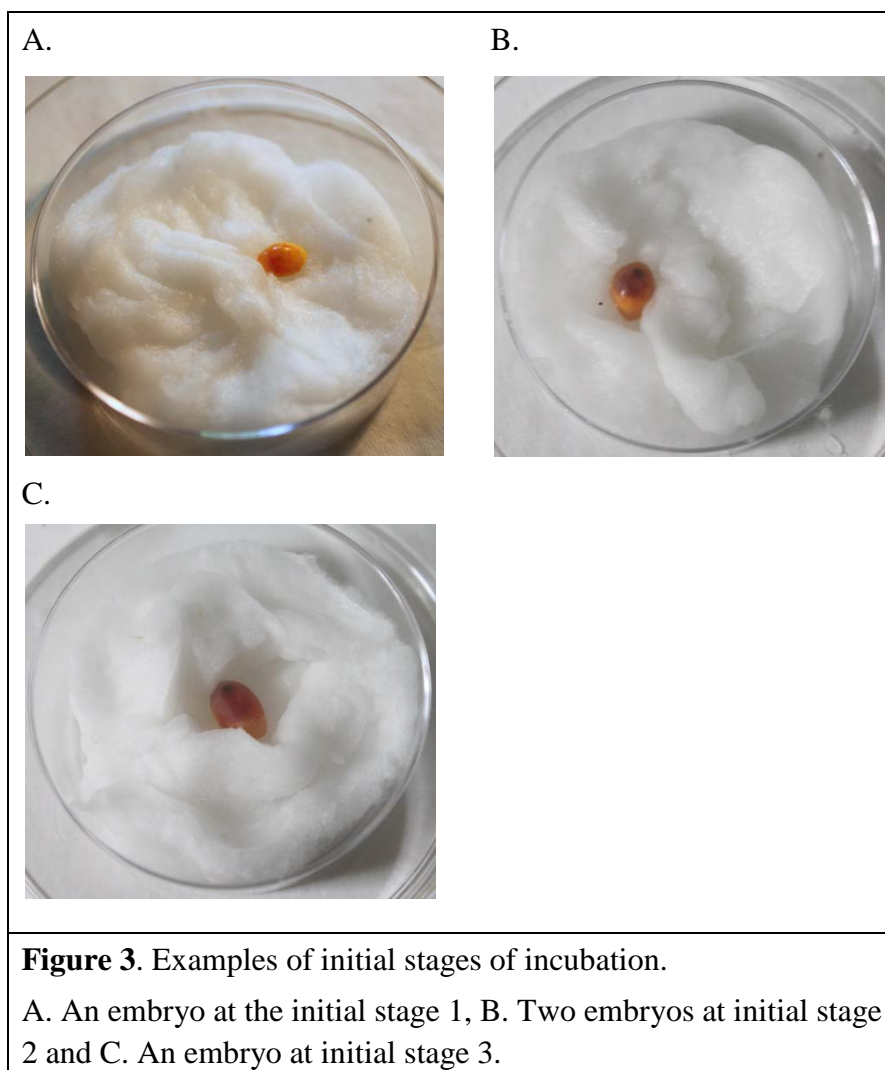
humidity (**Figure 2B**). The cotton wool was humidified with one culture medium: 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.2g CaCl<sub>2</sub>, 0.15g MgCl<sub>2</sub>, 1.0g NaHCO<sub>3</sub>, 0.04g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1L of distilled water. This culture medium is close to the Tyrode solution but does not contain glucose. When possible, the eggs were placed with the embryo uppermost and the yolk downwards. We opened all the boxes every 3-4 days (every day at the end of the incubation period). Near hatching, most of the water was removed from the Petri dish as recommended by Moffat and Bellairs (1964). We decided to “hatch” the eggs manually when the females naturally gave birth to the rest of the litter (in general we removed only half of the litter for incubation).

The eggs were placed at different temperatures in the incubation chambers (**Figure 2C**): at 25°C constant or in a cyclic environment. The cyclic environment is supposed to be more realistic and was set at 27°C from 8h to 20h (during 12h) and at room temperature (20-22°C) during the night (during 12h).



### Stages at incubation

We determined the stage of the embryos visually before incubation (the thin eggshell is transparent). However, it was not very precise and thus the embryos were grouped in 3 categories. We also precisely defined the stages of some embryos fixed in Bouin solution according to the classification of Dufaure and Hubert (1961). Thus, we have three initial stages: 1: no embryo visible or a small embryo with no pigmented eyes (< stage 32, **Figure 3A**), 2: the eyes are pigmented (stages 32-34, **Figure 3B**), 3: the eyes are pigmented and the size of the embryo is important, sometimes there is some pigmentation of the embryo (stages 35-37, **Figure 3C**).



## RESULTS

The incubations resulted in different percentage of development (**Table 1**). Some embryos died rapidly after the beginning of the incubation and showed no sign of development (final stage “no development”), or some development (final stage “some development”). Some other embryos apparently completed development but died before hatching (“fully formed”), or died few seconds/hours after hatching (“hatched and died”). Finally, we also obtained some alive newborns (final stage “alive”). These newborns were kept at least one week in the lab and then were released in the field.

**Table 1. Results of the incubation** according to the initial stage of the egg and the factor tested: A in 2009 we tested two culture media (and the eggs were incubated at 27°C constant), and B in 2010 we tested two incubation temperatures (and the culture medium was close to the Tyrode solution without glucose).

