



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
L'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Jérémie SOUCHET

Le XX Décembre 2020

Effets de l'hypoxie d'altitude sur le développement embryonnaire et les performances juvéniles chez la Couleuvre vipérine, *Natrix maura*, dans le contexte actuel du changement climatique

École doctorale et spécialité :

ED SEVAB : Écologie, biodiversité et évolution

Unité de recherche :

Station d'Écologie Théorique et Expérimentale, CNRS – Université Paul Sabatier,
UMR 5321, 2 route du CNRS, 09200 Moulis, France

Directeurs de Thèse :

Hervé PHILIPPE & Fabien AUBRET

Composition du Jury :

François BRISCHOUX	Chargé de recherches	Rapporteur
Patricia GIBERT	Directrice de recherches	Rapporteuse
Yann VOITURON	Enseignant chercheur	Rapporteur
Nathalie MONDY	Maitre de conférences	Examinatrice
Philipp HEEB	Directeur de recherches	Examineur
Hervé PHILIPPE	Directeur de recherches	Directeur
Fabien AUBRET	Chargé de recherches	Co-directeur
Eric J. GANGLOFF	Assistant Professor	Encadrant

Finesse, subtilité, herpétologie...

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE.....	VII
AVANT-PROPOS.....	VIII
BILAN DES ACTIONS SCIENTIFIQUES.....	IX
Articles.....	IX
Conférences.....	XI
Posters.....	XII
Médiations.....	XII
FORMATIONS EFFECTUÉES.....	XIII
REMERCIEMENTS	XIV

Chapitre 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. Modifications environnementales et biodiversité	2
1.1.1. Extinctions de masse et perte de biodiversité.....	2
1.1.2. La plasticité phénotypique comme réponse aux modifications environnementales.....	5
1.1.3. Les impacts du changement climatique sur la biodiversité.....	7
1.1.4. La plasticité phénotypique dans le cadre du changement climatique	10
1.2. Les dépendances thermiques chez les ectothermes.....	12
1.2.1. Quelques généralités sur l'ectothermie	12
1.2.2. Les dépendances thermiques chez les reptiles non-aviens.....	13
1.2.3. Les dépendances thermiques chez les embryons de Reptiles non-aviens.....	15
1.2.4. Les reptiles non-aviens face au changement climatique.....	16
1.3. Le concept de la remontée altitudinale.....	17
1.4. Effets de l'hypoxie chez les Vertébrés.....	18
1.4.1. Effets de la condition hypoxique chez les embryons de reptiles non-aviens.....	19
1.4.2. Effets de la condition hypoxique chez les adultes de reptiles non-aviens	21
1.4.3. Effets de la température en condition d'hypoxie chez les reptiles non-aviens.....	23
1.5. Problématique et hypothèses générales.....	25
1.5.1. Contexte général.....	25
1.5.2. Pourquoi étudier la Couleuvre vipérine.....	26
1.5.3. Hypothèses générales.....	27

Chapitre 2. MODÈLE D'ÉTUDE ET PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	31
2.1. Modèle d'étude : La Couleuvre vipérine	32
2.1.1. Répartition et variations géographiques	32
2.1.2. Ecologie et biologie générale.....	33
2.2. Législation et autorisations	35

2.3. Méthodes utilisées	35
2.3.1. Maintien en captivité et incubation.....	35
2.3.2. Mesure de la fréquence cardiaque des embryons	39
2.3.3. Mesures morphologiques et marquage des juvéniles.....	40
2.3.4. Mesures des performances physiques des juvéniles.....	41
2.3.5. Mesures des taux métaboliques au repos des embryons et des juvéniles	42

Chapitre 3. EFFETS DE L’HYPOXIE D’ALTITUDE SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

ET LES PERFORMANCES JUVÉNILES	45
3.1. Présentation et hypothèses du chapitre	46
3.2. Résumé	47
3.3. Introduction.....	49
3.4. Materials and methods	51
3.4.1. Experimental design	51
3.4.2. Egg mass and heart rate measurements	52
3.4.3. Hatchling measurements.....	53
3.4.4. Swimming performance.....	53
3.4.5. Apnea performance	54
3.4.6. Data analysis	54
3.5. Results	55
3.5.1. Egg mass variation and embryonic heart rates	55
3.5.2. Hatching success and morphological measurements.....	55
3.5.3. Effects of incubation and translocation on swimming performance of juveniles	56
3.5.4. Effects of incubation and translocation on apnea performance of juveniles	56
3.6. Discussion	56
3.6.1. Embryo development and hatchling measurements	57
3.6.2. Swimming and apnea performance.....	58
3.6.3. General conclusion	59
3.7. Acknowledgements	60
3.8. Tables and figures.....	61

Chapitre 4. EFFETS DE L’HYPOXIE D’ALTITUDE ET DES VARIATIONS DE TEMPÉRATURES

SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LES PERFORMANCES JUVÉNILES	69
4.1. Présentation et hypothèses du chapitre	70
4.2. Résumé	72
4.3. Introduction.....	74
4.4. Materials and methods	76
4.3.1. Experimental design	76
4.3.2. Egg mass and heart rate measurements	78
4.3.3. Hatchling measurements.....	78
4.3.4. Swimming performance.....	79

4.3.5. Data analysis	79
4.5. Results	80
4.4.1. Test 1: Egg mass and embryonic heart rates	80
4.4.2. Test 2: Hatching success and morphological measurements	81
4.4.3. Tests 3 & 4: Swimming performance.....	82
4.6. Discussion	83
4.7. Acknowledgements	87
4.8. Tables and figures.....	88
Chapitre 5. EFFETS DE L’HYPOXIE D’ALTITUDE SUR LE MÉTABOLISME RESPIRATOIRE DES	
EMBRYONS ET DES JUVÉNILES.....	103
5.1. Présentation et hypothèses du chapitre	104
5.2. Résumé	106
5.3. Introduction	108
5.4. Materials and methods	109
5.4.1. Females capture and housing	109
5.4.2. Embryos incubation and measurements	110
5.4.3. Juveniles housing and measurements.....	111
5.4.4. Data analysis	111
5.5. Results	112
5.5.1. Egg mass variation and embryonic heart rates	112
5.5.2. Hatching and morphological measurements.....	112
5.5.3. Embryos and juveniles metabolic rate.....	112
5.6. Discussion	113
5.6.1. Maternal effect and hatchling phenotype.....	113
5.6.2. Embryos’ and juveniles’ metabolism	114
5.6.3. General conclusion	115
5.7. Acknowledgements	116
5.8. Tables and figures.....	117
Chapitre 6. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	127
6.1. Synthèse générale	128
6.1.1. Remise en contexte	128
6.1.2. Scénario 1 : normoxie et températures favorables	131
6.1.3. Scénario 2 : normoxie et réchauffement climatique	132
6.1.4. Scénario 3 : hypoxie d’altitude et températures favorables.	134
6.1.5. Scénario 4 : hypoxie d’altitude et réchauffement climatique.	137
6.2. Critiques et perspectives	140
6.2.1. Le phénomène de synchronie à l’éclosion.....	141
6.2.2. L’importance des données sur le long terme	142

6.2.3. Choix maternel et plasticité comportementale.....	143
6.2.4. L'hypoxie d'altitude similaire à l'hypoxie des sites de pontes ?	145
6.3. Conclusion générale	146
RÉFÉRENCES	149

Notes

Les crédits ne sont appliqués qu'aux documents n'appartenant pas à l'auteur.

L'ensemble des dessins d'illustrations des chapitres ont été réalisés par Hugo Le Chevalier

PRÉFACE

Associer les serpents et les montagnes dans ce manuscrit de thèse n'a rien de nouveau car cette histoire et ce projet de recherche prennent leurs origines, il y a environ 2000 ans, dans la mythologie grecque.

"Cependant le Carthaginois, troublant la paix du monde, se dirige vers les sommets chevelus des monts Pyrénéens. Des plateaux escarpés de leur cime orageuse, les Pyrénées contemplent de loin l'Ibère séparé du Celte, et conservent entre deux grandes contrées un divorce éternel. Ces montagnes ont reçu le nom de la fille de Bébryx, par le crime d'Alcide, son hôte. Dans le cours de ses travaux, il s'acheminait vers les royaumes lointains du triple Géryon. Captivé par Bacchus à la cour du Cruel Bébryx, il y laissa Pyréné séduite et bien à plaindre d'avoir été si belle. L'infortunée ! le dieu qui causa son malheur, ce dieu, s'il est permis de le croire, fut aussi cause de sa mort. Elle mit au monde un serpent : redoutant le courroux de son père, égarée, elle abandonna sur l'heure ses pénates chéris. Seule alors, au fond des antres, elle pleura la nuit passée aux bras d'Alcide, elle raconta aux sombres forêts les promesses du héros, elle accusa son ravisseur et ses ingrates amours : déchirée enfin par les bêtes, vainement elle tendit les bras à son hôte et invoqua le secours de ses armes. De retour et vainqueur, le Tirynthien arrosa de larmes ces membres mutilés ; il pâlit éperdu en retrouvant les traits de sa vierge bien-aimée. Aux éclats des douleurs d'Hercule, les sommets de la montagne tremblèrent ébranlés ; ses gémissements plaintifs appelaient Pyréné, et partout les rochers et les repaires des bêtes féroces redirent Pyréné. Il déposa enfin ses restes dans un tombeau et leur dit en pleurant un dernier adieu. Le temps n'a point détruit la mémoire de cet hommage, et ces montagnes conserveront dans tous les siècles ce nom tant déploré."

Extrait de : Les Puniques de Silius Italicus. Traduction M.E.-F. Corpet et M.N.-A. Dubois (1836-1838)

Cette histoire dans laquelle Pyréné donne naissance à un serpent dans les montagnes garde encore aujourd'hui tout son sens. Ainsi, le Pic du Midi de Bigorre, situé très en amont de la chaîne de montagnes et offrant une vue panoramique sur près de 300km, pourrait être le tombeau de Pyréné. Cette idée est confortée par le fait que sur la face Est de ce pic est visible un serpent, figé dans les plis mêmes de la roche. Et c'est exactement ici, au Pic du Midi de Bigorre que mes expériences de thèse et en partie le développement et la naissance de nombreux serpents en condition d'hypoxie ont lieu. *Coïncidence ou destinée ?*

AVANT-PROPOS

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le cadre d'un contrat doctoral à la Station d'Écologie Théorique et Expérimentale du CNRS de Moulis, UMR 5321, 2 route du CNRS 09200 Moulis, France. Ce projet n'aurait pas pu être mené à bien sans les soutiens financiers et/ou techniques :

- du Laboratoire d'Excellence TULIP (LabEx TULIP, France)
- du Programme Opérationnel de Coopération Territoriale Espagne-France-Andorre sur les Ectothermes des Pyrénées (POCTEFA EctoPyr, Espagne-France-Andorre)
- de l'Observatoire Midi-Pyrénées (OMP, France)
- de la société Nouvelles Pyrénées (N'Py, France)
- du Centre de Récupération des Amphibiens et des Reptiles de Catalogne (CRARC, Espagne)
- de l'association BOMOSA (Andorre)
- de l'association Nature En Occitanie (NEO, France)
- de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier (UPS, France)
- de l'École Doctorale Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénierie (SEVAB, France)



BILAN DES ACTIONS SCIENTIFIQUES

Articles

- **Souchet J.**, Gangloff E. J., Micheli G., Bossu C., Trochet A., Bertrand R., Clobert J., Calvez O., Martinez-Silvestre A., Darnet E., Le Chevalier H., Guillaume O., Mossoll-Torres M., Barthe L., Pottier G., Philippe H. & Aubret F. **2020**. High-altitude hypoxia impacts perinatal physiology and performance in a potential montane colonizer. Physiological plasticity in lizard embryos exposed to high-altitude hypoxia. *Integrative Zoology*. DOI: 10.1111/1749-4877.12468 (**Chapitre 3**)
- Lucati F., Poignet M., Miro A., Trochet A, Aubret F., Barthe L.? Bertrand R., Buchaca T., Caner J., Darnet E., Denoël M., Guillaume O., Le Chevalier H., Martinez-Silvestre A., Mossoll-Torres M., O'Brien D., Calvez O., Osorio V., Pottier G., Richard M., Saas I., **Souchet J.**, Tomas J. & Ventura M. **2020**. Multiple glacial refugia and restricted but effective present-day gene flow shaped the genetic structure of an endemic newt from the Pyrenees. *Molecular Ecology*. DOI: 10.1111/mec.15521 (**Hors cadre de la thèse**)
- Le Chevalier H., Mari-Mena N., Carro B., Prunier J.G., Bossu C., Darnet E., **Souchet J.**, Guillaume O., Calvez O., Bertrand R., Barthe L., Pottier G., Martinez-Sylvestre A., Verdaguer-Foz I., Mossol-Torres M., Trochet A. & Aubret F. **2019**. Isolation and characterization of fourteen polymorphic microsatellite markers in the viperine snake, *Natrix maura*. *Ecology and Evolution* **9**:11227-11231. (**Annexe 2**)
- Kouyoumdjian L., Gangloff E. J., **Souchet J.**, Cordero G.A., Dupoué A. & Aubret. F. **2019**. Transplanting gravid lizards to high elevation alters maternal and embryonic oxygen physiology, but not reproductive success or hatchling phenotype. *Journal of Experimental Biology* **222**. (**Annexe 3**)
- Grassini S., Valli K., **Souchet J.**, Aubret F., Segurini G.V., Revonsuo A. & Koivisto M. **2019**. Pattern matters: Snakes exhibiting triangular and diamond-shaped skin patterns modulate electrophysiological activity in human visual cortex. *Neuropsychologia* **131**:62-72. (**Hors cadre de la thèse**)

- Gangloff E. J., Sorlin M., Cordero G. A., **Souchet J.** & Aubret F. **2019**. Lizards at the peak: Physiological plasticity does not maintain performance in lizards transplanted to high altitude. *Physiological and Biochemical Zoology* **92**(2):189-200. **(Annexe 4)**
- Trochet A., Deluen M., Bertrand, R., Calvez O., Martinez-Silvestre A., Verdaguer-Foz I., Mossoll-Torres M., **Souchet J.**, Darnet E., Le Chevalier H., Guillaume O. & Aubret F. **2019**. Body Size Increases with Altitude Elevation in Pyrenean Brook Salamanders (*Calotriton asper*). *Herpetologica* **75**(1):30-37. **(Hors cadre de la thèse)**
- Trochet A., Dupoué A., **Souchet J.**, Bertrand R., Deluen M., Murarasu S., Calvez O., Martinez-Silvestre A., Verdaguer-Foz I., Darnet E., Le Chevalier H., Mossoll-Torres M., Guillaume O. & Aubret F. **2018**. Variation of preferred body temperatures along an altitudinal gradient: a multi-species study. *Journal of Thermal Biology* **77**:38-44. **(Hors cadre de la thèse)**
- Cordero G. A., Andersson B. A., **Souchet J.**, Micheli G., Noble D. W. A., Gangloff E. J., Uller T. & Aubret F. **2017**. Physiological plasticity in lizard embryos exposed to high-altitude hypoxia. *Journal of Experimental Zoology part A: Ecological and Integrative Physiology*: 1-10. **(Annexe 5)**
- Aubret F., Bignon F., Bouffet-Halle A., Blavillain G., Kok P. J. R. & **Souchet J.** **2017**. Yolk removal generates hatching asynchrony in snake eggs. *Scientific reports* **7**: 3041. **(Hors cadre de la thèse)**
- **Souchet J.** & Aubret F. **2016**. Revisiting the fear of snake in human: the role of aposematic signals. *Scientific Reports* **6**: 37619. **(Hors cadre de la thèse)**
- Bonnet X., Lecq, S., Lassay JL., Ballouard JM., Barbraud C., **Souchet J.**, Mullin S.J. & Provost G. **2016**. Forest management bolsters native snake populations in urban park. *Biological Conservation* **193**:1-8. **(Hors cadre de la thèse)**
- **(Accepté dans Biological Journal of the Linnean Society)** **Souchet J.**, Gangloff E. J., Bossu C., Darnet E., Le Chevalier H., Poignet M., Trochet A., Bertrand R., Calvez O., Martinez-Silvestre A., Mossoll-Torres M., Guillaume O., Dupoué A., Perrin C., Clobert J., Barthe L., Pottier G., Philippe H. & Aubret F. High temperatures limit developmental resilience to high-elevation hypoxia in the snake *Natrix maura* (Squamata: Colubridae). **(Chapitre 4)**
- **(Accepté dans Herpetological Review)** Martínez-Silvestre A., Trochet A., Calvez O., Poignet M., Le Chevalier H., Souchet J., Guillaume O., Bertrand R., Mossoll-Torres M., Aubret F., Soler J?, Miró A., Lucati F., Ventura M., Barthe L., Pottier G., Marschang R. & Bosch J. Presence of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild populations of the Pyrenean brook salamander (*Calotriton asper*, Dugès, 1982). **(Hors cadre de la thèse)**

- **(Soumis dans Diversity and Distributions)** Dupoué A., Trochet A., Richard M., Sorlin M., Teulière Quillet J., Vallé C., Rault C., Berroneau M., Berrneau M., Lourdais O., Blaimont P., Bertrand R., Guillon M., Pottier G., Calvez O., Guillaume O., Le Chevalier H., **Souchet J.**, Le Gaillard J. F., Clobert J., Aubret F. Genetic and demographic trends shaped by climate change on both range margins of a cold-adapted lizard. **(Hors cadre de la thèse)**
- **(In prep.)** Sinervo B., Bertrand R. Darnet E., Le Chevalier H., Trochet A., Dupoué A., **Souchet J.**, Calvez O., Perrin C., Martin-Garcia R., Barthe L., Pottier G., Martinez-Silvestre A., Verdaguer-Foz I., Mossoll-Torres M., Guillaume O., Gangloff E. J., Blaimont P., Heulin B., Miles D. B., D'Amico F., Clobert J. & Aubret F. Ecophysiological Species Distribution Models for Pyrenean Ectotherms under Climate Change. **(Hors cadre de la thèse)**
- **(In prep.)** Boissinot A., Grillet P., **Souchet J.**, Morin-Pinaud S. & Lourdais O. Selection of post-breeding habitat in the Common Frog (*Rana temporaria*) in a hedgerows landscape in western France. **(Hors cadre de la thèse)**

Conférences

- **Souchet J.**, Grassini S. & Aubret F. **2019**. Role of aposematic signals in fear of snakes at human. *14th Ecology and Behaviour meeting*, Toulouse (France)
- **Souchet J.**, Gangloff E. J., Aubret F. & Philippe H. **2019**. Effects of high altitude hypoxia in snake development and plasticity. *14th Ecology and Behaviour meeting*, Toulouse (France)
- **Souchet J.**, Grassini S. & Aubret F. **2018**. Les rôles des signaux aposématiques dans la peur des serpents. *46^{ème} congrès de la Société Herpétologique de France*, Carnoules (France)
- **Souchet J.** **2017**. Altitudinal colonization and adaptability to hypoxia at reptiles. *13th Ecology and Behaviour meeting*, Chizé (France)
- **Souchet J.** **2016**. Colonisation altitudinale et adaptabilité à l'hypoxie chez les reptiles. *Journée DiPEE Midi-Pyrénées. Rencontre transdisciplinaire de sept laboratoires sur le thème : « Comportement et Environnement »*, Toulouse (France)
- **Souchet J.**, Chevalier T., Lecq S., Provost G. & Bonnet X. **2013**. Suivi de populations de serpents en forêt de Chizé - Extension à un site du Mans. *29^{ème} festival de Ménigoute : 8^{ème} rencontres nationales sur la conservation des Amphibiens et Reptiles*, Ménigoute (France)

Posters

- Trochet A., Guillaume O., Calvez O., Clobert J., Perrin C., Bousquet M., Bertrand R., **Souchet J.**, Barthe L., Pottier G., Altimir A., Mossoll-Torres M., Madrenys E., Martinez- Silvestre A. & Aubret F. **2016**. Projet Interreg POCTEFA ECTOPYR. *44^{ème} congrès de la Société Herpétologique de France*, Namur (Belgique)
- **Souchet J.**, Micheli G., Bossu C. & Aubret F. **2016**. Colonisation altitudinale et adaptabilité à l'hypoxie : une contrainte ignorée du réchauffement climatique sur la biodiversité. *44^{ème} congrès de la Société Herpétologique de France*, Namur (Belgique)
- **Souchet J.**, Sarraude T. & Aubret F. **2015**. Perception de la signalétique de danger chez les enfants : exemple des signaux aposématiques animaux. *43^{ème} congrès de la Société Herpétologique de France*, Toulouse (France)

Médiations

- Conférence (**2019**). Des serpents dans les nuages. *Festival Pint of Science*, Toulouse
- Radio (**2019**). L'intelligence des reptiles. *Emission « le Nid de Pie » sur campus FM*, Toulouse
- Conférence (**2018**). Des serpents dans les nuages. *La nuit européenne des chercheur.e.s*, Toulouse
- Court métrage (**2018**). Les gardiens de la montagne. *Produit par le projet Poctefa Ectopyr*
- Clip vidéo (**2017**). Partage Ta Science, l'écophysiologie avec Jérémie Souchet. *13^{ème} congrès Ecology and Behaviour*, Chizé
- Radio (**2017**). Changement climatique et biodiversité. *Emission « la puce à l'oreille » de la radio de l'Association des Naturalistes d'Ariège*
- Conférence (**2017**). Impacts du réchauffement climatique sur la faune des Pyrénées. *Les mercredis de l'ANA*, Foix
- Article de Presse (**2016**). Moulis teste l'adaptabilité des reptiles au Pic du Midi de Bigorre. *La Dépêche du Midi*.
- Article de presse (**2015**). Jérémie, L'étudiant qui veut savoir d'où vient la peur des serpents. *La Gazette Ariègeoise*
- Reportage (**2014**). Couleuvres et vipères, les serpents de nos régions - Des serpents suivis à la trace. *Emission « Les Animaux de la 8 - Les Deux-Sèvres, une terre animale méconnue »*

FORMATIONS EFFECTUÉES

- Enseignement dans le secondaire et encadrement de groupes d'étudiants de Master 1 lors de stage de formation d'une semaine au Centre d'Etudes Biologiques de Chizé – CNRS de Chizé

Année : 2016 / Nombre d'heure de formation : 25 heures

- Formation à l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques sur faune sauvage non hébergée, Niveau concepteur délivrée par le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

Année : 2017 / Nombre d'heure de formation : 57 heures

- Formation de tutorat à la prise de sang intracardiaque chez les ophidiens délivrée par Albert Martinez Silvestre, Docteur vétérinaire diplômé du European College of Zoo Medicine (spécialité en herpétologie) et responsable du Centre de Récupération des Reptiles et des Amphibiens de Catalogne (CRARC ; Masquefa, Espagne)

Année : 2018 / Nombre d'heure de formation : 3,5 heures

- Formation maintien de capacité « Les points limites » délivrée par la délégation Occitanie Ouest du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

Année : 2019 / Nombre d'heure de formation : 3,5 heures

- Participation à la Nuit européenne des chercheur.e.s à Toulouse pour « ma thèse en 5 min chrono »

Année : 2018 / Nombre d'heure de formation : 18 heures

- Membre actif (pigiste et conférencier) de l'association Ad Naturam spécialisée dans la vulgarisation de l'écologie scientifique (<https://adnaturam.org>)

Année : 2017 à 2019 / Nombre d'heure de formation : 25 heures

Total des heures de formations effectuées : **132 heures**

REMERCIEMENTS

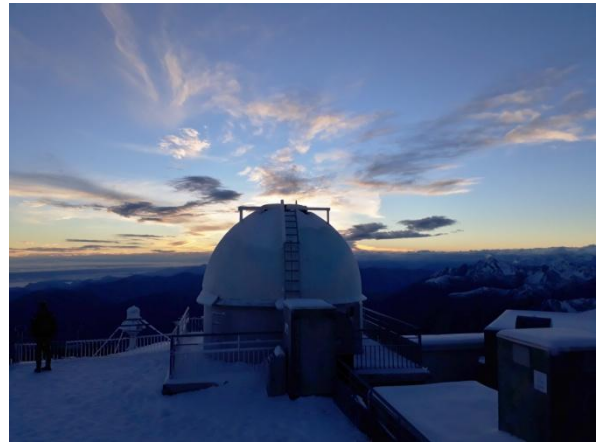
Les remerciements, ce moment attendu et redouté. D'un côté cela signifie que le projet et l'épreuve se terminent mais d'un autre côté ils nous mettent souvent face à un avenir incertain. Néanmoins, c'est toujours un plaisir de prendre quelques instants pour repenser à tous ces moments partagés.

La Station d'Ecologie Théorique et Expérimentale ne portait pas encore ce nom quand j'y suis venu pour la première fois en 2015. A cette époque le laboratoire se nommait "Station d'Ecologie Expérimentale" et je venais y réaliser mon stage de Master 2. Le stage traitait de la peur des serpents à travers la perception des signaux aposématifs animaux chez l'enfant. Un sujet à la frontière de la sociologie et de l'écologie qui m'a permis de découvrir l'Ariège et surtout la richesse de ses paysages. Une fois tombé sous le charme du Couserans, difficile de le quitter, c'est pourquoi j'ai été ravi de commencer cette thèse, un an après avoir quitté la station.

Avant toute chose, j'aimerais remercier **Fabien Aubret** et **Hervé Philippe** de m'avoir fait confiance et de m'avoir financé ce projet de recherche en me donnant l'opportunité de travailler sur les effets de l'hypoxie d'altitude chez une espèce de serpent, la Couleuvre vipérine. Une espèce qu'en temps que naturaliste amateur et herpétologue j'apprécie énormément.

Travailler sur l'hypoxie d'altitude nécessite de pouvoir exposer son modèle d'étude à cette condition. Pour cela, rien de mieux que de travailler sur un pic mythique des Pyrénées : le Pic du Midi de Bigorre. Avec son observatoire culminant à 2877 m et sa position géographique très en avant de la chaîne des Pyrénées, le Pic du Midi de Bigorre offre, en plus des conditions de travail incroyables, une vue imprenable sur le massif. C'est un site touristique depuis les années 2000 mais c'est avant tout un site historiquement fort depuis 1878 pour la recherche en astronomie et en météorologie. C'est l'ensemble de ce que représente le Pic du Midi de Bigorre ainsi que **toutes les personnes qui y travaillent** et que j'ai eu le plaisir de rencontrer durant 3 campagnes de récolte de données que je souhaite remercier. Merci pour l'ensemble des connaissances transmises sur le système solaire et sur l'histoire du Pic. Merci pour l'aide apportée pour me faciliter au maximum les conditions de travail, pour votre intérêt et votre curiosité vis-à-vis de mon projet de recherche et merci pour tous les moments partagés de jour comme de nuit et surtout pour ce concert de Christophe Willem. Merci aussi et surtout d'avoir mis en place un téléphérique car les ascensions quotidiennes auraient été

longues et fastidieuses. Et pardon à tous ceux qui avec moi dans la cabine, sachant que je transportais des serpents, ont passé quelques longues minutes entre stress et fascination.



(A gauche) Une des cabines du téléphérique permettant d'atteindre sans effort, et en 15 min seulement, le sommet du Pic du Midi de Bigorre. (A droite) Levé de soleil par dessus les coupoles enneigées au Pic du Midi de Bigorre depuis la salle de travail.

Bien entendu tout ce travail, toutes ces expériences n'auraient pu être possibles sans l'aide technique de nombreuses personnes. Un merci aussi grand que possible à **Eric J. Gangloff**, pour ton aide sur l'ensemble de mon travail. De la conception des protocoles aux analyses stats en passant par l'aide à la rédaction et les discussions, tu as été d'une aide précieuse, ta sympathie et ta gentillesse n'enlevant rien au reste. J'espère avoir le plaisir de continuer à travailler avec toi. Ces remerciements vont aussi à **Elodie Darnet** et **Hugo Le Chevalier** pour toutes leurs aides sur les expériences. Etant incapable de me dédoubler, vous m'avez permis de survivre en prenant à votre charge une grosse partie du travail. Merci pour votre aide et votre soutien, sans vous les soirées post manips ne seraient sûrement pas les mêmes. Un grand merci également à **Audrey Trochet** et **Olivier Calvez** pour leur soutien, leur dynamisme et leur aide dans toutes les parties administratives et éthiques du projet. Sans vous il aurait été difficile de réaliser tout ce projet dans de bonnes conditions. Un merci également à tous les stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer et de collaborer **Gaëlle Micheli**, **Coralie Bossu**, **Sophie Murarasu**, **Amandine Hibert**, **Noémie Hennes**, **Léa Brun**, **Manon Poignet**, **Alicia Josserand**, **Lény Kerekdjian** et **Lauriane Begué**. Vous avez passé de quelques jours à quelques mois avec moi au Pic du Midi de Bigorre mais j'espère que vous avez apprécié votre passage à Moulis. Merci spécial à **Marine Deluen**, **Ayala Loisel**, **Laura Kouyoumdjian**, **Laurane Winandy**, **Jérôme G. Prunier**, **Audrey Trochet**, **Elodie Darnet**, **Isabel Cantera** et **Kévin Liautaud**, mes correcteurs des première et dernières minutes, qui ont pris le temps de lire, de corriger et de remanier ce manuscrit mais surtout qui m'ont sorti des impasses dans lesquelles je me suis souvent trouvé.

Un merci va également à l'ensemble des membres du projet interreg Poctefa Ectopyr, projet dans lequel mes travaux de thèse s'inscrivent. Merci à vous pour tous les échanges autour des reptiles et des Amphibiens des Pyrénées. Pour ne citer que ceux qui ne l'ont pas été précédemment, merci à **Jean Clobert, Olivier Guillaume, Christine Perrin, Romain Bertrand, Marion Bousquet, Andréaz Dupoué, Rebecca Martin Garcia, Laurent Barthe, Gilles Pottier, Albert Martinez-Silvestre, Isabel Verdaguer, Marc Mossol-Torres et Edgar Madrenys**. Merci à l'ensemble de l'équipe administrative de la SETE, **Marion Bousquet, Séverine Bonzom, Jade Manaud et Myriam Istoczak** pour leur soutien et leur aide dans toutes les longues procédures de missions, d'achats, de conventions. Merci également à **Dominique Pantalacci**, sans qui les procédures administratives de l'Ecole Doctorale et de l'Université seraient un véritable calvaire. Merci aussi à **Thomas Deruelles** pour son aide logistique durant la création des élevages et des dispositifs expérimentaux. Enfin, j'aimerais envoyer mes remerciements certes plus généraux mais néanmoins sincères à l'ensemble du personnel de la Station de Moulis. Merci pour votre aide au quotidien et tous les échanges que nous avons pu avoir durant ces nombreuses années.

Un bref mais néanmoins grand merci à **Stéphane Lecq, Xavier Bonnet, Alexandre Boissinot et Olivier Lourdais** qui m'ont ouvert les premiers les portes de la recherche et des reptiles. Je n'en serais pas là sans votre confiance et les enseignements que vous m'avez transmis dans mes premières années de stage. Un merci spécial à **Stéphane** qui n'a pas écouté les critiques de mes enseignants à mon égard et sans qui rien n'aurait commencé.

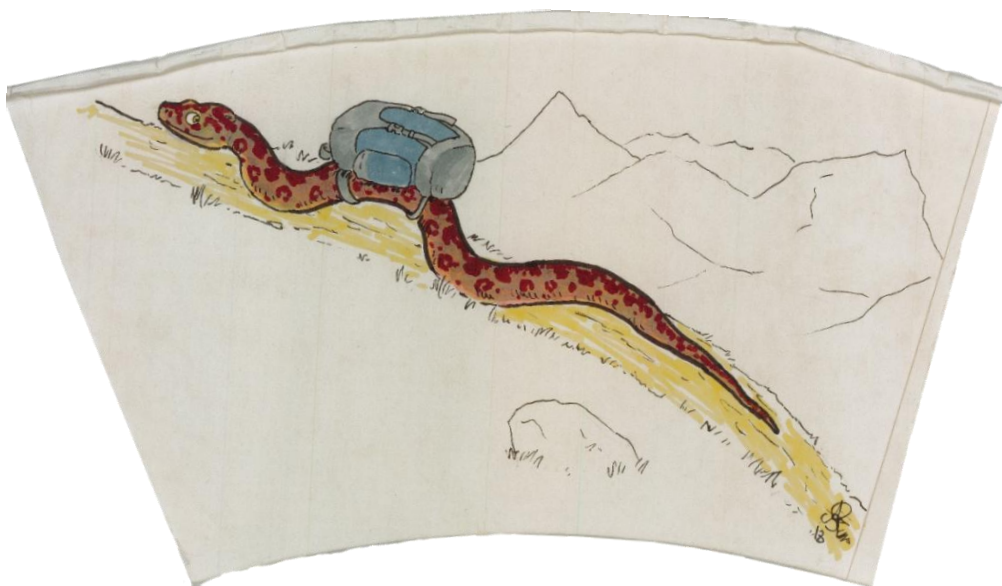
Merci à **Hugo Le Chevalier, Marine Deluen, Lorrie Carassini, Pauline Clin, Laura Kouyoumdjian, Orlane Scelsi et Océane Liehrman**, tous membres de l'association de vulgarisation d'écologie scientifique Ad Naturam. Grâce à vous et à cette association, j'ai su prendre du recul sur ma recherche et la recherche en général. J'ai pu prendre goût à la vulgarisation et à la communication du travail scientifique et aux plaisirs que l'on peut avoir à le valoriser auprès de tous.

Finalement, un doctorat à Moulis, perdu dans les vallées du Couserans ne pourrait pas se faire sans la présence d'une vie sociale forte (#looseranslife). Vous êtes nombreux à enrichir mon quotidien et je vais essayer de n'oublier personnes : **Marine, Vincent, Audrey, Olivier, Elodie, Nico, Hugo, Laurane, Rik, Léa, Mathieu, Julien, Elvire, Lisa, Alice, Etienne, Louis, Nico, Anne-Sophie, Jérôme, Claire-Lise, Kévin, Robin, Alice, Floriane, Théo, Pauline, Pierre, Diego, Jeff, Nuria, Vinicius, Mathew, Matthieu, Jarad, Fanny, Arnaud, Yuval, Eloise, Orlane, Laura, Alicia, Eric, Maya, Allan, Kéoni, Aisha, Jonathan, Sarah, Azenor**. Pour ces soirées à la boussole ou ailleurs dans les diverses colocs, ces concerts au

relais montagnard et autres festivals, pour le flamage au marché, ces apéros à l'Union ou ailleurs, ces soirées muffilms, ces séances d'escalade au tube ou en falaises, ces séances d'ultimate (qui m'ont couté cher d'ailleurs), ces barbecues, ces baignades, ces randonnées, ces soirées jeux, ces sorties naturalistes, pour tout ça et plus encore, pour tous ces moments partagés, un énorme merci du fond du cœur.

Un grand merci aussi à tous les amis qui ne sont jamais passés par Moulis (ou juste le temps de vacances). Avec vous j'ai pu m'évader le temps d'un instant, me changer les idées, recharger les batteries afin de poursuivre cette thèse. Pour tout ce que vous m'apportez un grand merci à : **Ayala, Cécile, Pierrick, Tony, Manon, Stéphane, Elise, Charlène, Gildas, Marieke, Romain, Oriane, Alexis, Etienne, Mélanie, Alexandre, Jessica, Thomas, Alicia, Pierre, Arthur, Corentin, Aymeric, Lucille, Antoine, Félicie, Charline, Christophe, Karl, Vanille, Julien, Pierre, Johana, Stéphane, Sébastien, Martial, Annabelle** et dans le flou de mon cerveau je suis sûr et désolé d'en oublier. Je vous en conjure ne m'en voulez pas. Je sais que je n'ai pas toujours été super disponible pour vous ces dernières années mais promis, je vais me rattraper.

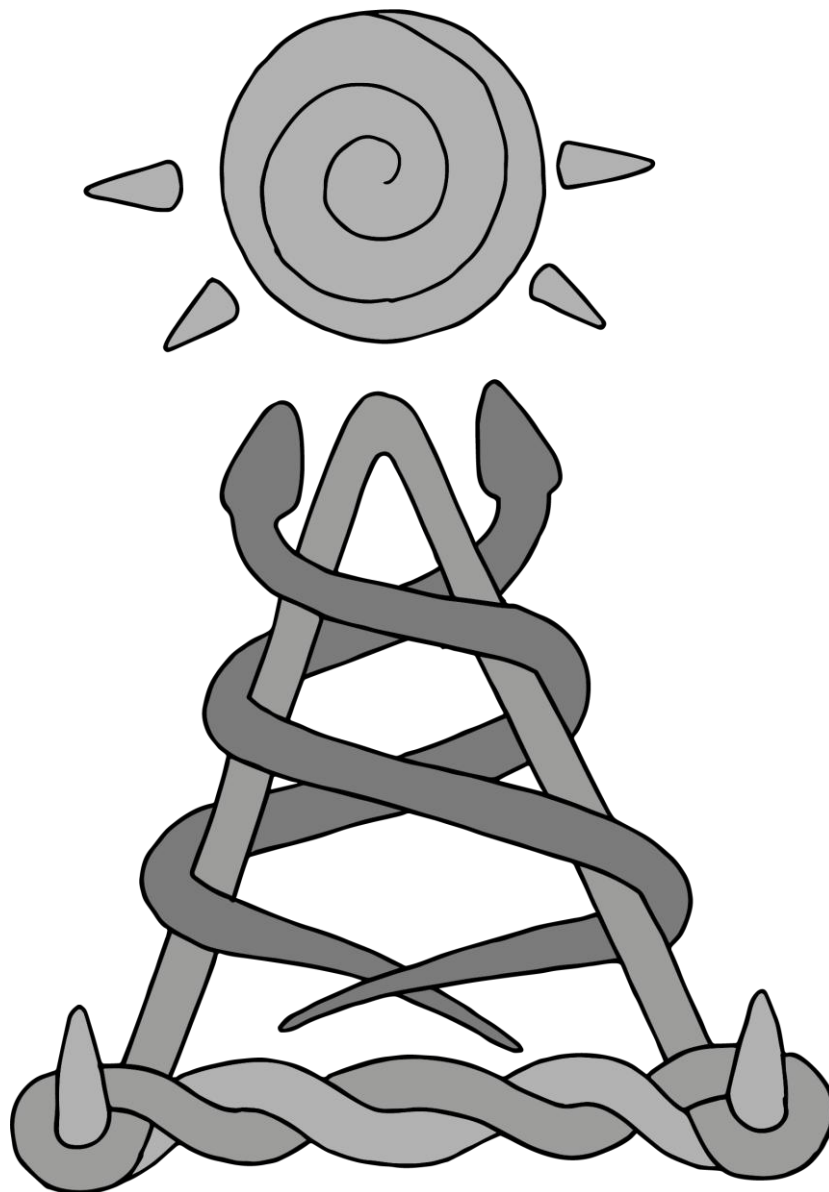
Pour terminer, j'aimerais remercier **ma famille, mes parents et mon petit frère**, pour votre soutien permanent et ce depuis de nombreuses années. Bien avant la thèse vous avez complètement accepté mon projet assez fou d'aller à la fac sans aucun objectif, puis celui de suivre toutes les formations pour devenir enseignant avant de tout lâcher du jour au lendemain pour faire de la recherche et me spécialiser en écologie des reptiles. Un pari qui finalement porte ses fruits.



Représentation cartoonesque de la montée en altitude de la Couleuvre vipérine. Dessin réalisé en quelques minutes sur un goblet, le samedi matin du 46^{ème} congrès de la Société herpétologique de France en 2018 (Marion Jouffroy).

Chapitre 1.

INTRODUCTION GÉNÉRALE



1.1. Modifications environnementales et biodiversité

1.1.1. Extinctions de masse et perte de biodiversité

Au cours des 3,5 milliards d'années écoulées, 99% des 4 milliards d'espèces estimées ont disparu (Barnosky et al., 2011). La disparition des espèces est un processus continu dans le temps. Bien que certains événements de grande ampleur, appelés extinctions de masses, peuvent venir rythmer ce processus. Au cours de l'évolution des espèces, cinq extinctions de masse ont été identifiées (Raup and Sepkoski, 1982). Elles sont datées de la fin de l'Ordovicien (environ -445 millions d'années), de la fin du Dévonien (environ -360 millions d'années), de la fin du Permien (environ -245 millions d'années), de la fin du Trias (environ -200 millions d'années) et enfin de la fin du Crétacé (environ -66 millions d'années ; Figure 1). Chacune de ces crises a entraîné la disparition de 35% à 57% des familles d'animaux et de plantes, englobant 75% à 96% des espèces présentes au moment de la crise (Jablonski, 1994; Barnosky et al., 2011). Par conséquent, ces extinctions massives sont considérées comme des hécatombes mondiales entraînant une chute brutale de la biodiversité et menant parfois à la disparition de familles entières (Bambach, 2006).