### A. 2009

		Culture media	Tyrode			Saline				
			Initial stage			Initial stage				
			Total	1	2	3	Total	1	2	3
Final stage	No development		<b>44</b>	2	34	8	<b>48</b>	9	27	12
	Some development		<b>12</b>	0	5	7	<b>3</b>	0	3	0
	Fully formed		<b>13</b>	0	3	10	<b>14</b>	0	1	13
		<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>2</b>	<b>42</b>	<b>25</b>	<b>65</b>	<b>9</b>	<b>31</b>	<b>25</b>

### B. 2010

		Temperatures	25°C constant			Cycling				
			Initial stage			Initial stage				
			Total	1	2	3	Total	1	2	3
Final stage	No development		<b>23</b>	10	7	6	<b>13</b>	6	5	2
	Some development		<b>3</b>	1	1	1	<b>2</b>	0	0	2
	Fully formed		<b>1</b>	0	1	0	<b>1</b>	0	0	1
	Hatched and died		<b>3</b>	0	1	2	<b>2</b>	0	2	0
	<b>Alive</b>		<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
		<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>20</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>7</b>

**Table 2. Characteristics of alive *in vitro* newborns** compared to *in vivo* newborns born after normal gestation in 2010. The sex ratio is defined as the ratio of the number of males and the number of individuals. Ventral scales of newborns are counted to determine their sex (Lecomte et al. 1992) and their symmetry. We gave small pieces of food (*Pyralis* larva) to estimate the capacity or willingness of the newborns to eat.

	<i>In vitro</i> (N = 7)	<i>In vivo</i> (N = 175)
Weight (g)	mean = 0.19 [from 0.16 to 0.22]	mean = 0.17 [from 0.11 to 0.24]
Size (SVL, mm)	mean = 21.71 [from 19.5 to 23]	mean = 22.54 [from 19.5 to 25.5]
Sex ratio	0.43	0.49
% symmetric individuals	29	23
% eating food	100	97

It is possible to incubate eggs at mid-development but it seems not possible to successfully incubate eggs at early development. The importance of the culture media must be investigated more thoroughly: even if we did not obtain alive newborns, the embryos were able to develop with only saline. Also, 27°C seem to be a too high temperature to obtain alive newborns because it induces too rapid development. We did not detect effects of the constant or the cyclic temperature treatments (**Table 1**). The few alive newborns obtained in 2010 after the *in vitro* incubation were comparable to the “normal” newborns (**Table 2**).

## EXAMPLES

Some pictures of developing embryos (**Figure 4** and **Figure 5**). On all these pictures the Petri dish has a diameter of 60 mm.

**Figure 4.** Two eggs incubated at 27°C in Tyrode in 2009.

28<sup>th</sup> of June: initial stage 3



3<sup>rd</sup> of July



7<sup>th</sup> of July: dead fully formed embryos



**Figure 5.** One egg incubated at 25°C constant in 2010

6<sup>th</sup> July : initial stage 2



9<sup>th</sup> July



12<sup>th</sup> July



15<sup>th</sup> July



18<sup>th</sup> July



21<sup>st</sup> July



The egg is hatched on 21<sup>st</sup> July: the newborn is fully formed and alive (SVL = 21mm)



## ACKNOWLEDGEMENT

I am thankful to James Stewart for sharing his results and his protocol.

## LITERATURE CITED

- Bryant, S. V., & Bellairs, A. d'A.** 1970. Development of regenerative ability in lizard, *Lacerta vivipara*. *American Zoologist*, **10**, 167-173.
- Dufaure, J. P., & Hubert, J.** 1961. Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, **50**, 309-328.
- Dufaure, J.-P.** 1966. Recherches descriptives et expérimentales sur les modalités et facteurs du développement de l'appareil génital chez le lézard vivipare (*Lacerta vivipara* Jacquin). *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, **55**, 437-537.
- Holder, L. A., & Bellairs, A. d'A.** 1962. The use of reptiles in experimental embryology. *British Journal of Herpetology*, **3**, 54-61.
- Holtzman, D. A., & Halpern, M.** 1989. In vitro technique for studying garter snake (*Thamnophis* sp.) development. *Journal of Experimental Zoology*, **250**, 283-288.
- Lecomte, J., Clobert, J., & Massot, M.** 1992. Sex identification in juveniles of *Lacerta vivipara*. *Amphibia-Reptilia*, **13**, 21-25.
- Lutz, H., & Dufaure, J.-P.** 1960. Culture d'embryons et d'organes du lézard vivipare (*Lacerta vivipara*). *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De L'Académie Des Sciences*, **250**, 2456-2458.
- Maderson, P. F. A., & Bellairs, A. d'A.** 1962. Culture methods as an aid to experiment on reptile embryos. *Nature*, **195**, 401-402.
- Moffat, L. A., & Bellairs, A. d'A.** 1964. Regenerative capacity of tail in embryonic and post-natal lizards (*Lacerta vivipara* Jacquin). *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, **12**, 769-786.
- 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, Zoologie (XI)*, **18**, 569-668.
- Raynaud, A.** 1959a. Une technique permettant d'obtenir le développement des oeufs d'orvet (*Anguis fragilis* L) hors de l'organisme maternel. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De L'Académie Des Sciences*, **249**, 1715-1717.
- Raynaud, A.** 1959b. Développement et croissance des embryons d'orvet (*Anguis fragilis* L) dans l'oeuf incubé in vitro. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De L'Académie Des Sciences*, **249**, 1813-1815.
- Stewart, J. R., Ecay, 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**, 2520-2524.