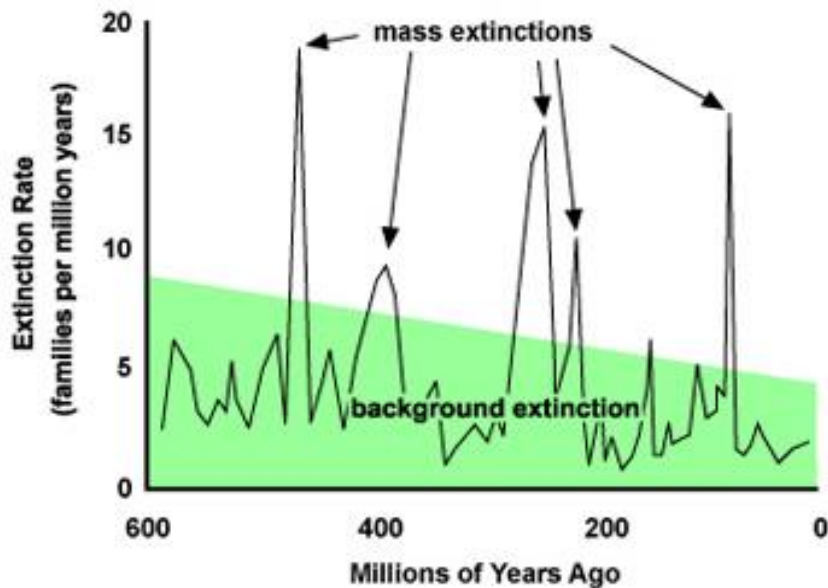


Figure 1 : Évolution du taux d'extinction des familles d'espèces par million d'années. Les cinq pics représentent les cinq grandes extinctions de masses (à la fin de l'Ordovicien, du Dévonien, du Permien, du Trias et du Crétacé). La courbe du taux d'extinction de fond standard (dans l'aplat vert noté "background extinction") représente l'ensemble des niveaux d'extinction d'espèces considérés normaux à l'échelle temporelle présentée. (The University of California Museum of Paleontology's Understanding Evolution).

En parallèle des extinctions massives, il existe aussi le phénomène continu d’extinction des espèces (noté “background extinction” dans la Figure 1). Le taux d’extinction des espèces, lié à ce phénomène continu d’extinction, varie en fonction de causes internes et externes qui compromettent la capacité de survie et de reproduction de ces espèces (Pievani, 2014). La perte de diversité génétique, les interactions interspécifiques ou les modifications environnementales font partie de ces facteurs pouvant conduire à l’extinction d’une espèce. Plus généralement, la détérioration des habitats et les modifications brutales des conditions environnementales sont des facteurs pouvant causer une perte de biodiversité importante. Dans le cas des extinctions de masse, celles-ci sont brutales et résultent d’événements rarissimes de forte intensité comme l’explosion d’une étoile, de fortes éruptions volcaniques ou encore des collisions répétées avec des astéroïdes. Ces événements ont eu pour conséquences une modification abrupte du climat de la planète, des fluctuations du niveau de la mer et des changements des proportions des gaz de l’atmosphère. Actuellement, de nombreux travaux scientifiques suggèrent que le taux d’extinction actuel des espèces est très supérieur au taux de base du phénomène continu d’extinction. Ces éléments démontrent que la perte de biodiversité est exceptionnellement rapide au cours des derniers siècles, indiquant que nous entrons dans une 6^{ème} extinction de masse (Figure 2; Raup, 1991; Pimm et al., 1995; Alroy, 1996; MacPhee and Sues, 1999; Cardillo et al., 2008; May, 2010; Stork, 2010; Dirzo et al., 2014; Ceballos et al., 2015).

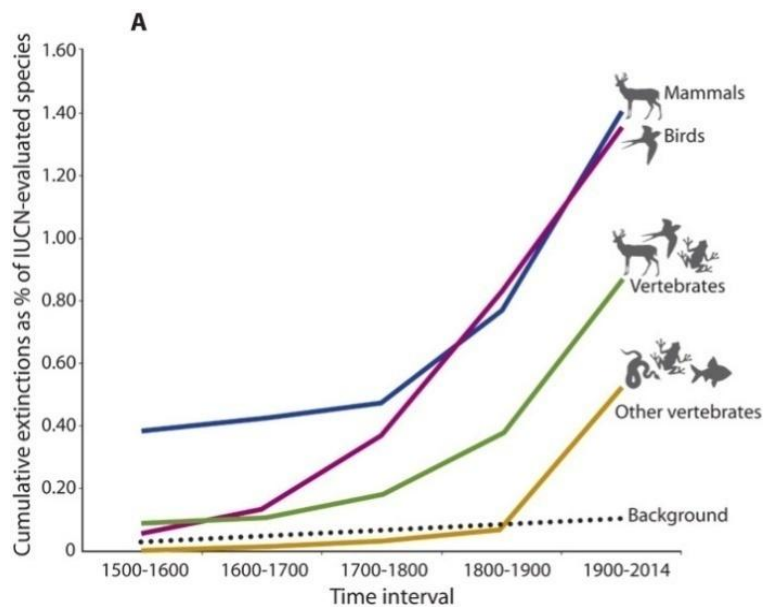


Figure 2 : Le graphique montre le pourcentage cumulatif du nombre d’espèces éteintes par rapport aux nombres d’espèces évaluées par l’UICN chez les mammifères (5513; 100% de celles décrites), les oiseaux (10 425; 100%), les reptiles (4414; 44%), les amphibiens (6414; 88%), les poissons. (12 457; 38%), et tous les vertébrés réunis (39 22; 59%). La courbe noire en pointillé représente le processus d’extinction continu (i.e. nombre d’extinctions attendues avec une vitesse constante de 2 extinctions d’espèces par million d’espèces par an. (Ceballos et al., 2015).

Dans la plupart des groupes de Vertébrés qui font l'objet d'études approfondies depuis plusieurs années, des déclinés importants du nombre d'espèces et de l'abondance d'individus dans leurs populations ont été décrits (Murphy and Romanuk, 2014). Ces effondrements ont pour conséquences des effets en cascade au sein des communautés entraînant des perturbations dans le fonctionnement des écosystèmes et provoquant une accélération de leur détérioration (Lecq, 2013). La perte globale de la biodiversité actuelle a des origines multifactorielles principalement liées aux activités anthropiques. L'augmentation du déclin des espèces et des populations a débuté aux prémices de l'agriculture et s'est fortement accélérée depuis le début de l'industrialisation (Kareiva et al., 2007). Les modifications récentes et importantes dans les pratiques agricoles associées à la mondialisation et à l'augmentation des échanges entre pays ont fortement impacté la qualité des environnements. Parmi les causes majeures entraînant une perte de biodiversité à l'échelle globale, peuvent être citer : la perte d'habitat et la fragmentation des milieux (Griffith et al., 1989; Lefeuve, 1992; Boissinot et al., 2014; Haddad et al., 2015), les pollutions sonores (Marzluff, 2001; Habib et al., 2007; Lengagne, 2008; Barber et al., 2010; Slabbekoorn, 2013; Meillère et al., 2015), les pollutions lumineuses (Witherington and Martin, 2000; Hölker et al., 2010; Rich and Longcore, 2013; Bashiri, 2014; Bliss-Ketchum et al., 2016; Brei et al., 2016), les pollutions chimiques (Newman, 1979; Winner and Atkinson, 1986; Treshow and Anderson, 1989; Cooper, 1993; Nahmani et al., 2005; Taylor et al., 2005; Smith et al., 2007), les introductions d'espèces invasives (Didham et al., 2005; Grice, 2006; Molnar et al., 2008; Clavero et al., 2009; Doherty et al., 2016), la surexploitation (*e.g.* surpêche, chasse et braconnage; Bodmer et al., 1997; Keane et al., 2005; Dutton and Squires, 2008; Halpern et al., 2008; Casas et al., 2009; Costello et al., 2012a; Ripple et al., 2016; Romero-Muñoz et al., 2020) et le changement climatique (Parmesan et al., 1999; Wilson et al., 2005; Parmesan, 2006; Pounds et al., 2006; Thomas et al., 2006; Jeppesen et al., 2010; Ohlberger, 2013; Pacifici et al., 2015; Urban, 2018).

Face aux modifications environnementales, les organismes peuvent mettre en place deux stratégies : la migration ou la modification phénotypique. Dans le premier cas de figure, les individus se déplacent pour rester dans des conditions favorables, entraînant un changement dans la répartition spatiale des populations (Parmesan and Yohe, 2003; Sinervo et al., 2010; Lenoir et al., 2020). Dans le second cas, les populations vont voir leur composition phénotypique modifiée afin de pouvoir s'acclimater aux nouvelles conditions. Ces modifications phénotypiques peuvent s'opérer aux niveaux physiologique, morphologique, comportemental ainsi qu'au niveau des traits d'histoire de vie. La modification phénotypique des populations peut s'obtenir par la plasticité phénotypique qui est une réponse possible à court terme mais aussi par la sélection naturelle, une réponse à long terme (Stearns, 1989). La plasticité phénotypique correspond à la capacité d'un

génotype à produire un phénotype différents dans ce nouvel environnement (Pigliucci, 2001). La sélection naturelle quand à elle favorise le maintien des génotypes qui produisent les phénotypes les plus adaptés aux nouvelles conditions environnementales (Hoffmann and Sgrò, 2011).

1.1.2. La plasticité phénotypique comme réponse aux modifications environnementales

La plasticité phénotypique est définie comme étant la capacité d'un génotype à produire différents phénotypes quand il est exprimé dans des environnements distincts (Pigliucci, 2001). Les modifications du phénotype d'un individu sont considérées comme des réactions de l'organisme face aux différents facteurs environnementaux (Pigliucci, 2001; Clobert et al., 2010). La norme de réaction décrit quant à elle la gamme des phénotypes produits par un même génotype dans des conditions environnementales différentes. Cette notion a été abordée la première fois par Woltereck en 1909. Il a démontré que des espèces de daphnies, des petits crustacés d'eau douce mesurant quelques millimètres, adoptaient des morphologies différentes selon la présence ou non de prédateurs dans leur milieu (Woltereck, 1909). Bien que les normes de réaction s'expriment en fonction de la relation qui existe entre un trait donné du phénotype et les différentes conditions environnementales, elle est souvent et arbitrairement, dans un souci de représentation, réduite à deux dimensions (*e.g.* un trait phénotypique comme la taille d'un individu à la naissance selon un facteur environnemental comme la température d'incubation de l'œuf, Figure 3; Pigliucci, 1998, 2001; Clobert et al., 2010). Il sera alors considéré qu'un individu présente de la plasticité phénotypique si son phénotype change en réponse aux modifications des conditions environnementales. Dans un cadre simple, où un seul trait phénotypique et un seul facteur environnemental sont considérés, la norme de réaction devra dans ce cas avoir une pente différente de zéro (Figure 3A et 3B). De plus, les conditions environnementales peuvent fortement affecter l'intensité d'expression des gènes (Zhou et al., 2012). Alors, dans un même environnement, un même gène peut ainsi être exprimé de manière différente entre deux individus d'une même espèce modifiant alors la réponse phénotypique et entraînant des normes de réaction différentes (Figure 3C; Pigliucci, 2001; Clobert et al., 2010).

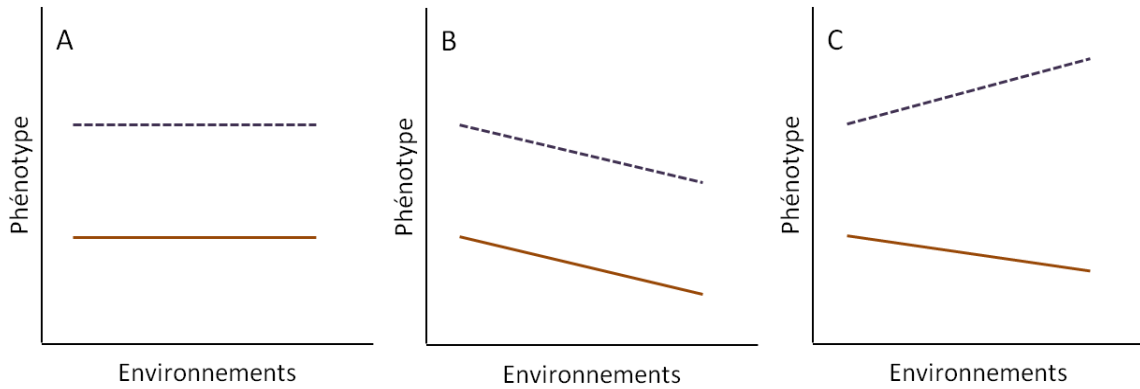


Figure 3 : Normes de réaction d'un trait phénotypique (e.g. la taille à la naissance d'un individu) selon un trait environnemental (e.g. la température d'incubation de l'œuf) exprimés par deux génotypes différents (ligne continue et pointillée). (A) Les deux normes de réaction sont identiques et planes. Aucune plasticité n'est exprimée par l'un ou l'autre des génotypes. (B) Les deux normes de réaction ont une pente de même direction et de même amplitude. Les deux génotypes expriment une plasticité identique. (C) Les normes de réaction sont différentes entre les deux génotypes. Ils expriment une plasticité différente induite par une variabilité génotypique (d'après Pigliucci, 2001; Clobert et al., 2010).

La plasticité phénotypique d'un individu peut être caractérisée par différents critères. Premièrement, la plasticité peut être réversible ou irréversible (Clobert et al., 2010; Beaman et al., 2016). Souvent, quand elle est exprimée durant le développement embryonnaire, la plasticité phénotypique sera irréversible (Pigliucci et al., 2006). C'est le cas par exemple de la détermination du sexe chez certains reptiles, qui est dépendante de la température d'incubation (Janzen and Paukstis, 1991; Sarre et al., 2004). A l'inverse, certaines formes de plasticité sont réversibles et correspondent à des modifications du phénotype qui peuvent s'opérer tout au long de la vie d'un individu (Clobert et al., 2010). C'est notamment le cas de la plasticité comportementale. En cas de stress de prédation par exemple, un organisme peut mettre en place des défenses coûteuses, en énergie notamment, pendant un temps limité et ainsi répondre rapidement à la menace perçue (Gabriel, 2005). Deuxièmement, la plasticité phénotypique peut être adaptative ou non adaptative (Ghalambor et al., 2007; Clobert et al., 2010; Forsman, 2015). Dans le cas où le phénotype produit dans un nouvel environnement favorise la fitness de l'individu, la plasticité phénotypique sera alors considérée comme adaptative (Clobert et al., 2010). A l'inverse, la plasticité non adaptative inclut toutes les réponses phénotypiques à une condition environnementale donnée qui ne permettent pas d'améliorer la fitness (Clobert et al., 2010). Il est important de noter que le phénotype produit en réponse à une variation environnementale peut entraîner, chez les individus, des coûts de maintenance physiologique ayant des impacts à long terme. En effet, la plasticité phénotypique qui a lieu durant le développement de l'individu peut déclencher des réponses plastiques qui ne seront avantageuses que durant le développement ou les premiers stades de vie (Gluckman et al., 2005)

mais qui pourront avoir des effets délétères plus tard dans la vie (Gluckman et al., 2008; Lee et al., 2016; Walczyńska et al., 2016; Le Roy et al., 2017; Mitchell et al., 2018b).

Enfin, il est important de noter que le rôle de la plasticité phénotypique comme accélérateur ou frein à l'évolution des populations (et à plus long terme des espèces) est encore débattu (Piersma and Drent, 2003; Pigliucci et al., 2006; Whitman and Agrawal, 2009; Forsman, 2015). La plasticité phénotypique peut être vue comme "empêchant" l'adaptation évolutive en réduisant l'efficacité des pressions sélectives qui permettent le maintien des génotypes produisant les phénotypes les plus adaptés (Gibert, 2020). Cependant, la plasticité phénotypique peut permettre, dans un premier temps (*i.e.* à court terme), aux organismes de s'acclimater aux modifications abruptes des conditions environnementales et donc de survivre (Munday et al., 2017). Dans un second temps (*i.e.* à long terme), la sélection naturelle, peut sélectionner les génotypes produisant les phénotypes les plus adaptés (Aubret and Shine, 2009). Enfin, le maintien de la plasticité est principalement déterminé par les coûts qu'elle engendre et par la variabilité spatio-temporelle des conditions environnementales.

1.1.3. Les impacts du changement climatique sur la biodiversité

L'une des causes majeures de l'accélération du processus d'extinction des espèces est le changement climatique, induit par les activités anthropiques. Actuellement, une augmentation globale des températures de surface de la Terre de 2°C à 2,5°C d'ici 2100 est considérée comme très probable (Pachauri et al., 2014; IPCC, 2018). Cependant, les rapports récents du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC, *IPCC* en anglais) estiment que les températures à la surface de la Terre devraient en moyenne augmenter de 1°C à 6,5°C d'ici 2100, par rapport à la période 1986-2005, en fonction des différents scénarii (Figure 4A et 4B ; Pachauri et al., 2014; IPCC, 2018). Cependant, si on ne tient compte que de la moyenne des températures à la surface des terres émergées, l'augmentation moyenne de la température est actuellement 1,5 fois plus importante que la moyenne à l'échelle du globe (Figure 4C). Le GIEC estime alors que l'augmentation des températures pour les terres émergées devrait être de l'ordre de 1,5°C à 10°C en fonction des différents scénarii (Arneth et al., 2019). À l'échelle mondiale, une hausse significative du nombre de jours anormalement chauds a été enregistrée depuis 1950. Ces augmentations de température vont être associées à des vagues de chaleur plus intenses et plus fréquentes entraînant un accroissement des risques de sécheresses et de leurs intensités (Trenberth et al., 2014; Diffenbaugh et al., 2017; Cattiaux et al., 2018), modifiant le cycle de l'eau et augmentant le niveau d'eau des océans. Dans des régions non limitées en eau, l'augmentation de la température peut favoriser l'évaporation, entraînant par la suite une augmentation des

précipitations et donc des inondations (Palmer and Räisänen, 2002; Cattiaux et al., 2018). Enfin, avec l'augmentation des températures, les événements extrêmes, les cyclones ou encore les incendies, devraient voir leur intensité augmenter (Cattiaux et al., 2018).

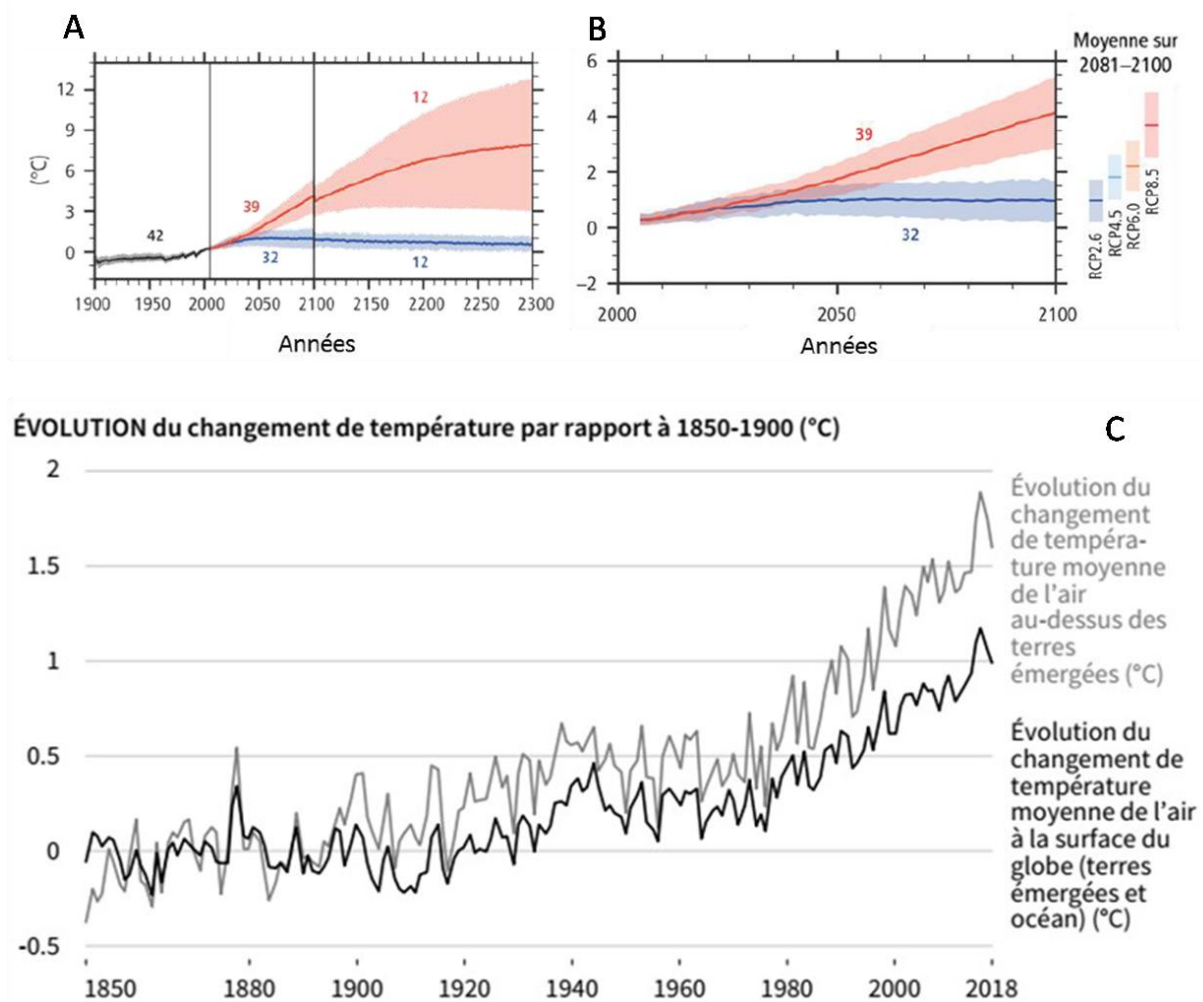


Figure 4 : Évolution de la température moyenne de la surface de la Terre observée et prévue. (A) Séries chronologiques des changements annuels globaux de la température moyenne de surface pour la période 1900-2300 pour les scénarii RCP2.6 (en bleu) et RCP8.5 (en rouge). (B) Zoom sur la température moyenne de surface entre 2006 et 2100, déterminée par des simulations multi-modèles. (C) Données observées des températures moyennes à la surface du globe et des températures moyennes au dessus des terres émergées. (A et B : Pachauri et al., 2014 ; C : Arneth et al., 2019).

Les modifications environnementales résultant des changements climatiques peuvent avoir des effets en cascade sur les écosystèmes et les communautés (Jeppesen et al., 2010; Ohlberger, 2013). La hausse des températures, par des effets directs ou indirects, peut mener à l'extinction de populations et au déclin de la biodiversité (Parmesan et al., 1999; Wilson et al., 2005; Pounds et al., 2006; Pacifici et al., 2018; Urban, 2018). De manière directe, le réchauffement climatique peut augmenter les températures environnementales jusqu'à ce qu'elles excèdent le seuil de tolérance

thermique de nombreux organismes (Sinervo et al., 2010). Cette augmentation des températures seraient ainsi susceptible de causer la mort des individus par surchauffe ou de modifier leurs périodes d'activité. Par exemple, dans les milieux désertiques chauds, des vagues de chaleur ont entraîné une forte mortalité aviaire (McKechnie and Wolf, 2010). En restant cachés dans des abris plus froids, les individus limiteraient leur risque de surchauffe mais cela diminuerait le temps et l'énergie alloués à des activités essentielles comme l'alimentation, menaçant leurs fonctions physiologiques de base. Ces effets de la température peuvent être particulièrement importants chez les ectothermes dont le métabolisme est accéléré sous des températures élevées (*cf. section 1.2.2*). En effet, un métabolisme accéléré augmente les besoins en nourriture et donc la vulnérabilité à la famine (Dillon et al., 2010). Lorsque chez des individus d'une espèce les fonctions physiologiques de base sont compromises, cela peut impacter l'ensemble de la population (Sinervo et al., 2010). En milieu océanique, par exemple, une vague de chaleur a entraîné une mortalité importante de l'algue *Scytothalia dorycarpa* à sa limite géographique de répartition chaude. La disparition de ces populations marginales d'algues a réduit l'aire de répartition de l'espèce d'environ 100 km², soit une perte de 5% de sa répartition mondiale (Smale and Wernberg, 2013). De manière plus indirecte, le changement climatique peut entraîner le déclin des populations par des modifications dans la phénologie de reproduction ou de migration des organismes (McCarty, 2001; Crick, 2004). Chez les oiseaux par exemple, un décalage entre la période de reproduction et l'abondance des proies nécessaires au nourrissage des poussins, dû au réchauffement climatique, a été observé (Buse et al., 1999). Cela peut entraîner une mortalité importante et un échec de la reproduction dans certaines populations. De nombreuses autres espèces quant à elles modifient par déplacement leur aire de répartition, entraînant une modification des communautés d'espèces à l'échelle mondiale (Crick, 2004; Perry et al., 2005; Chen et al., 2011). L'augmentation des températures peut également altérer le développement des individus avec par exemple, chez des ectothermes, une croissance et une maturité plus rapide des individus juvéniles mais avec une taille corporelle adulte qui sera réduite (Invertébrés: Frazier et al., 2006; Brans and Meester, 2018; Poissons: Loisel et al., 2019). De plus, le taux de mortalité lié à une hausse des températures ne permet pas toujours le maintien des populations à long terme, même quand la reproduction reste possible. (Frazier et al., 2006; Santos, 2007; Bestion et al., 2015b).

Pour faire face au changement climatique, les espèces – comme évoqué plus haut – peuvent répondre de deux manières différentes. En raison des multiples impacts que le réchauffement climatique va induire dans leurs environnements, certaines espèces se déplaceront, notamment vers les pôles (Parmesan and Yohe, 2003; Lenoir et al., 2020), mais elles vont aussi, dans le but de

retrouver des conditions thermiques plus favorables, remonter en altitude (Bässler et al., 2013; Pauchard et al., 2016; Freeman et al., 2018; Sinervo et al., 2018). D'autres espèces pourraient quant à elles, rester et persister dans leur environnement, en modifiant leur composition phénotypique permettant aux populations de ce maintenir malgré les variations climatiques qu'elles subissent.

1.1.4. La plasticité phénotypique dans le cadre du changement climatique

La nécessité de comprendre les réponses des espèces face au changement climatique devient une priorité de plus en plus urgente (Du et al., 2013). En effet, les impacts du réchauffement climatique sur la biodiversité sont importants (*cf. section 1.1.3*) et la survie des espèces, animales ou végétales, terrestres ou aquatiques, dépend, notamment à travers la plasticité phénotypique, de réagir rapidement à ces augmentations de température. Actuellement plusieurs études ont montré que certaines populations réagissaient à cette contrainte thermique en modifiant leur physiologie (*e.g.* Canto et al., 2009; Bradshaw and Holzapfel, 2010; Chown et al., 2010; Seebacher et al., 2015; Mitchell et al., 2018a; Bennett et al., 2019; Figure 5). Par exemple, chez les coccinelles à deux points, *Adalia bipunctata*, l'augmentation des températures printanières a fait diminuer le pourcentage d'individus mélaniques dans les populations (de Jong and Brakefield, 1998). Cette coloration sombre est un avantage chez les ectothermes (Clusella Trullas et al., 2007), leur permettant de mieux capter les radiations solaires et ainsi de faire augmenter plus rapidement leur température corporelle dans un contexte de température froide. Cela permet aux individus de pouvoir allouer efficacement leur énergie à d'autres besoins physiologiques comme la reproduction. Dans le cas des coccinelles à deux points, l'augmentation des températures réduit donc l'intérêt de cette coloration mélanique. D'autres espèces vont quant à elles modifier leur phénologie (*e.g.* Roy and Sparks, 2000; Chmielewski and Rötzer, 2001; Cotton, 2003; Badeck et al., 2004; Crick, 2004; Edwards and Richardson, 2004; Charmantier et al., 2008; Richardson et al., 2013; Figure 5). Les études menées sur la reproduction des oiseaux en sont de bons exemples. Chez les oiseaux insectivores, l'abondance des proies au moment de l'éclosion est nécessaire à la survie de la couvée. Avec une augmentation des températures, le pic d'abondance des insectes a lieu plus tôt dans la saison. Les oiseaux qui dépendent de cette ressource alimentaire voient aussi leur reproduction se réaliser plus tôt (Crick et al., 1997; Visser et al., 1998, 2004). Néanmoins, les modifications dans la phénologie des espèces ne s'opéreront pas aux mêmes vitesses, augmentant le risque de décalage temporel dans les interactions trophiques et menaçant la survie des espèces (Thackeray et al., 2010). Enfin, les espèces peuvent aussi répondre au changement climatique et à l'augmentation des températures en modifiant leurs traits d'histoire de vie notamment à travers la dynamique des populations (*e.g.* Deutsch et al., 2008; Le Galliard et al., 2010; Ozgul et al., 2010; Jenouvrier et al., 2018; Figure 5).

Avec l'augmentation des températures, le nombre d'individus dans la population ainsi que dans les différentes classes d'âge peut être modifié (e.g. Whitfield et al., 2007; Daufresne et al., 2009; Vindenes et al., 2014; Cunningham et al., 2017; McClelland et al., 2018). Ces modifications de la dynamique de population peuvent être dues, chez les espèces ectothermes par exemple, à des taux de croissances plus rapides qui donneront des individus plus gros à l'âge adulte mais qui auront néanmoins une survie réduite (Vindenes et al., 2014; Bestion et al., 2015a; Loisel et al., 2019).

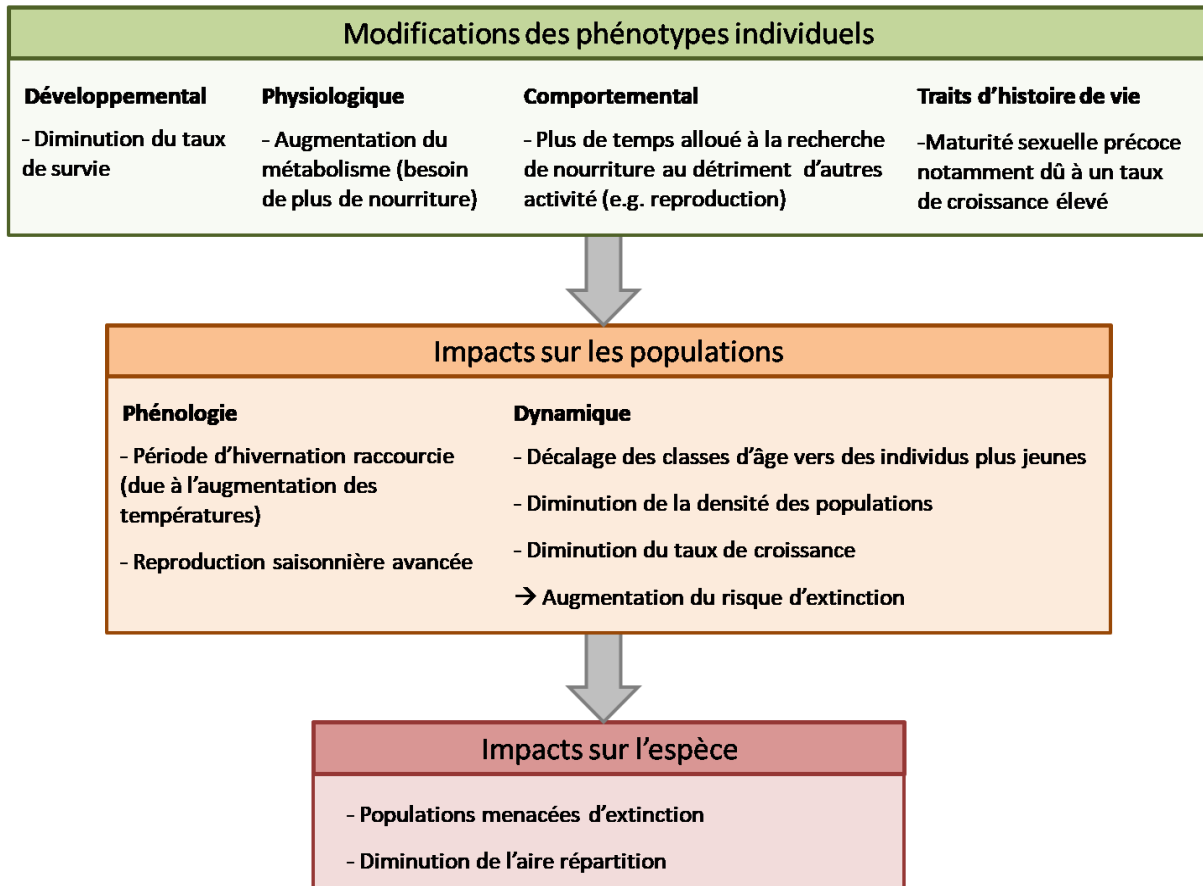


Figure 5 : Exemples de modifications phénotypiques des individus en réponse au changement climatique entraînant des changements à l'échelle populationnelle et à l'échelle des espèces (Parmesan, 2006; Charmantier et al., 2008; Bestion et al., 2015a; Sinervo et al., 2018).

En conclusion, la plasticité phénotypique pourrait être particulièrement importante pour permettre aux organismes de faire face à l'évolution rapide des conditions environnementales (Ghalambor et al., 2007; Gienapp et al., 2008; Nicotra et al., 2010). Dans un premier temps la plasticité phénotypique pourrait conférer une plus grande tolérance aux changements des conditions thermiques (Ghalambor et al., 2007; Donelson et al., 2018). Dans un second temps, la sélection naturelle pourrait favoriser le maintien des génotypes qui produiront les phénotypes les plus adaptés aux nouvelles conditions climatiques (Hoffmann and Sgrò, 2011). Bien qu'il soit largement accepté

qu'une forte diversité génétique au sein d'une population augmente les chances de s'adapter à un nouvel environnement (Jump et al., 2009), certains auteurs suggèrent néanmoins que le potentiel d'adaptation génétique, à travers la sélection naturelle, pourrait être limité par le changement climatique à venir (Gienapp et al., 2008; Merilä, 2012). Dans le contexte du changement climatique, les espèces ectothermes, capables de réagir efficacement aux modifications spatiales et temporelles de l'environnement (Angilletta et al., 2002), pourraient être, dû à la forte sensibilité thermique qu'inclut la stratégie ectothermique, plus vulnérables à l'augmentation des températures (Brans and Meester, 2018).

1.2. Les dépendances thermiques chez les ectothermes

1.2.1. *Quelques généralités sur l'ectothermie*

Sur l'ensemble des espèces animales connues, les ectothermes - c'est-à-dire toutes les espèces animales à l'exception des oiseaux et des mammifères - représentent environ 99% de la diversité (Wilson, 1992; Atkinson and Sibly, 1997). Les ectothermes ont un métabolisme qui, contrairement à celui des endothermes, ne produit qu'une quantité négligeable de chaleur, ce qui ne leur permet pas de s'affranchir de la température de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Certaines espèces ectothermes font office d'exception et sont capables de produire de manière significative de la chaleur métabolique. C'est le cas, par exemple, de certains insectes volants (Roberts and Harrison, 1999), de quelques pythons (Bartholomew, 1982) ou encore de certains grands « poissons » comme le Thon rouge (Kitagawa et al., 2001). L'ectothermie permet de diminuer les coûts de maintenance de l'organisme en réduisant drastiquement la régulation physiologique, une part importante de la dépense énergétique des individus (Pough, 1980; Nagy, 2005). En effet, pour une même masse corporelle, le taux métabolique de base d'une espèce ectotherme sera 10 à 20 fois inférieur à celui d'une espèce endotherme (Figure 6; Nagy, 2005). Cette stratégie leur permet d'allouer une grande partie de leur budget énergétique à d'autres fonctions comme la croissance et la reproduction.

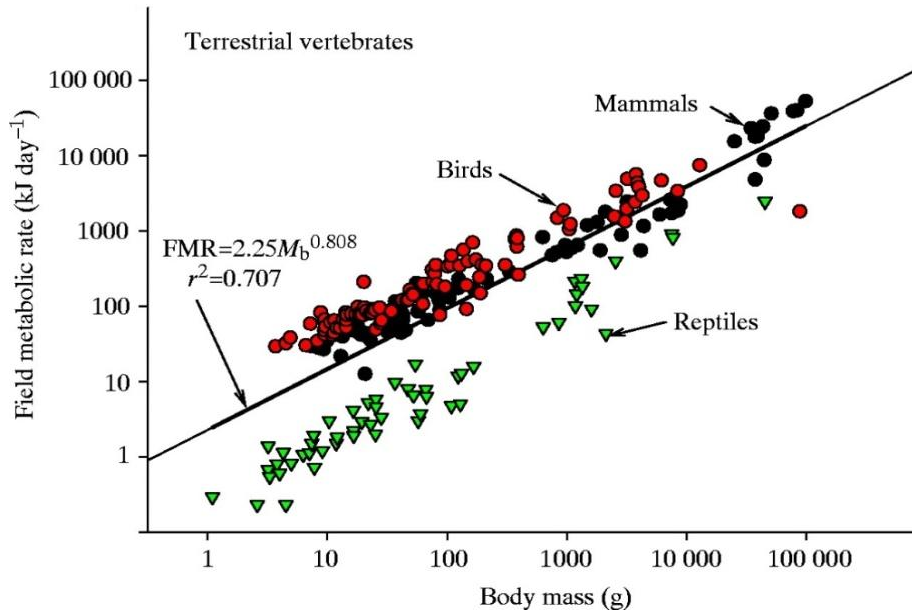


Figure 6 : Dépense énergétique journalière chez 229 espèces de Vertébrés terrestres en fonction de leur masse corporelle. Les cercles représentent les espèces endothermes, en rouge les Oiseaux et en noir les Mammifères. Les triangles représentent les espèces ectothermes, en vert les reptiles (Nagy, 2005).

Les organismes ectothermes peuvent être classés en deux groupes, les homéothermes et les poïkilothermes. Les ectothermes homéothermes, qui vivent principalement dans des milieux où la température est constante dans le temps, auront une température corporelle constante proche de celle de leurs milieux. A l'inverse, les ectothermes poïkilothermes, vivant dans des milieux dont la température varie, subissent des variations importantes de leur température corporelle. Cependant, la plupart des ectothermes poïkilothermes peuvent, par des ajustements comportementaux dit de thermorégulation, maintenir des températures corporelles stables malgré des variations thermiques de leur environnement (Heinrich, 1974; Beitinger and Fitzpatrick, 1979; Brattstrom, 1979; Huey, 1982; Danks, 2004; Lagerspetz and Vainio, 2006). Par exemple, les organismes vont, en fonction de la température du milieu et de leurs besoins physiologiques, ajuster le temps passé à se chauffer ou le temps passé sous abri pour atteindre leur température corporelle cible (Hertz et al., 1993; Christian et al., 2006; Kearney et al., 2009). Cette introduction n'abordera que les dépendances thermiques chez les reptiles non-aviens.

1.2.2. Les dépendances thermiques chez les reptiles non-aviens

La température corporelle chez les espèces ectothermes est un facteur clé de leur écologie qui va influencer à la fois leur physiologie et leur comportement (Figure 7; Huey and Stevenson, 1979; Angilletta et al., 2002). La vitesse des réactions chimiques, c'est-à-dire la catalyse enzymatique, et par conséquent l'ensemble du métabolisme des individus, augmente avec la température (Licht,

1966; Somero, 2004). La température optimale pour un individu correspond alors à l'optimum thermique de fonctionnement de l'organisme pour une activité donnée (Angilletta et al., 2002). Ainsi, les espèces ectothermes présentent des plages de températures corporelles pour lesquelles leur physiologie et donc leur performance sont optimales. Ces plages de températures sont bornées par une température corporelle critique minimum et une température corporelle critique maximum (Figure 7), au-delà de ces températures, l'organisme ne peut plus fonctionner (Angilletta et al., 2002).

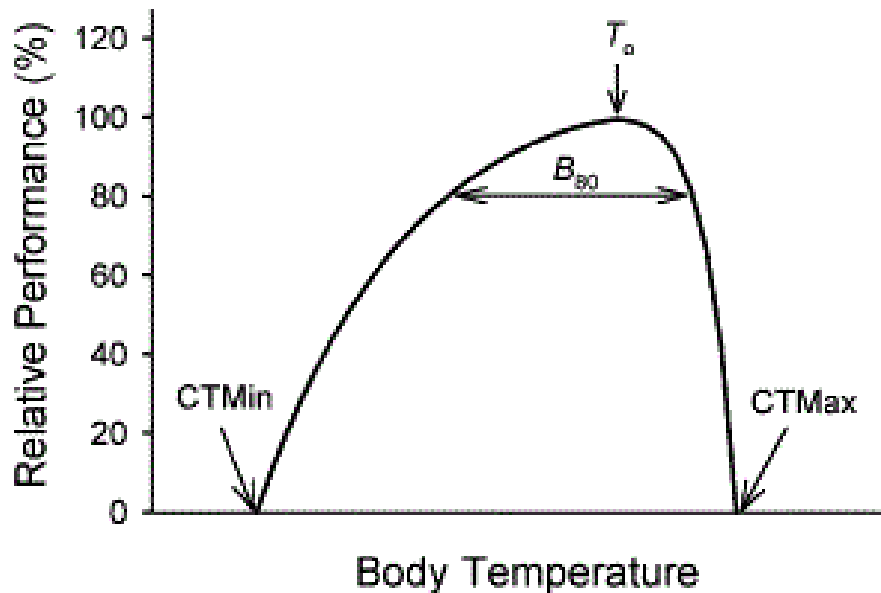


Figure 7 : Relation schématique entre la température corporelle d'un individu ectotherme et ses performances. La température optimale (T_o) est la température pour laquelle la performance est maximale. La gamme de performance à 80% (B_{80}) est l'intervalle de températures pour lesquelles la performance est supérieure à 80% du maximum. Le seuil critique minimum (CT_{Min}) et le seuil critique maximum (CT_{Max}) correspondent aux températures corporelles minimale et maximale entre lesquelles la performance est possible (Angilletta et al. 2002).

La variation de réponse face à des modifications de températures a été mesurée chez de nombreuses espèces et sur un grand nombre de traits individuels tels que les réactions enzymatiques (Seebacher et al., 2003; Somero, 2004), le taux métabolique (Beyer and Spotila, 1994; Dorcas et al., 2004; Gangloff et al., 2016), la locomotion (Bennett, 1980; Braña and Ji, 2000; Lailvaux, 2007), la digestion (Hopkins et al., 2004; Bestion et al., 2017), la reproduction (Schwarzkopf and Shine, 1991), ou encore la croissance (Dutton et al., 1975). Chez les ectothermes, la taille des individus, sous une contrainte thermique, est décrite par la règle taille-température (TSR, *Temperature Size Rule* en anglais; Atkinson, 1994; Atkinson and Sibly, 1997; Angilletta and Dunham, 2003; Hessen et al., 2013; Horne et al., 2015; Walczyńska et al., 2016, 2017; Osmond et al., 2017). Cette règle, qui ne tient pas compte de l'association de la température à d'autres paramètres abiotiques, stipule que la taille corporelle des adultes est réduite avec l'augmentation de la température (Atkinson, 1994). En effet, les

individus d'une population soumise à des températures plus chaudes que les conditions optimales de l'espèce grandiront plus rapidement mais atteindront une taille adulte plus petite (Atkinson, 1994; Angilletta and Dunham, 2003). Ces individus, ayant atteint leur maturité plus rapidement, auront néanmoins un taux de survie plus faible, entraînant à une échelle populationnelle, une diminution du nombre d'individus au sein de la population (Huey and Kingsolver, 1989; Bestion et al., 2015a).

1.2.3. Les dépendances thermiques chez les embryons de Reptiles non-aviens

Chez les espèces ectothermes, les embryons présentent une sensibilité thermique marquée (Bull, 1980; Deeming and Ferguson, 1991; Shine and Harlow, 1993; Andrews et al., 2000; Brichard, 2004; Lourdaï et al., 2004). La température d'incubation chez les espèces ovipares ou de gestation chez les espèces vivipares va influencer la durée du développement embryonnaire. En effet, chez les reptiles, une baisse de la température d'incubation de 10°C multiplie par deux ou trois la durée du développement (Shine, 2004; Noble et al., 2018). La température va aussi influencer le succès de l'éclosion. Par exemple, chez les serpents ratiers, où les températures optimales de développement sont comprises entre de 24°C à 30°C, un écart de 2°C de cette gamme de température entraîne une diminution du succès d'éclosion de 30% (Du and Ji, 2008). Chez certaines espèces de crocodiles, chez la plupart des espèces de tortues et chez quelques espèces de lézards, la température est un facteur déterminant le sexe des nouveaux nés (Janzen and Paukstis, 1991; Sarre et al., 2004; Shine, 2004). Chez les Alligators et les Caïmans, une température d'incubation inférieure à 31°C produit uniquement des individus femelles tandis qu'une incubation à des températures supérieures à 33°C ne produit que des individus mâles (Ferguson and Joanen, 1982; lungman and Piña, 2013). Néanmoins, à partir d'un certain stade embryonnaire, le sexe de l'individu sera fixé malgré des variations possibles de la température (*i.e.* plasticité phénotypique irréversible; Janzen and Paukstis, 1991; Sarre et al., 2004). Les conditions de température durant le développement peuvent avoir d'autres effets sur le phénotype des juvéniles, comme sur la taille corporelle, les taux de croissance, les performances locomotrices ou les préférences thermiques (Deeming and Ferguson, 1991; Shine et al., 1997; Wapstra, 2000; Blouin-Demers et al., 2004; Booth, 2006; Watkins and Vraspir, 2006; Warner, 2014). Néanmoins, des températures élevées peuvent imposer des contraintes de croissance qui ne seront visibles que tardivement dans la vie de l'individu (Angilletta and Dunham, 2003), comme par exemple, selon la TSR (*cf. section 1.2.2*), une taille adulte réduite.

1.2.4. Les reptiles non-aviens face au changement climatique

L'exposition des espèces ectothermes à de fortes températures contraint le comportement et la performance des individus (Huey, 1982; Angilletta et al., 2010; Huey et al., 2012). Chez les embryons, cette contrainte est d'autant plus importante qu'ils ne peuvent pas ou peu se déplacer pour maintenir des températures optimales par des comportements de thermorégulation (Li et al., 2014; Telemeco et al., 2016; Cordero et al., 2018; Shine and Du, 2018). Bien que la physiologie embryonnaire puisse tolérer une large gamme thermique (Du and Ji, 2008; Du et al., 2010a; Andrews and Schwarzkopf, 2012), l'augmentation de la température, induite par le réchauffement climatique, aura potentiellement un impact négatif sur le développement embryonnaire (Andrews and Schwarzkopf, 2012; Mitchell et al., 2018b). Certaines études prédisent qu'avec ces augmentations de températures les individus seront de plus en plus petits (Daufresne et al., 2009; Gardner et al., 2011; Sheridan and Bickford, 2011) et que le sexe ratio des nouveaux nés sera modifié (Cunningham et al., 2017). Ces changements (*i.e.* taille des individus et sexe ratio) auront pour conséquences des changements dans la structure et la dynamique des populations d'espèces ectothermes (Daufresne et al., 2009; Le Galliard et al., 2010; Cunningham et al., 2017). Cela va également, par l'augmentation de la croissance juvéniles et une diminution du taux de survie à l'âge à l'adulte, affecter la démographie des populations, quand elles n'entraîneront pas leur extinction (Whitfield et al., 2007; Sinervo et al., 2010; Bestion et al., 2015a). Chez les individus adultes d'espèces ectothermes, les augmentations de température à long terme pourront avoir des répercussions majeures sur la composition du microbiote intestinal en diminuant jusqu'à 30% sa diversité spécifique modifiant probablement le régime alimentaire des individus (Bestion et al., 2017). L'augmentation de la température va également modifier les comportements de dispersion des individus (Deutsch et al., 2008; Le Galliard et al., 2010; Bestion et al., 2015b; Pellerin et al., 2019). Certains individus vont développer des phénotypes permettant de s'acclimater aux températures plus élevées, alors que d'autres vont devoir migrer pour trouver des températures plus favorables. Cela pourrait entraîner, au sein d'une espèce, une ségrégation spatiale des phénotypes thermiques, facilitant l'adaptation locale au réchauffement climatique pour les individus non migrants (Bestion et al., 2015b). Par conséquent, en réaction au réchauffement climatique, certaines espèces déplacent progressivement leur étendue géographique vers des environnements aux conditions climatiques pour lesquelles elles sont adaptées (Sorte et al., 2010; Wernberg et al., 2011). Ces modifications pourraient entraîner une augmentation de la compétition interspécifique. C'est le cas par exemple du Lézard des murailles, *Podarcis muralis*, qui en remontant en altitude pourrait entrer en compétition pour la ressource alimentaire ou les zones de reproduction avec le Lézard de Bonnal, *Iberolacerta bonnali*, déjà présent en altitude (Pottier, 2012).

1.3. Le concept de la remontée altitudinale

La redistribution des espèces vers les pôles est en train de devenir une réponse biologique importante à la hausse des températures globales dans les écosystèmes marins et terrestres (Parmesan and Yohe, 2003; Chen et al., 2011; Sunday et al., 2012). Dans les régions montagneuses, la distance physique nécessaire pour suivre la remontée des enveloppes climatiques est considérablement réduite par rapport à celle nécessaire au suivi de la remontée vers les pôles (Loarie et al., 2009; Chen et al., 2011). Cela peut réduire les effets du changement climatique dans ces régions montagneuses (Loarie et al., 2009) et favoriser une migration rapide des organismes le long du gradient d'altitude lorsque le climat se réchauffe (Lenoir et al., 2008; Bertrand et al., 2011; Freeman et al., 2018). Actuellement, de nombreuses espèces migrent le long du gradient altitudinal de zones montagneuses (Walther et al., 2002; Parmesan and Yohe, 2003; Hickling et al., 2006; Lenoir et al., 2008; Chen et al., 2011; Pottier, 2012; Bäessler et al., 2013; Pauchard et al., 2016; Freeman et al., 2018; Bani et al., 2019). En Europe, il a été constaté au sommet de plusieurs massifs montagneux que le réchauffement climatique a permis une augmentation de la richesse en espèces végétales, avec un enrichissement cinq fois plus important entre 2007 et 2016 qu'entre 1957 et 1966 (Steinbauer et al., 2018). Tout comme les vallées de basse altitude ont pu servir de refuge à de nombreux organismes au cours des dernières glaciations (Hewitt, 1999; Tzedakis, 2004), les zones d'altitude pourraient jouer un rôle similaire permettant aux espèces de faire face au réchauffement climatique (Sinervo et al., 2018). Ceci serait d'autant plus vrai chez les espèces ectothermes qui subissent davantage les fluctuations climatiques, modifiant leur température corporelle (Angilletta et al., 2002; Brans and Meester, 2018; Trochet et al., 2018) et affectant leurs performances physiologiques (Angilletta et al., 2010; Huey et al., 2012). Cependant, en remontant en altitude, les organismes seront soumis à de nouvelles contraintes, comme l'augmentation des radiations UV, la diminution des températures environnementales ou de la quantité de dioxygène, pouvant limiter leur chance de colonisation. Par exemple, l'intensité des radiations UV peut entraîner des changements dans la structure de l'ADN des espèces (Li et al., 2018). Ou encore, en altitude la diminution de la pression atmosphérique de l'air entraîne une réduction de la pression partielle de chacun de ses gaz, notamment du dioxygène (O_2 ; représentant 21% du volume de l'air au niveau de la mer), sans modifier leur proportion respective (Millet and Debevec, 2020; Richalet, 2020). Ainsi, à 3000 m d'altitude, pour un volume donné, la quantité de dioxygène est réduite de 30% (*i.e.* équivalent à 15% d' O_2 au niveau de la mer; Figure 8; Bouverot, 2012; Cordero et al., 2017a). Cette diminution de la disponibilité en dioxygène, appelée hypoxie d'altitude, peut avoir des effets aigus et chroniques sur les organismes (Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010).

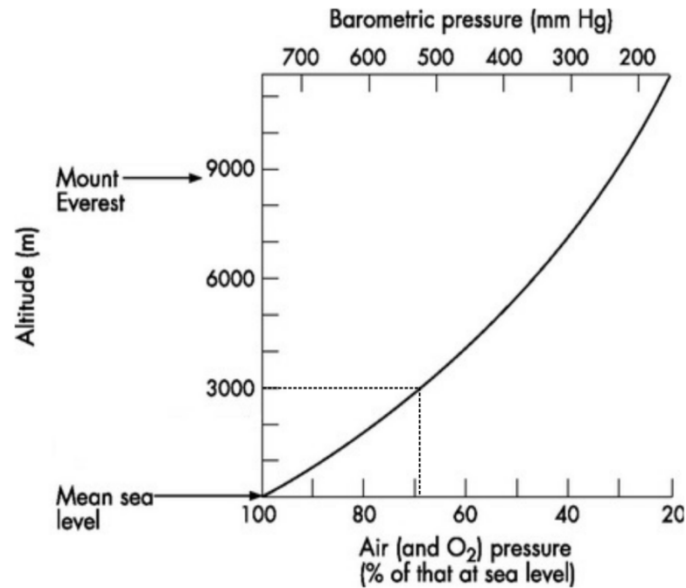


Figure 8 : Représentation de la disponibilité en dioxygène de l'air en fonction de l'altitude (par rapport au niveau de la mer) et de la pression atmosphérique (d'après Bouverot, 2012).

1.4. Effets de l'hypoxie chez les Vertébrés

L'hypoxie est une contrainte environnementale forte qui aura des effets chez tous les organismes ayant une respiration aérobie. Le fonctionnement cellulaire d'un organisme aérobie utilise le dioxygène comme fixateur d'électrons pour sa production d'énergie par la mitochondrie (Kelly et al., 2001). Quand un organisme est soumis temporairement à une diminution de la disponibilité du dioxygène, l'hypoxie est considérée comme aiguë. Dans le cas où cette contrainte se prolonge, l'hypoxie est alors considérée comme chronique. Les effets aigus et chroniques, ainsi que leurs coûts associés sur le long terme, varient beaucoup selon les espèces (Monge and Leon-Velarde, 1991; Golan and Huleihel, 2006).

La réponse des organismes endothermes adultes à l'hypoxie d'altitude est largement documentée chez les Oiseaux (Faraci, 1991; Monge and Leon-Velarde, 1991; Scott and Milsom, 2006; Ramirez et al., 2007; Scott, 2011; Lague et al., 2016) et les Mammifères (Monge and Leon-Velarde, 1991; Storz et al., 2004; Ramirez et al., 2007) incluant bien entendu les Humains (Beall et al., 2002; Beall, 2006; Erzurum et al., 2007). Chez l'ensemble de ces espèces, les réponses immédiates liées à l'hypoxie d'altitude comprennent généralement une augmentation du rythme cardiaque (McManus et al., 1974; Faraci, 1991; Peacock, 1998; Scott and Milsom, 2006) et une hyperventilation, qui se traduit par une augmentation du taux de dioxygène dans le sang et, en parallèle, une baisse du taux de

dioxyde de carbone (Faraci, 1991; Monge and Leon-Velarde, 1991; Peacock, 1998; Scott and Milsom, 2006). L'hypoxie chronique entraîne chez les endothermes adultes une réduction du rythme cardiaque (Monge and Leon-Velarde, 1991; Peacock, 1998) et des taux métaboliques (Ramirez et al., 2007; Lague et al., 2016). Les organismes présentent également une augmentation de la taille du cœur (Faraci, 1991; Monge and Leon-Velarde, 1991) et de la concentration de l'hémoglobine dans le sang (Faraci, 1991; Peacock, 1998; Scott and Milsom, 2006; Scott, 2011).

La réponse des organismes ectothermes à l'hypoxie d'altitude est, à l'inverse des endothermes, moins documentée. Il est néanmoins notable que l'on peut trouver chez les Arthropodes un éventail remarquable d'adaptations à l'hypoxie en fonction de la variabilité des habitats où ils se retrouvent. Cela concerne par exemple la capacité de passer des voies métaboliques aérobies aux voies anaérobies, la capacité à réduire leurs taux métaboliques ou encore à élargir le volume de leur système trachéal (Hoback and Stanley, 2001). Du fait de l'absence de système respiratoire actif chez ces espèces, la réduction de la disponibilité en dioxygène entraîne une réduction de la taille des individus (Peck and Chapelle, 2003) et limite les performances et la fitness (Dahlhoff et al., 2019). Dans le cadre de cette introduction, il ne sera abordé en détail que les effets de l'hypoxie chez les reptiles non-aviens. Chez ces espèces, les études se sont principalement penchées sur le développement embryonnaire liés à l'enfouissement des œufs dans les sites de pontes (Kam, 1993; Crossley and Altimiras, 2005; lungman and Piña, 2013; Cordero et al., 2017c; Wearing et al., 2017; Williamson et al., 2017) ou encore aux effets sur le métabolisme liés à l'immersion dans l'eau, notamment chez les tortues aquatiques adultes (Altland and Parker, 1955; Boyer, 1963; Jackson, 1973; Gatten, 1987; Stone et al., 1992; Herman and Smatresk, 1999; Baker et al., 2007; Krivoruchko and Storey, 2015). A l'inverse, les effets de l'hypoxie de haute altitude chez les reptiles non-aviens sont bien moins connus et n'ont reçu qu'une attention récente (González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015; Cordero et al., 2017a; Li et al., 2018, 2020; Gangloff et al., 2019; Kouyoumdjian et al., 2019; Parker and Dimkovikj, 2019). Cependant, il est envisageable que les effets de cette hypoxie de haute altitude soient similaires à ceux de l'hypoxie liés à l'enfouissement dans le sol ou à l'immersion dans l'eau.

1.4.1. Effets de la condition hypoxique chez les embryons de reptiles non-aviens

Tout d'abord, il est important de noter que les reptiles non-aviens ovipares ne présentent pas ou peu de soins parentaux post-ponte (While et al., 2015) alors que l'essentiel du développement embryonnaire se produit après la ponte des œufs dans des nids souterrains sans surveillance (Packard et al., 1988; Ackerman and Lott, 2004). Par conséquent, les embryons subissent dans le nid

des fluctuations de température, d'humidité et de concentration en dioxygène (Packard et al., 1988; Deeming and Thompson, 1991; Ackerman and Lott, 2004). Chez ces espèces, même de courtes expositions des embryons à l'hypoxie (*i.e.* hypoxie aiguë) peuvent avoir des effets durables sur la croissance et le développement ultérieurs (Crossley and Altimiras, 2005; Williamson et al., 2017). Chez des embryons d'Alligator d'Amérique, *Alligator mississippiensis*, une exposition à une hypoxie aiguë de 50% (*i.e.* équivalent à 10% d'O₂ au niveau de la mer) engendre une baisse du rythme cardiaque chez les embryons qui s'enchaîne une tachycardie une fois les embryons replacés en normoxie (*i.e.* 21% d'O₂ au niveau de la mer; Crossley and Altimiras, 2005). A l'inverse, des embryons du lézard, *Bassiana duperreyi*, placés temporairement en hypoxie à 30% ont accéléré leur rythme cardiaque (Du et al., 2010a). Cette réponse à l'hypoxie aiguë – accélération du rythme cardiaque – a permis aux individus de maintenir des taux métaboliques similaires à ceux des embryons incubés en normoxie, ne modifiant pas la durée d'incubation ainsi que le phénotype à l'éclosion (*e.g.* la taille des individus, la masse cardiaque relative, la vitesse locomotrice, le taux de survie et de croissance juvénile).

Quand les embryons de reptiles non-aviens sont placés en condition d'hypoxie chronique de 30%, 40% ou 50% (respectivement équivalent à environ 15%, 12% et 10% d'O₂ au niveau de la mer), leurs réponses varient en fonction des différents ordres (*i.e.* Crocodiliens, Chéloniens et Squamates; Porteus et al., 2011) ainsi qu'en fonction des différents niveaux d'hypoxie chronique (Annexe 1, Tableau 1). Ces résultats suggèrent la présence de seuils dans la réponse à l'hypoxie chez les embryons de reptiles non-aviens.

Dans le cas d'une incubation dans une condition hypoxique chronique de 30% (*i.e.* équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer), une des réponses phénotypiques généralement observée est une diminution des taux métaboliques embryonnaires (Figure 9), notamment à travers une réduction de la fréquence cardiaque (Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019) et de la consommation de dioxygène (Cordero et al., 2017a). Cependant, dans certains cas, comme chez les alligators, une hypoxie chronique à 30%, n'affecte pas la fréquence cardiaque des embryons (Crossley and Altimiras, 2005) alors qu'elle l'accélère chez certains lézards (Du et al., 2010a). Chez les alligators, cette condition hypoxique entraîne également une diminution de la pression artérielle (Crossley and Altimiras, 2005). Au niveau du développement embryonnaire (Figure 9), des études ont montré que ni la masse embryonnaire, ni la durée d'incubation, ni le succès d'éclosion n'étaient affectés par une hypoxie chronique de 30% (Crossley and Altimiras, 2005; Du et al., 2010a; Lungman and Piña, 2013; Kouyoumdjian et al., 2019; Li et al., 2020). Cependant, une étude a montré une légère augmentation

de la durée d'incubation chez le Lézard des murailles, *Podarcis muralis* (Kouyoumdjian et al., 2019). Enfin, à l'éclosion (Figure 9), la taille corporelle des individus est réduite chez les lézards (Du et al., 2010a; Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Li et al., 2020) mais pas chez les alligators (Owerkowicz et al., 2009; lungman and Piña, 2013). Dans le cas de certains lézards, une augmentation du volume du système cardiovasculaire a été mesurée (Du et al., 2010a; Cordero et al., 2017a). Des études ont également montré, chez des lézards, que la condition hypoxique chronique de 30% subit durant l'incubation n'affectait pas les taux de croissance et de survie juvénile (Du et al., 2010a) et n'affectait pas non plus les performances locomotrices (Du et al., 2010a; Li et al., 2020).

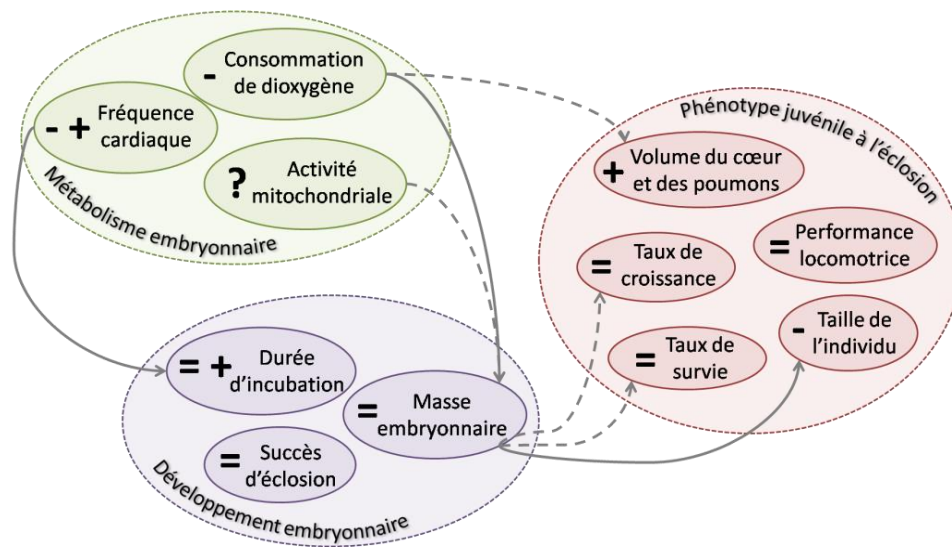


Figure 9 : Représentation simplifiée des effets d'une hypoxie chronique de 30% durant l'incubation chez des Squamates (*i.e.* équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer) sur le métabolisme embryonnaire et sur le phénotype juvénile à l'éclosion. Les flèches en trait plein représentent des causalités certaines et les flèches en pointillés représentent des causalités possibles mais non mesurées.

1.4.2. Effets de la condition hypoxique chez les adultes de reptiles non-aviens

Chez les adultes des reptiles non-aviens, comme pour les embryons, les réponses à l'hypoxie sont diverses (Porteus et al., 2011; Annexe 1, Tableau 2). Dans le cas des Squamates, placés en condition d'hypoxie aiguë de 30%, les réponses connues du métabolisme sont l'augmentation de la fréquence cardiaque (Pough, 1973; Gratz, 1979) ainsi qu'une diminution de la fréquence respiratoire (*i.e.* ventilation pulmonaire; Pough, 1973; Gratz, 1979) qui s'accompagnent d'une augmentation du dioxygène consommé (Gratz, 1979). Par exemple, chez le serpent aquatique *Nerodia rhombifer*, la consommation de dioxygène et la ventilation augmente également de manière significative après de longues phases d'apnée (*i.e.* 10 à 15 min; Gratz, 1979). A l'inverse, chez un autre serpent aquatique, *Acrochordus javanicus*, dont les phases de repos diurnes se font en apnée au fond de l'eau, la

fréquence de respiration est plus basse comparée à celle mesurée durant les phases de nage et le rythme cardiaque plus important (Pough, 1973). Cette condition hypoxique aiguë entraîne également, chez des lézards, une augmentation de la concentration d'hémoglobine et une augmentation du nombre d'hématocrites dans le sang (Kouyoumdjian et al., 2019).

Dans le cas d'une condition hypoxique chronique de 30%, les Squamates répondent par différents changements métaboliques (Figure 10). Comme durant une hypoxie aiguë de 30%, la fréquence cardiaque des individus augmentent (Boyer, 1966). Cependant, la fréquence respiratoire augmente mais pas la consommation de dioxygène (Boyer, 1966; Bartlett and Birchard, 1983). Chez certaines espèces, la composition sanguine est aussi modifiée par cette condition hypoxique avec une augmentation du nombre d'hématocrites (Vinegar and Hillyard, 1972; Weathers and White, 1972), de la concentration en hémoglobine (Megía-Palma et al., 2020) ainsi que de l'affinité des globules rouges (Vinegar and Hillyard, 1972) l'ensemble favorisant le transport du dioxygène dans l'organisme. Néanmoins, chez d'autres espèces, cette condition hypoxique n'influence pas ces paramètres (Weathers and White, 1972; Gangloff et al., 2019). L'ensemble des modifications métaboliques en réponse à une hypoxie chronique de 30% chez les Squamates modifie également de manière négative la condition corporelle des individus (Gangloff et al., 2019; Megía-Palma et al., 2020) ainsi que leurs performances locomotrices (Gangloff et al., 2019).

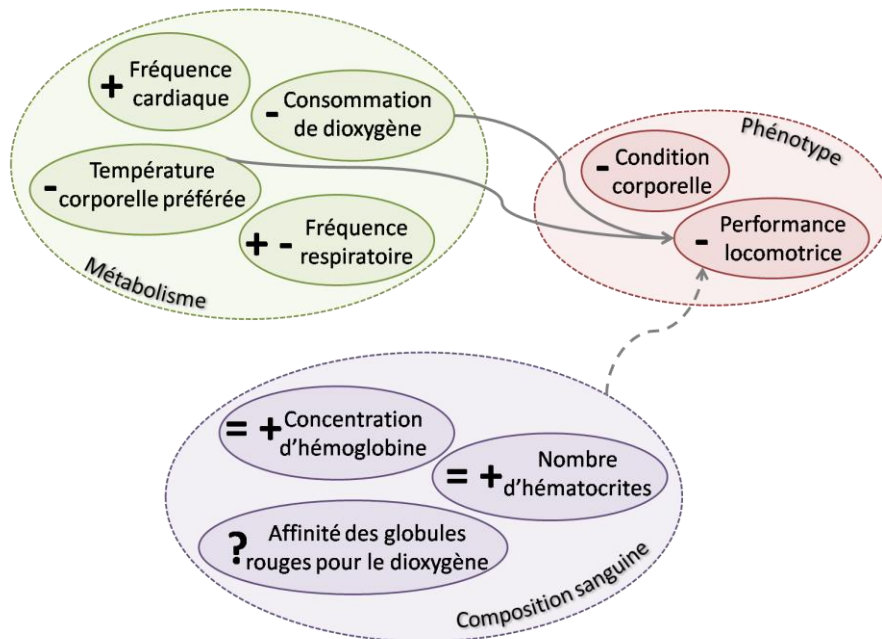


Figure 10 : Représentation simplifiée des effets d'une hypoxie chronique de 30% (i.e. équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer) durant la vie adulte de Squamates sur le métabolisme, la composition sanguine et le phénotype. Les flèches en trait plein représentent des causalités certaines et les flèches en pointillés représentent des causalités possibles mais non mesurées.

1.4.3. Effets de la température en condition d'hypoxie chez les reptiles non-aviens

Plusieurs espèces de reptiles sont déjà adaptées à la vie à des altitudes extrêmement élevées (*i.e. les Lézards du genre Liolaemus*: Marquet et al., 1989; le Lézard des palissades, *Sceloporus occidentalis* et le Lézard de Sagebrush, *Sceloporus graciosus*: Adolph, 1990; le Lézard de Bonnal, *Iberolacerta bonnali*; Pottier, 2012; *Quedenfeldtia trachyblepharus*: Bouazza et al., 2016; les serpents du genre *Thermophis*: Li et al., 2018; *Phrynocephalus vlangalii*: Wu et al., 2018). Ces observations témoignent que la colonisation et la vie à très haute altitude sont possibles pour les espèces ectothermes. Néanmoins, si la température venait à augmenter dans les zones de haute altitude (*cf. section 1.1.3*), le mécanisme de production énergétique aérobie des tétrapodes ectothermes pourrait être limité par la diminution de la disponibilité en dioxygène (Gangloff and Telemeco, 2018a). Chez les reptiles adultes, par exemple, une exposition à des températures élevées augmente la consommation de dioxygène et affecte la régulation du métabolisme énergétique (Gangloff et al., 2016). Même si dans un premier temps l'augmentation des températures peut augmenter les performances des reptiles (Angilletta et al., 2002), elles peuvent dans un second temps être réduite en hypoxie (Li et al., 2016). Avec l'augmentation de la température et donc du métabolisme (*cf. section 1.2.2*), les systèmes respiratoires et cardiovasculaires des espèces pourraient être dans l'incapacité de fournir les apports en dioxygène suffisants aux tissus pour le maintien du métabolisme (Pörtner, 2002; Jackson, 2007; Pörtner and Knust, 2007; Verberk et al., 2016; Pörtner et al., 2017). Cette théorie de l'Oxygène et des Capacités de Tolérance Thermique Limitée (OCLTT pour *Oxygen and Capacity Limited Thermal Tolerance* en anglais; Figure 11) a été exposée par Pörtner en 2002. Elle stipule qu'à haute température, les faibles niveaux de dioxygène disponibles limitent les taux métaboliques maximums en activité, dont les valeurs convergent alors vers les taux métaboliques au repos (Pörtner et al., 2017). Cette réduction du métabolisme maximum réduit à son tour la tolérance des organismes à l'augmentation des températures. Dans un premier temps, chez les organismes ectothermes, cette inadéquation entre la demande en dioxygène de l'organisme et sa capacité à la fournir réduira les performances des individus mais permettra de maintenir les taux métaboliques basaux. Cependant, à des températures proches des températures critiques maximales des organismes, la réduction des capacités de transport du dioxygène et sa disponibilité pourraient ne pas suffire à maintenir les taux métaboliques basaux (Gangloff and Telemeco, 2018a). Pour réduire ce risque, de nombreuses espèces ectothermes aquatiques et terrestres abaissent par thermorégulation leur température corporelle (Dupré and Wood, 1988; Dupré et al., 1988; Jackson, 2007) ou leur préférence thermique (Megía-Palma et al., 2020) en condition d'hypoxie afin de réduire la demande en dioxygène de l'organisme.

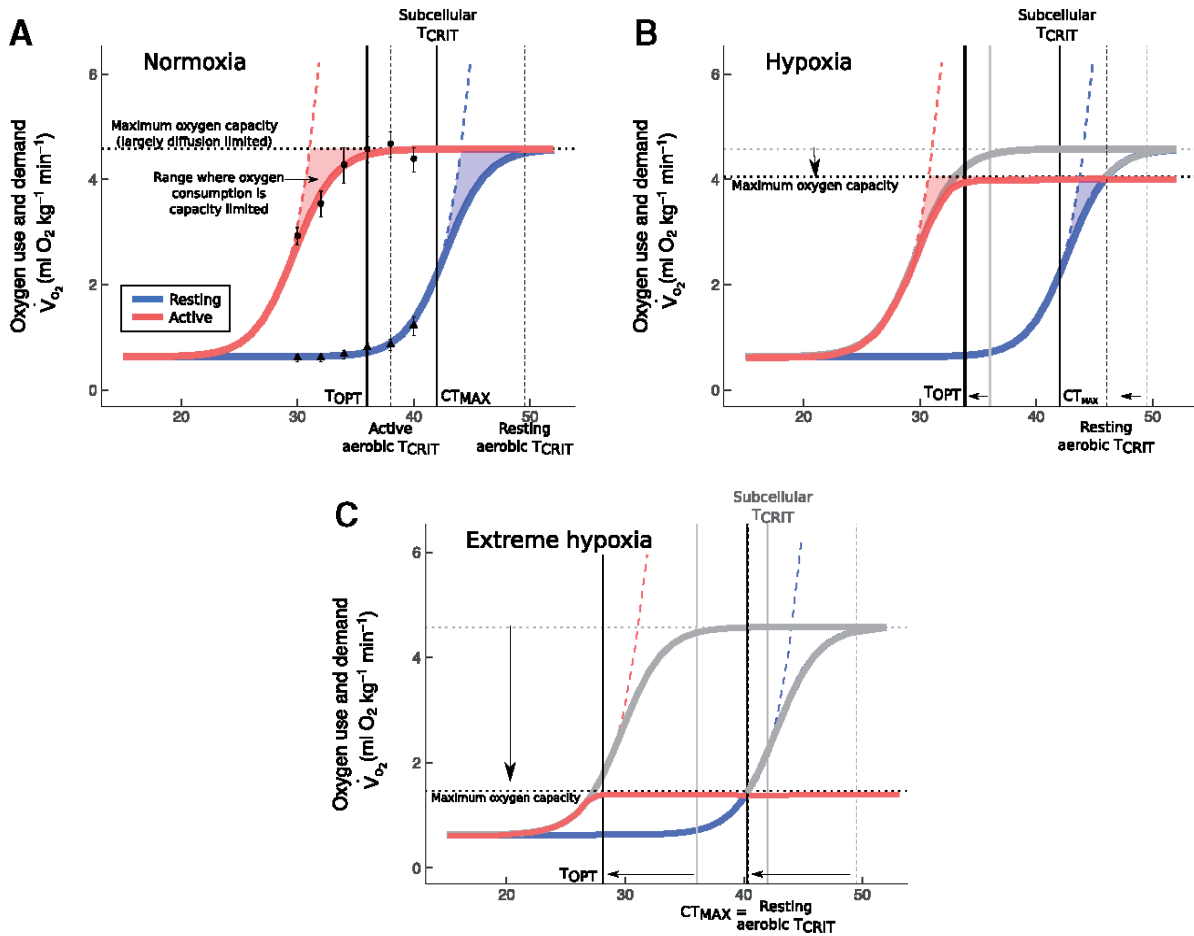


Figure 11 : Schéma illustrant les relations proposées entre les taux métaboliques au repos et en activité chez les tétrapodes ectothermes en fonction de la température et des niveaux d'oxygène. T_{OPT} ; Température optimale, T_{CRIT} ; Température critique aux repos et en activité, CT_{MAX} ; Température critique maximal. Le graphique (A) affiche ces relations dans une condition normoxique. Le graphique (B) représente ces relations en condition d'hypoxie modérée. Ce niveau d'hypoxie ne devrait avoir aucun effet sur la CT_{MAX} ou le métabolisme au repos mais la T_{CRIT} en activité sera réduite, ce qui réduira le métabolisme maximal et la T_{OPT} . Le graphique (C) représente les relations avec une exposition à une hypoxie extrême. Ce niveau d'hypoxie réduira la CT_{MAX} parce que la T_{CRIT} au repos est inférieur à la T_{CRIT} subcellulaire. La T_{CRIT} en activité sera également fortement affectée avec de fortes réductions du métabolisme et de la T_{OPT} .

Chez les embryons de reptiles, le développement embryonnaire est dépendant d'une disponibilité adéquate de dioxygène (Vleck and Hoyt, 1991). L'augmentation des températures accélère la fréquence cardiaque des embryons et augmente leur besoin en dioxygène (Du et al., 2010a; b; Hall and Warner, 2020). Elle augmente aussi la respiration mitochondriale (Sun et al., 2015). De plus, quand les températures d'incubation s'approchent des températures létales, le rythme cardiaque et la production de dioxyde de carbone continuent d'augmenter tandis que la consommation de dioxygène plafonne (Hall and Warner, 2020). Ces informations, en accord avec l'OCLTT, démontrent que les besoins en dioxygène de l'embryon ne peuvent pas être assurés à des températures d'incubation trop élevées. C'est pourquoi, en condition d'hypoxie et de températures élevées, l'

incapacité des embryons à effectuer des comportements de thermorégulation pour diminuer leur température corporelle (Telemeco et al., 2016; Cordero et al., 2018) diminue leur succès d'éclosion (Iungman and Piña, 2013; Flewelling and Parker, 2015; Smith et al., 2015; Hall and Warner, 2020). Ces conditions vont aussi réduire la taille du corps ainsi que les performances physiques des juvéniles à l'éclosion (Iungman and Piña, 2013; Liang et al., 2015). Il est donc concevable que des niveaux de dioxygène faibles limitent les niches thermiques des espèces en limitant le succès du développement embryonnaire (Smith et al., 2015).

Étant donné l'interdépendance des température et la disponibilité en dioxygène sur les systèmes physiologiques, une compréhension des mécanismes physiologiques par lesquels les ectothermes répondent à l'hypoxie à haute altitude est nécessaire pour caractériser la capacité des individus, et par extension des populations, à monter en altitude (Storz et al., 2010).

1.5. Problématique et hypothèses générales

1.5.1. Contexte général

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre du réchauffement climatique. En effet, avec l'augmentation des températures prévue par le GIEC (*cf. section 1.1.3*), nous pouvons imaginer, à l'instar de nombreuses autres espèces, que les reptiles non-aviens, vont monter en altitude en suivant l'évolution des enveloppes thermiques (*cf. section 1.3*). Certains individus pourraient présenter une plasticité phénotypique adaptative leur permettant de s'acclimater aux conditions d'hypoxie d'altitude, notamment à travers la capacité à se maintenir puis de se reproduire en haute altitude. En effet, de nombreuses espèces ont déjà rencontré ces conditions à travers les migrations passées dues aux alternances des cycles de glaciations et de réchauffements planétaires qui ont lieu depuis plusieurs milliers d'années. Dans ce cas, les individus ayant une plus grande plasticité phénotypique dirigeront l'extension de l'espèce (Yeh and Price, 2004; Lavergne and Molofsky, 2007; Storz et al., 2010; Molina-Montenegro et al., 2012). En effet, les individus présentant un génotype capable de produire des phénotypes adaptés à cette nouvelle contrainte seront sélectionnés. Actuellement, les modèles prédictifs des futures répartitions des espèces ne tiennent pas compte des contraintes que l'hypoxie pourrait imposer à l'établissement des populations de reptiles non-aviens à haute altitude. En effet, si beaucoup d'études ont exploré les effets de l'hypoxie de haute altitude chez les oiseaux (Black and Snyder, 1980; Faraci, 1991; Monge and Leon-Velarde, 1991; Scott and Milsom, 2006; Ramirez et al., 2007; Scott, 2011; Lague et al.,

2016) ou les mammifères (Monge and Leon-Velarde, 1991; Peacock, 1998; Beall et al., 2002; Storz et al., 2004; Beall, 2006; Erzurum et al., 2007; Ramirez et al., 2007; Storz, 2016), celles concernant les reptiles non-aviens sont récentes et moins nombreuses (Weathers and McGrath, 1972; Lu et al., 2015; Cordero et al., 2017a; Li et al., 2018, 2020; Gangloff et al., 2019; Kouyoumdjian et al., 2019; Plasman et al., 2020). Actuellement, il n'existe que peu de connaissance sur les impacts de l'augmentation des températures à ces altitudes sur le maintien des populations de Vertébrés ectothermes déjà soumis à une réduction de la disponibilité en dioxygène (*cf. section 1.4*). Cependant, l'augmentation globale des températures prévue par l'IPPC (*cf. section 1.1.3*), prévoit également augmenter la hausse des températures dans les milieux de haute altitude. Cela pourrait éventuellement exposer les populations nouvellement établies à haute altitude à la double contrainte d'une faible disponibilité en oxygène associée à des températures environnementale non optimales.

Selon ce contexte actuel des connaissances, plusieurs scénarios sont utilisés pour mesurer l'impact de l'hypoxie d'altitude, en association ou non à une augmentation des températures, sur la Couleuvre vipérine, *Natrix maura* :

- Scénario 1 : Un environnement normoxique (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer) avec des températures favorables (*i.e.* 24°C et 28°C), qui correspond, pour des populations de basse altitude, aux conditions actuelles, sans augmentation des températures.
- Scénario 2 : Un environnement normoxique (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer) avec une température élevée (*i.e.* 32°C), qui correspond au scénario du réchauffement climatique pour des populations de basse altitude qui ne migrent pas.
- Scénario 3 : Un environnement hypoxique (*i.e.* équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer) avec des températures favorables (*i.e.* 24°C et 28°C), qui correspond, pour des populations de basse altitude, aux conditions environnementales qu'elles pourront rencontrer en migrant en haute altitude.
- Scénario 4 : Un environnement hypoxique (*i.e.* équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer) avec une température élevée (*i.e.* 32°C), qui correspond aux conditions environnementales futures en haute altitude, si le changement climatique perdure, et qui pourront être rencontrées par des populations ayant migré et qui se seraient maintenues en haute altitude.

1.5.2. Pourquoi étudier la Couleuvre vipérine

Afin d'essayer d'apporter des éléments de réponse, cette thèse s'intéresse aux effets de l'hypoxie d'altitude aiguë et chronique, associés à l'augmentation des températures sur la physiologie

embryonnaire et les performances physiques juvéniles, chez une espèce de Vertébré ectotherme, la Couleuvre vipérine (*Natrix maura*, Linnaeus, 1758; cf. section 2.1). La Couleuvre vipérine est une espèce originaire du Maghreb, où il est possible de la rencontrer jusqu'à 2600 m d'altitude. L'espèce a colonisé tout le bassin Méditerranéen (Pottier, 2016). Toujours en expansion vers le Nord, elle colonise progressivement les Pyrénées (Guicking et al., 2008; cf. section 2.1.1). La Couleuvre vipérine est une espèce ectotherme poïkilotherme (cf. section 1.2) avec une mobilité restreinte, ce qui fait d'elle une espèce représentative d'un milieu et de ses conditions environnementales à une échelle précise. En effet, comme beaucoup de reptiles, la Couleuvre vipérine peut être considérée comme un bio indicateur du milieu dans lequel elle se trouve (Hall, 1980; Manolis et al., 2002; Thompson et al., 2008; Brischoux et al., 2009; Marsili et al., 2009; Mullin and Seigel, 2011). De par son écologie (cf. section 2.1), la Couleuvre vipérine est, comme de nombreux Vertébrés ectothermes, vulnérable aux variations de température qui vont impacter son cycle biologique (Angilletta et al., 2002; cf. section 1.2). D'un autre côté, c'est une espèce largement inféodée aux milieux aquatiques (Vacher and Santos, 2010; Pottier, 2016) où elle y consomme un large éventail d'espèces de poissons (Santos et al., 2000). Son écologie, qui l'oblige à réaliser des apnées de longue durée pourrait probablement permettre à la Couleuvre vipérine de mieux faire face à des conditions hypoxiques que d'autres espèces de Squamates (cf. section 2.1.2). Enfin, la Couleuvre vipérine est un serpent, largement répandu en basse altitude dans les Pyrénées. Facile à capturer, cette espèce se maintient aisément en captivité et pond un nombre d'œufs suffisant (Vacher and Santos, 2010) pour réaliser des plans expérimentaux solides (cf. section 2.3.1). Grâce à ses caractéristiques écologiques, à son historique de colonisation et à la facilité de travail qu'elle offre, la Couleuvre vipérine est un modèle d'étude adéquat pour comprendre les impacts de l'augmentation des températures en relation avec l'hypoxie d'altitude sur un organisme ectotherme, dont la remontée altitudinale devrait accélérer à la faveur du changement climatique. Notamment dans les montagnes méditerranéennes où les effets de l'augmentation des températures sont particulièrement marqués (Lebourgeois et al., 2012).

1.5.3. Hypothèses générales

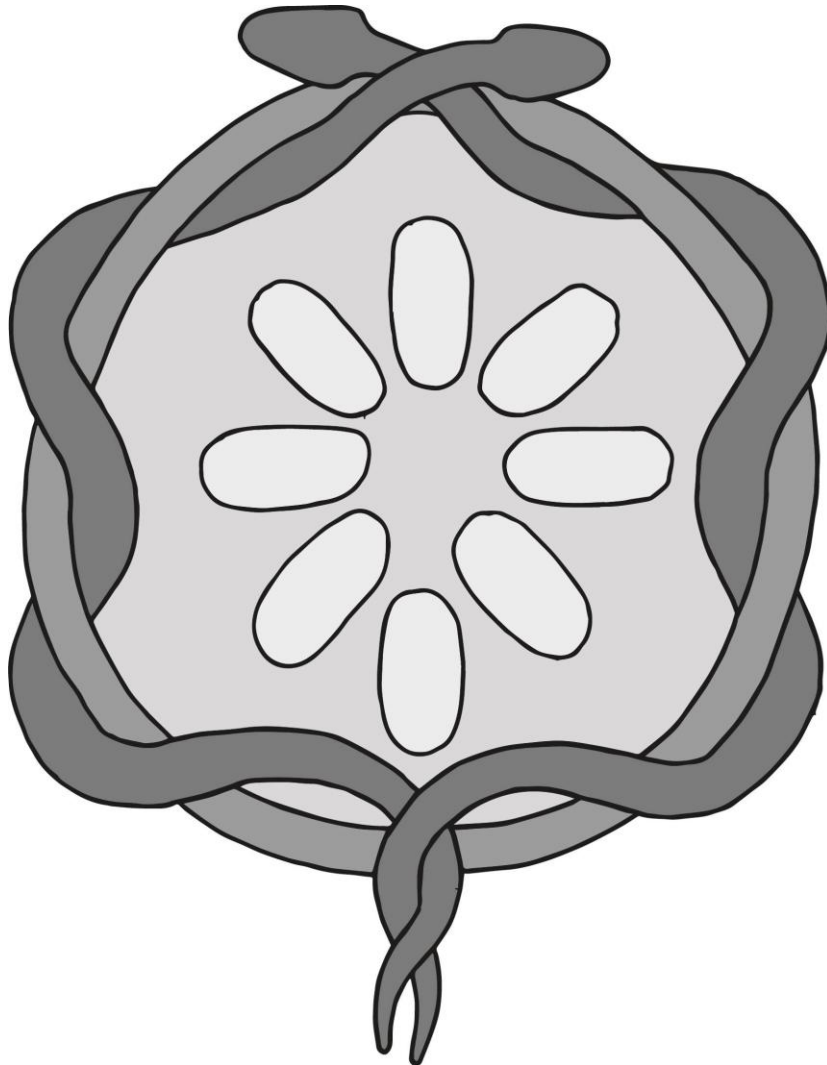
Dans un premier temps, les effets négatifs liés à l'hypoxie d'altitude pourraient être atténués par la plasticité phénotypique des individus, permettant le maintien des populations à haute altitude. A partir des études menées chez les reptiles non-aviens (cf. sections 1.4.1), il est possible de penser que les embryons de Couleuvre vipérine exposés à une hypoxie chronique de 30% auront un métabolisme réduit, notamment à travers une diminution de la fréquence cardiaque et de la consommation d'oxygène. Ces modifications entraîneront probablement des variations développementales des embryons comme une durée d'incubation plus longue mais sans modifier le

succès d'éclosion. Il est également possible de penser que le phénotype à l'éclosion soit modifié avec notamment des juvéniles plus petits. De plus, tant que les températures environnementales resteront optimales, la demande en oxygène du métabolisme ne sera pas augmentée. Dans cette condition et selon le modèle mécaniste de l'OCLTT (*cf. section 1.4.3*), les individus devraient maintenir leurs performances locomotrices.

Dans un deuxième temps, l'augmentation des températures devrait accélérer l'ensemble du métabolisme embryonnaire. En condition de normoxie, Cela devrait entraîner, compte tenu des connaissances actuelles (*cf. section 1.2.4*), une augmentation du rythme cardiaque et une diminution de la durée d'incubation. A l'éclosion, les juvéniles devraient être plus petits et leurs performances locomotrices améliorées. Néanmoins, l'augmentation des températures durant l'hypoxie chronique de 30% devrait négativement impacter l'ensemble du développement embryonnaire ainsi que le phénotype juvénile (*cf. section 1.4.3*). Ce contexte devrait réduire fortement la capacité de la Couleuvre vipérine à se maintenir en condition d'hypoxie d'altitude entraînant potentiellement l'extinction des populations.

Chapitre 2.

MODÈLE D'ÉTUDE ET PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES



2.1. Modèle d'étude : La Couleuvre vipérine

2.1.1. Répartition et variations géographiques

La Couleuvre vipérine, *Natrix maura* (Linnaeus, 1758), est une espèce circum-méditerranéenne présente en Afrique du Nord où elle peut se retrouver jusqu'à 2600 m d'altitude (Maroc, Algérie, Tunisie), sur toute la péninsule ibérique (Espagne, Portugal), sur les trois quarts méridionaux de la France mais aussi à l'extrême Ouest de la Suisse et l'extrême Nord-Ouest de l'Italie (Pottier, 2016). Cette espèce a colonisé les environnements montagneux des Pyrénées à travers les cycles historiques de réchauffement et de refroidissement (Gómez and Lunt, 2007). La péninsule ibérique ayant servi de refuge glaciaire pendant le Pléistocène lui a permis de recoloniser les Pyrénées et l'Europe occidentale depuis 12 000 ans, pendant l'Holocène (Guicking et al., 2008). Dans les Pyrénées, la Couleuvre vipérine est largement présente sur l'ensemble de la chaîne. Néanmoins, comme pour de nombreuses autres espèces de reptiles du massif, sa répartition altitudinale varie fortement en fonction des zones biogéographiques (Pottier, 2016). Dans l'Ouest des Pyrénées, la Couleuvre vipérine a été observée jusqu'à 1000 m d'altitude sur le versant Sud (Gosá and Bergerandi, 1994) et seulement jusqu'à 700 m sur le versant Nord (Bea, 1985). À l'Est de la chaîne, l'espèce est présente jusqu'à 1500 m en Catalogne (Llorente et al., 1995; Santos, 2015) et jusqu'à 1200 m dans les Pyrénées-Orientales (Geniez and Cheylan, 2012). Sur le versant Nord des Pyrénées Centrales, en Ariège par exemple, la Couleuvre vipérine atteint seulement les 1000 m d'altitude (Pottier et al., 2008; Aubret et al., 2015). Néanmoins, de nouveaux modèles écophysiologiques prédictifs suggèrent qu'à l'horizon 2100, l'espèce présenterait un risque modéré de disparition en milieu de plaine, mais pourrait profiter de nouveaux refuges climatiques parmi les plus hauts sommets des Pyrénées. Une région dont elle est actuellement exclue en raison de l'environnement climatique frais et de la courte saison d'activité (Sinervo et al., in prep.). La phylogéographie de l'espèce, basée sur des analyses moléculaires (ADN mitochondrial), est complexe avec quatre lignées évolutives connues (Guicking et al., 2008; Pottier, 2016). Des travaux génétiques récents ont permis le développement de microsatellites spécifiques à la Couleuvre vipérine (ADN nucléaire; Le Chevalier et al., 2019; Annexe 1) afin de travailler plus particulièrement sur la structuration génétique de l'espèce à petite échelle sur des individus de la vallée du Lez et de la vallée de la Bouigane (Ariège, France). Ce sont des individus de ces mêmes populations - qui semblent montrer une structuration génétique forte - qui sont étudiés dans cette thèse. En effet, le long de ces deux rivières, les analyses montrent trois populations génétiques différentes, deux en amont et une en aval avec un mélange génétique de ces trois populations à l'endroit où les deux rivières se rejoignent (Figure 1 ; données non publiées).

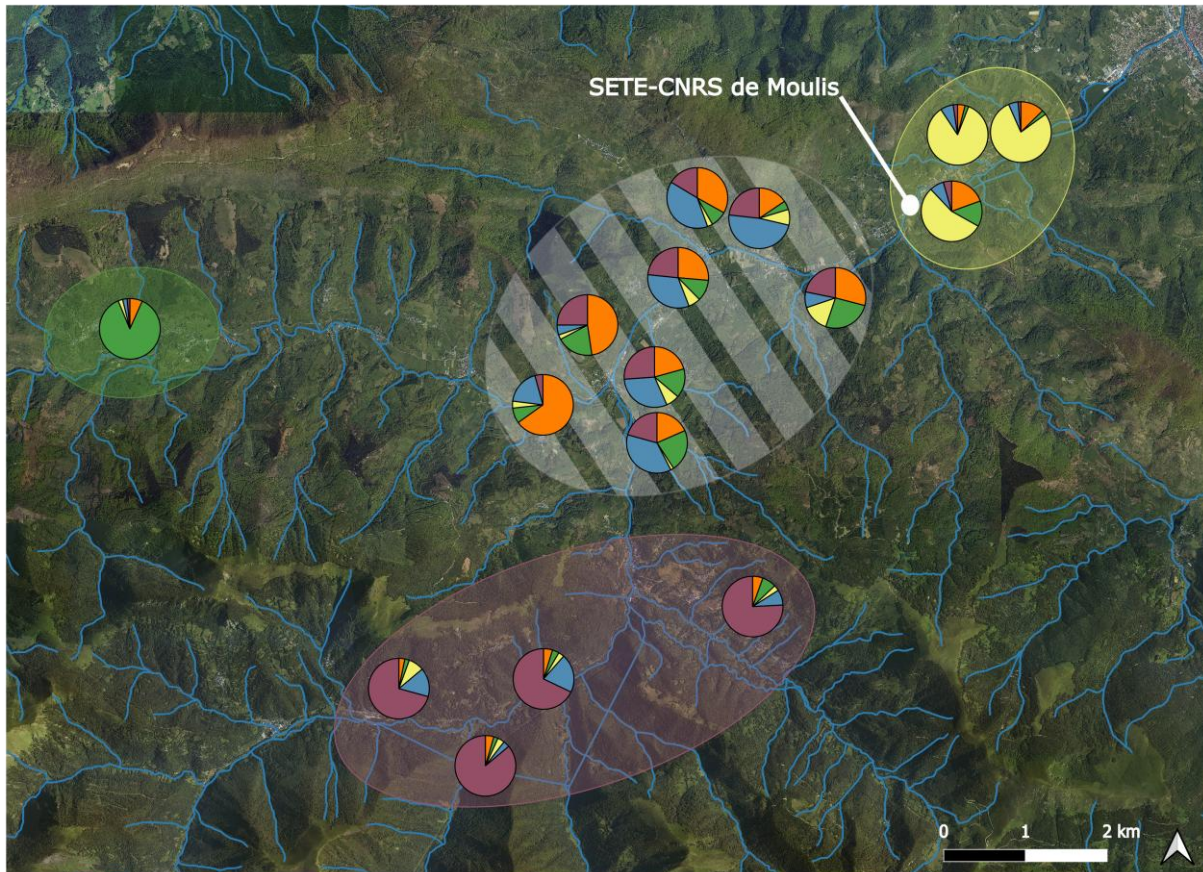


Figure 1 : Représentations des différentes populations génétiques potentielles de *Couleuvre vipérine* dans la vallée du Lez et la vallée de la Bouigane.

2.1.2. *Ecologie et biologie générale*

La Couleuvre vipérine (Figure 2) est une espèce de l'Ordre des *Squamates*, Sous-Ordre *Serpentes*, et de la Famille des *Natricidés* (De Massary et al., 2019). L'espèce est active autour de mars, dès que la température du gîte d'hivernage atteint les 10°C, et ce jusqu'au mois d'octobre (Vacher and Santos, 2010). Ce serpent ovipare se reproduit du mois d'avril au mois de juin. Les femelles peuvent stocker dans leurs oviductes le sperme de plusieurs mâles (Pottier, 2016). Une fois fécondées, elles se regroupent et pondent une quinzaine d'œufs en moyenne (Hailey and Davies, 1987; Vacher and Santos, 2010) dans des sites de pontes dits communautaires où règnent des conditions environnementales favorables au développement des embryons dont l'incubation dure d'environ 46 à 90 jours (Vacher and Santos, 2010). Néanmoins, la taille de la ponte augmente avec la taille des femelles, échelonnant le nombre d'œufs de 2 à 16 par ponte, voire plus dans de rares cas connus (Vacher and Santos, 2010). C'est une espèce largement inféodée aux milieux aquatiques (Vacher and Santos, 2010; Pottier, 2016) où elle y consomme un large éventail d'espèces de poissons (Santos et al., 2000) et d'amphibiens en fonction des localités et de la disponibilité des habitats (Pottier, 2016). La dispersion aquatique des adultes ou des juvéniles est assez faible avec une capacité de

déplacement estimée entre 500 m et 1000 m par jour (Hailey and Davies, 1987; Boissinot et al., 2013). Les performances de nage et d'apnée de l'espèce sont dépendantes de la température de l'eau (Aubret et al., 2015). La vitesse de nage chez la Couleuvre vipérine augmente avec les températures et est maximum entre 25°C et 30°C (Hailey and Davies, 1986a; Aubret et al., 2015) et diminue au delà de ces températures. De plus il est important de noter que, chez cette espèce, la vitesse de nage est supérieure à la vitesse de déplacement sur terre pour une température donnée (Isaac and Gregory, 2007). Concernant, les temps d'apnée, ils sont maximum à des températures plus basses (*i.e.* 10°C ; Aubret et al., 2015). En effet, comme tous les ectothermes, les besoins en oxygène de la Couleuvre vipérine sont dépendants des taux métaboliques, eux-mêmes dépendant de la température corporelle (Pough, 1980). La capacité d'apnée de l'espèce pourrait donc être un indicateur de ses besoins en oxygène (Stevenson et al., 1985). De plus, des études ont démontré que des serpents semi-aquatiques, comme l'est la Couleuvre vipérine, abaissent leur rythme cardiaque pendant les phases de plongée (Johansen, 1959; Jacob and McDonald, 1976), diminuant probablement dans un même temps les besoins en oxygène de l'organisme. Ces capacités d'apnée importantes chez la Couleuvre vipérine pourraient être une stratégie de défense anti prédateur (Scribner and Weatherhead, 1995). En effet, cette espèce, ne s'éloigne que peu des milieux aquatiques (Isaac and Gregory, 2007) où elle y prend la fuite lorsqu'elle est menacée (Scribner and Weatherhead, 1995). Sa capacité à maintenir des apnées longues serait alors un avantage considérable pour se cacher le plus longtemps possible d'un prédateur par exemple.



Figure 2 : Photographies de Couleuvres vipérines. (A gauche) Femelle adulte "*morphe bilineata*", Moulis (09, France), le 25 juillet 2016. (A droite) Nouveau né en comportement d'intimidation, Moulis (09, France), le 18 septembre 2018.

2.2. Législation et autorisations

La Couleuvre vipérine est représentée à tous les niveaux de la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN ou *IUCN* en anglais). Elle dispose du statut LC (Least Concern : Préoccupation mineure) sur la liste rouge mondiale et européenne mais sur la liste rouge française, elle dispose du statut NT (Near Threatened : Quasi menacé). Cependant, sur la liste rouge régionale Occitanie, ce statut se restreint à LC (Least Concern : Préoccupation mineure). La Couleuvre vipérine est une espèce protégée, listée dans l'Annexe 3 de la Convention de Berne, ainsi que dans la Directive 2010/63/EU du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Elle est également listée dans l'Article 3 de l'arrêté du 19 novembre 2007 fixant les listes des amphibiens et des reptiles protégés sur l'ensemble du territoire français ainsi que les modalités de leur protection. De ce fait, toute manipulation, capture, transport, maintien en captivité ou destruction de cette espèce sont interdits. Afin de réaliser cette thèse entraînant l'utilisation de cette espèce à des fins scientifiques, les dérogations et formations nécessaires ont été obtenues. Dans un premier temps, un arrêté préfectoral portant autorisation de captures, enlèvements et prélèvements sur des reptiles et amphibiens protégés (n° 2017-s-02 du 30 mars 2017) a été délivré par la Direction Régionale de l'Environnement de l'Aménagement et du Logement (DREAL) de la préfecture d'Ariège, de l'Aude, de la Haute-Garonne, des Hautes-Pyrénées et des Pyrénées Orientales. Dans un deuxième temps, j'ai réalisé une formation réglementaire pour l'utilisation d'animaux de la faune sauvage non-hébergée à fins scientifiques – niveau concepteur (décret n° 2013-118 du 01 Février 2013 et agrément du Ministère chargé de l'Agriculture n° I-75-MNHN-F1-15 du 17 juin 2015) délivrée par le Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN), le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et l'Office National de la Chasse et la Faune Sauvage (ONCFS). Enfin, j'ai rédigé une demande d'autorisation de projet afin d'obtenir la validation éthique du projet, qui a été obtenue auprès du Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (n° APAFIS#16359-201808011445465 v4).

2.3. Méthodes utilisées

2.3.1. *Maintien en captivité et incubation*

Les femelles gestantes de Couleuvres vipérines ont été capturées à la main dans leur milieu naturel lors de de prospection à vue. Cette période de capture s'est étalée de mi juin à début juillet lorsqu'il était possible de détecter, par la palpation des organes génitaux femelles, la présence d'œufs en

developpement. Au total, 51 femelles de Couleuvre vipérine réparties sur 3 années (12 en 2016, 17 en 2017 et 22 en 2018) ont été capturées (Figure 3). Les individus ont ensuite été ramenés à la Station d'Ecologie Théorique et Expérimentale de Moulis (42.958394 N, 1.086440 E; 436 m ASL).

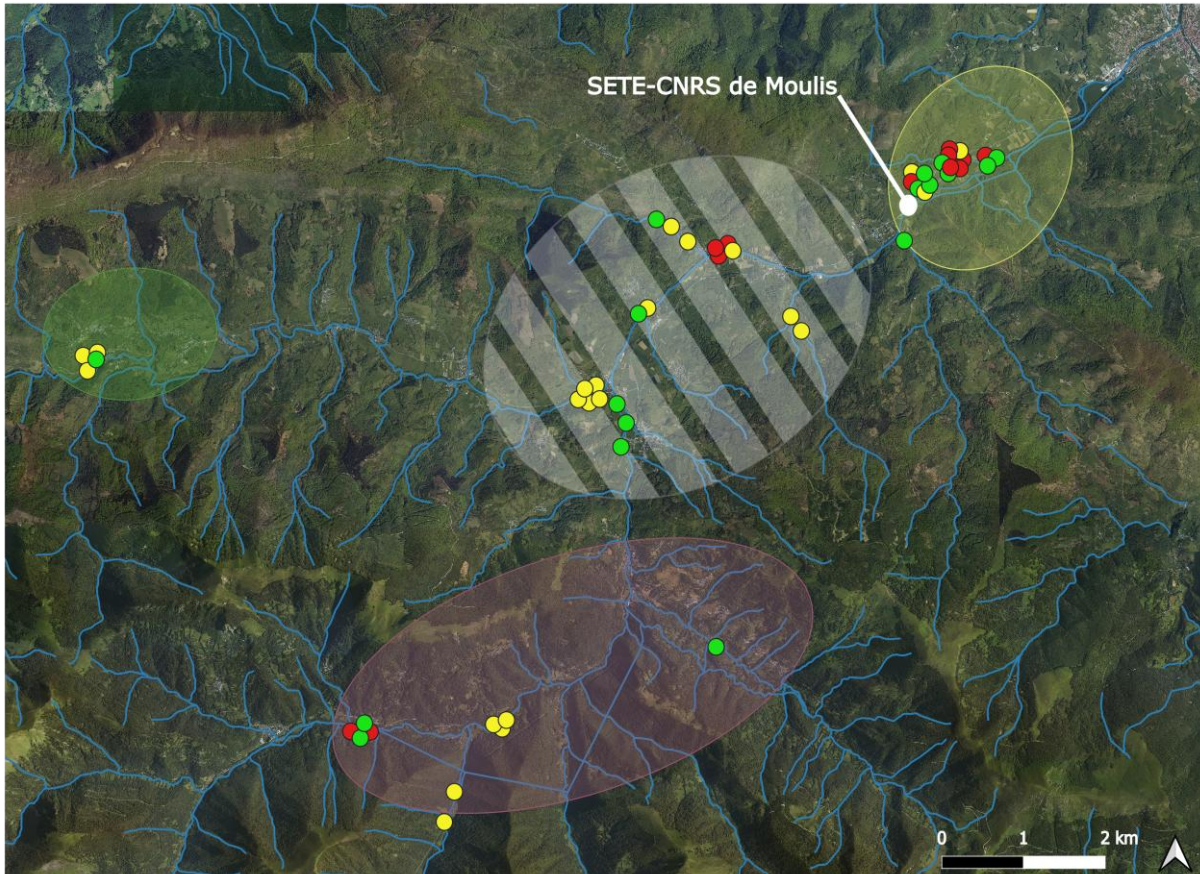


Figure 3 : Localisation des captures des femelles gestantes de Couleuvre vipérine dans la vallée du Lez et dans la vallée de la Bouigane. 12 individus ont été capturés en 2016 (cercles rouges), 17 individus ont été capturés en 2017 (cercles verts) et 22 individus ont été capturés en 2018 (cercles jaunes). Les ovides représentent, à titre indicatif, les différentes populations génétiques potentielles (cf. section 2.1.1, Figure 1).

A l'entrée dans l'élevage, les Couleuvres vipérines capturées ont suivi un traitement sanitaire, où les individus sont essuyés avec un tissu enduit de Frontline® pour éliminer les parasites externes comme les acariens. Le tissu n'est pas passé sur la tête des individus pour éviter toute inhalation, ce qui pourrait entraîner des problèmes neurologiques. Les femelles ont ensuite été placées pendant 72 heures dans des terrariums temporaires individuels (40 x 30 x 8 cm) contenant chacun un substrat en papier absorbant et une cachette en tuile. Les femelles ont été privées d'eau pendant 12 heures afin qu'elles n'évacuent pas le produit appliqué en se baignant. Suite à cette période de restriction d'eau, une coupelle d'eau, suffisamment grande pour qu'elles puissent s'immerger, a été placée dans chaque terrarium temporaire et l'eau était changée 3 à 4 fois par jour. Après ces 72 heures de

traitement, les femelles ont été placées individuellement dans leur terrarium final contenant un substrat en paillage de chanvre sec, une gamelle d'eau *ad libitum*, une cachette en tuile et une boîte de ponte (une boîte plastique opaque de 10 x 8 x 6 cm avec un couvercle et une entrée de 3 x 3 cm sur la façade) contenant un de la vermiculite humide (1 volume d'eau pour 5 volumes de vermiculite, un substrat minéral qui a la capacité de se maintenir humide sur plusieurs jours). La Couleuvre vipérine est une espèce diurne avec une tolérance thermique optimale allant de 22°C à 30°C (Vacher and Santos, 2010). Afin de fournir des conditions proches de celles du milieu naturel, les femelles ont été éclairées de 7 heures à 19 heures par des néons U.V. Le gradient thermique dans le terrarium était maintenu par une lampe chauffante de 42 Watts, fournissant une source de chaleur aux animaux avec un point chaud maximal à 32°C, et une salle climatisée à 20°C.

Les pontes se sont étalées de fin juin à fin juillet et les femelles de Couleuvre vipérine ont en moyenne pondu 11 œufs chacune ($\pm 4,7$ œufs). A la ponte, les œufs de chaque femelle ont été mirés, c'est-à-dire que la présence d'un embryon est observée par transparence de la coquille à l'aide d'une source lumineuse. Au total, 574 œufs ont été pondus et seulement 521 étaient viables. Ils ont ensuite été marqués individuellement à l'aide d'un crayon sans encre nocive, pesés (± 0.01 g) et distribués dans les différents traitements dans les 12 heures qui suivent la ponte (Figure 4). Les œufs ont été déposés dans une boîte plastique (20 cm x 15 cm x 5 cm) avec un fond de 2 cm de vermiculite humide (1 volume d'eau pour 5 volumes de vermiculite) puis placés dans un incubateur (ExoTerra Model PT-2445, Rolf C. Hagen Inc., USA) aux températures de traitement choisies pour les expériences, c'est-à-dire à 24°C, 28°C ou 32°C ou dans les conditions d'oxygène choisies pour les expériences, c'est-à-dire en normoxie à 436 m ASL : $PO_2 \sim 20.1$ kPa ou en hypoxie à 2877 m ASL : $PO_2 \sim 15.3$ kPa (Bouverot, 2012; Cordero et al., 2017a). Des bols d'eau placés dans chaque incubateur ont garanti une humidité ambiante de 100% tout au long de l'incubation.



Figure 4 : (A gauche) Œufs de Couleuvre vipérine fraîchement pondus, Moulis (09, France), le 28 juillet 2016. (A droite) Œufs de Couleuvre vipérine individuellement marqués et déposés sur un fond de vermiculite avant d'être placés dans un incubateur, Moulis (09, France), le 19 juillet 2018.

Chez les reptiles, la durée d'incubation est principalement dépendante de la température (Shine, 2004; Du and Ji, 2008; Noble et al., 2018). Durant cette thèse, l'ensemble des conditions d'incubation à entrainé des durées d'incubation allant de 30 à 72 jours, avec des éclosions s'étalant de début aout à fin septembre (sur les années 2016, 2017 et 2018). Au total, 468 juvéniles sont nés avec un succès d'éclosion moyen de 87,9%, avec un minimum de 68,2% et un maximum de 100%. A l'éclosion (Figure 5), les juvéniles ont été marqués individuellement (*cf. section 2.3.3*) et placés par date d'éclosion (par 6 individus maximum) dans des terrariums (15 cm x 10 cm x 5 cm) contenant un substrat en paillage de chanvre sec, une gamelle d'eau *ad libitum* et une cachette (Figure 4). Les terrariums ont ensuite été placés dans des incubateurs à 20°C. Cette température a été choisie car les juvéniles de Couleuvre vipérine maintenus à cette température ont montré des niveaux élevés de survie et de croissance (données non publiées).

Toutes les femelles ont été ramenées à leur site exact de capture dans les deux semaines qui ont suivi la ponte. Une fois les expériences terminées, les juvéniles de Couleuvre vipérine ont été nourris et relâchés au site de capture maternel (Figure 3).



Figure 5 : (A gauche) Eclosion en cours du juvénile de Couleuvre vipérine identifié E4, Pic du Midi de Bigorre (65, France), le 10 août 2017. (A droite) Juvéniles de Couleuvre vipérine dans leur terrarium, Pic du Midi de Bigorre (65, France), le 15 août 2017.

2.3.2. Mesure de la fréquence cardiaque des embryons

La fréquence cardiaque est un bon indicateur du taux métabolique et de la fonction cardiovasculaire chez les amniotes ectothermes (Crossley and Burggren, 2009). La fréquence cardiaque est fortement corrélée au taux de consommation d'oxygène des serpents et des lézards (Greenwald, 1971; Bennett, 1972; Butler et al., 2004; Du et al., 2010a; Kouyoumdjian et al., 2019). Pour mesurer la fréquence cardiaque embryonnaire des Couleuvres vipérines, nous utilisons un moniteur numérique d'œufs Buddy® (MK2, Avitronics, Cornwall, UK ; Figure 6) initialement développé pour mesurer la fréquence cardiaque des embryons d'oiseaux dans l'industrie avicole et ses applications de recherche (Lierz et al., 2006). Cependant, cet appareil s'est avéré tout à fait pertinent et fonctionnel pour mesurer les battements cardiaques des embryons dans les œufs des reptiles non aviens comme les lézards (Du et al., 2009, 2010a; c; Sartori et al., 2015; Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019), les tortues (Du et al., 2009, 2010b; c; McGlashan et al., 2012, 2015; Sartori et al., 2015) ou encore les serpents (Aubret, 2013a; Aubret et al., 2016a; b, 2017). Le système Buddy® projette un faisceau infrarouge sur la surface de l'œuf et détecte les minuscules distorsions de la coquille causées par les battements cardiaques embryonnaires (Du et al., 2009). Néanmoins, en fin d'incubation, il devient plus difficile de mesurer le rythme cardiaque des embryons. En effet, les autres impulsions comme les impulsions musculaires, également sous forme de vibrations externes, génèrent des signaux plus forts que les battements cardiaques de l'embryon ce qui ne permet pas au moniteur Buddy® de mesurer les battements cardiaques simultanés (Lierz et al., 2006).

Au moment des mesures des battements cardiaques, le moniteur Buddy® est placé dans un incubateur réglé à la température du traitement d'incubation des œufs. Puis chaque œuf est délicatement placé sur le coussin du capteur infrarouge pour la lecture de la fréquence cardiaque (une lecture stable est obtenue au bout d'environ 30 secondes ; Figure 6). Les œufs ne sont placés que brièvement (≤ 1 min) dans le moniteur Buddy® pour éviter une augmentation de la température de l'œufs due à l'exposition aux capteurs infrarouges (Sartori et al., 2015; Hulbert et al., 2017).

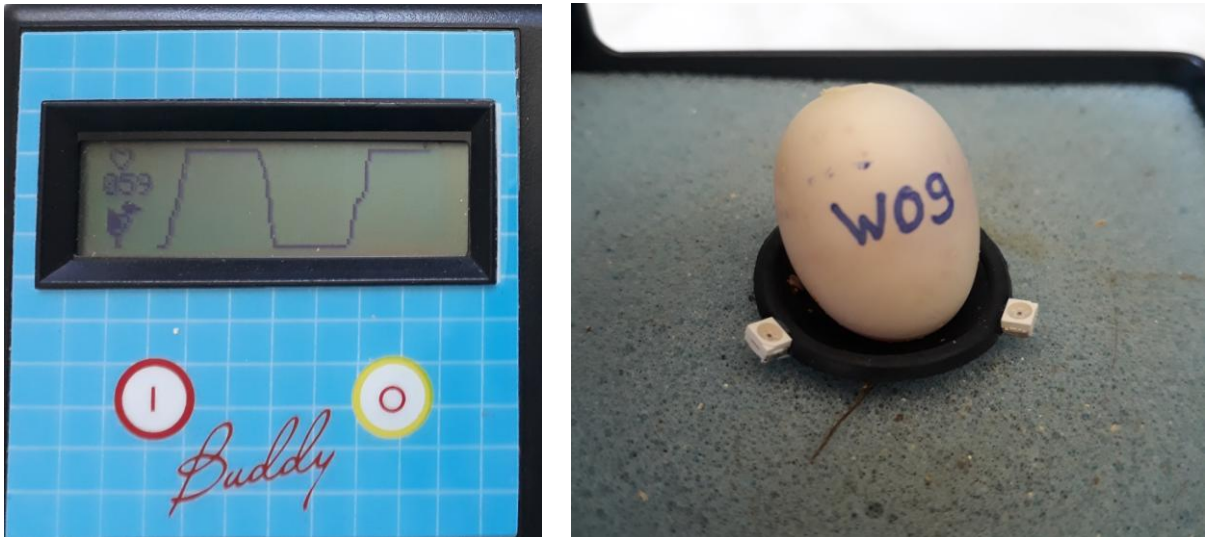


Figure 6 : (A gauche) Mesure du rythme cardiaque d'un embryon de Couleuvre vipérine sur l'écran du Buddy®, Pic du Midi de Bigorre (65, France), le 28 juillet 2017. (A droite) Œufs de Couleuvre vipérine, identifié W09, posé sur le coussin du capteur infrarouge du Buddy®, Pic du Midi de Bigorre (65, France), le 28 juillet 2017.

2.3.3. Mesures morphologiques et marquage des juvéniles

Dans les 24 heures suivant l'émergence, plusieurs mesures morphologiques ont été réalisées sur chaque juvénile. Ils ont tout d'abord été pesés à l'aide d'une balance numérique ($\pm 0,01$ g) puis la longueur du corps (du museau au cloaque), ainsi que la longueur totale (du museau à la pointe de la queue) ont été mesurées à l'aide d'un mètre ruban ($\pm 0,1$ mm). L'ensemble de ces mesures a été répété après chaque expérimentation. Cela nous permet, en plus de calculer la condition corporelle des individus, de mesurer leur taux de croissance. Toujours à l'éclosion, le reste des réserves lipidiques non utilisées pendant le développement embryonnaire a été pesé à l'aide d'une balance numérique ($\pm 0,01$ g). Les juvéniles ont également été sexés par éversion des hémipénis. Ils ont ensuite été individuellement marqués à l'aide d'un cautère basse température (Bovie®) selon la technique de marquage à chaud (Figure 7). Cette technique consiste à brûler de façon superficielle l'épiderme de certaines écailles ventrales et latérales du flan gauche de l'individu selon un code

préalablement défini (Figure 7). C'est une méthode non invasive, efficace et semi permanente chez les reptiles même après plusieurs mues (Winne et al., 2006).

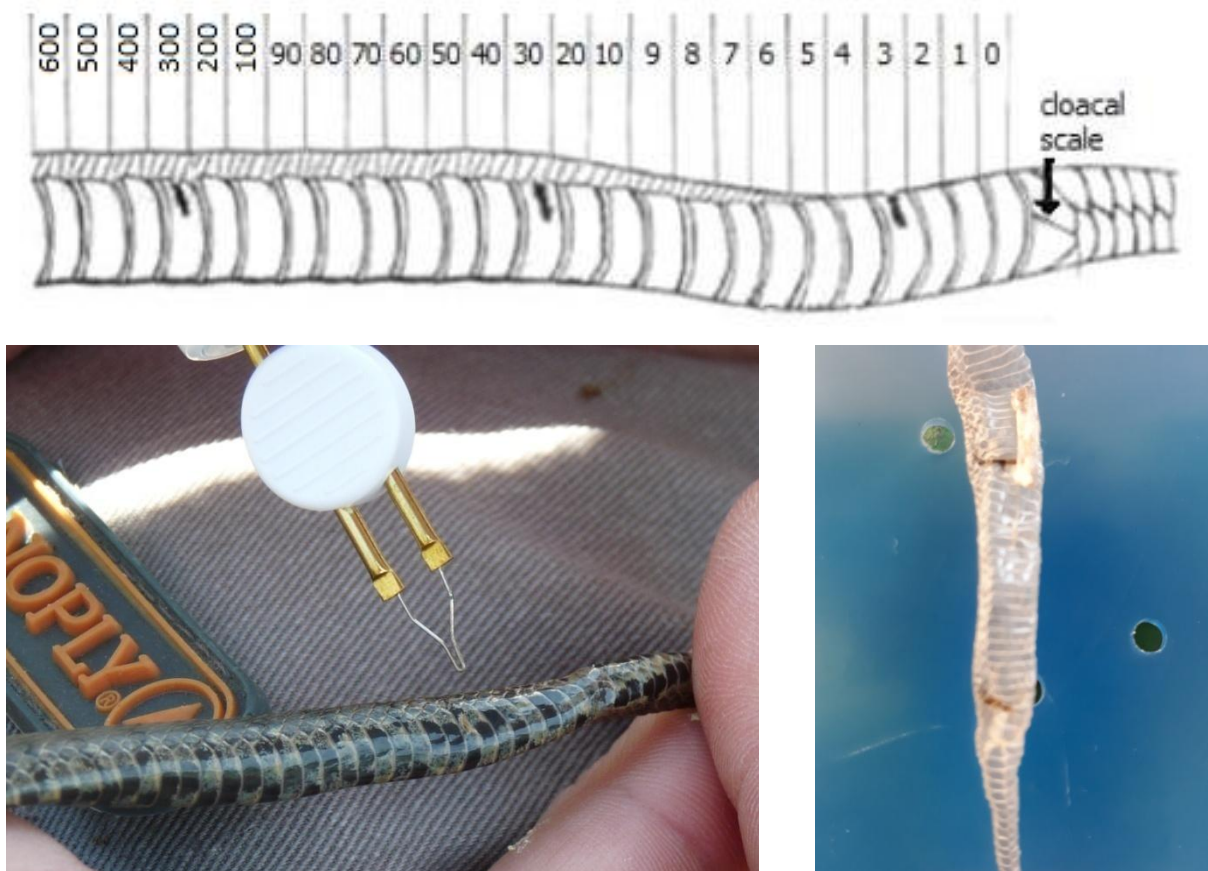


Figure 7 : (En haut) Représentation schématique du système de codage utilisé pour le marquage des juvéniles de Couleuvres vipérines. Ici selon le code, l'individu porte le numéro 333 (© anonyme). (En bas à gauche) Marquage d'un juvénile de Couleuvre vipérine à l'aide d'un cautère basse température, Alas, (09, France), le 30 mars 2017. (En bas à droite) Visualisation de la persistance du marquage sur la mue d'un juvénile de Couleuvre vipérine, Pic du Midi de Bigorre (65, France), le 24 aout 2017.

2.3.4. Mesures des performances physiques des juvéniles

Les performances maximales de vitesse de nage et d'apnée permettent d'évaluer la limitation potentielle due à l'hypoxie de l'organisme à atteindre ses capacités maximales. Les deux tests de performances ont été effectués à une température d'eau de 25°C, soit dans la gamme de températures optimales des performances de la Couleuvre vipérine, qui a un optimum thermique corporel d'environ 25°C à 30°C (Hailey and Davies, 1986a). A titre de comparaison, chez d'autres espèces comme la Couleuvre rayée, des vitesses maximales ont été enregistrées avec une température corporelle de 28°C (Stevenson et al., 1985).

La procédure utilisée pour estimer la performance de vitesse de nage a été validée pour les serpents dans d'autres études (Shine and Shetty, 2001; Aubret, 2004; Aubret et al., 2005) et adaptée pour les juvéniles de Couleuvre vipérine. Une caméra numérique grand angle à haute définition (25 *fps*, modèle Sony HDR-XR160E, Sony Corporation) a été installée au-dessus d'un bassin de natation linéaire de 100 cm x 20 cm x 20 cm et a enregistré les essais de chaque juvénile de Couleuvre vipérine (Figure 8). Le bassin de natation a été rempli avec 5 cm de hauteur d'eau maintenue à 25°C. A différent pas de temps en fonction des expériences, chaque juvénile de Couleuvre vipérine a nagé 10 longueurs consécutives. Si l'individu ne repartait pas, une simple touche de la queue avec le doigt de l'expérimentateur le faisait repartir. Les données brutes ont été extraites des fichiers vidéo et la vitesse de nage ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) a été mesurée pour chaque longueur avec le logiciel Tracker (Brown, 2019).



Figure 8 : Bassin de natation pour les mesures des performances de nage des juvéniles de Couleuvre vipérine, Moulis (09, France), le 17 août 2017.

La procédure utilisée pour estimer la performance d'apnée a été validée pour les Couleuvres vipérines dans une étude antérieure (Aubret et al., 2015). Un aquarium en verre (20 cm x 15 cm x 25 cm) a été rempli avec 20 cm de hauteur d'eau maintenue à 25°C. Chaque juvénile de Couleuvre vipérine a été placé dans un tube de PVC opaque de 10 cm de longueur et de 2 cm de diamètre, fermé à une extrémité et lesté pour assurer sa stabilité sous l'eau. L'ensemble a été totalement immergé dans l'eau et placé le long du bord en verre de l'aquarium. A chaque tentative de remontée du serpent, celui-ci était légèrement apeuré par le tapotement de la vitre par l'expérimentateur. Ce stimulus est répété jusqu'à ce que, malgré la pression exercée, le besoin de respirer l'emporte. Le test s'arrête à l'instant où le juvénile de Couleuvre vipérine arrive à la surface. Le temps écoulé entre l'immersion et le retour à la surface a été enregistré à l'aide de chronomètres numériques (± 1 s).

2.3.5. Mesures des taux métaboliques au repos des embryons et des juvéniles

Les taux métaboliques au repos des embryons et des juvéniles correspondent à leur consommation d'oxygène et à leur production de dioxyde de carbone. Un système de circuit fermé a été utilisé pour mesurer les échanges gazeux entre le milieu et les individus (Foxbox-C Field O₂ and CO₂ Analysis

System, Sable Systems, Inc., Las Vegas, NV, USA ; Figure 9). Les œufs et les juvéniles de Couleuvre vipérine ont été placés individuellement à l'intérieur d'une chambre métabolique de 250 ml, elle-même placée dans un incubateur (Figure 9). La température de l'incubateur correspond à la température du traitement d'incubation des œufs ou de la température de maintien des juvéniles. Une fois les équipements en place, de l'air extérieur était injecté dans la chambre métabolique pendant 10 min à un débit de $400 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Cette étape est indispensable et permet d'homogénéiser les niveaux de concentration en oxygène et dioxyde de carbone de l'air de la chambre métabolique avec celles du milieu extérieur qui sert de référentiel. Ensuite, les vannes ont été fermées pendant 60 min, scellant la chambre métabolique hermétiquement. Après cette heure, les vannes ont été ouvertes pour rétablir le flux d'air. L'air entrant à un débit de $400 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ provient du milieu extérieur et chasse l'air présent dans la chambre métabolique. Cet air chassé traverse un tube de Drierite afin d'enlever toutes traces d'humidité puis des capteurs mesurent les pourcentages de dioxygène et de dioxyde de carbone présent dans l'air. Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ExpeData (v.1.7.30, Sable Systems, Inc.) permettant de calculer le volume de dioxygène consommé et le volume de dioxyde de carbone produit par l'individu durant la période de 60 min où la chambre était scellée (Lighton, 2018).

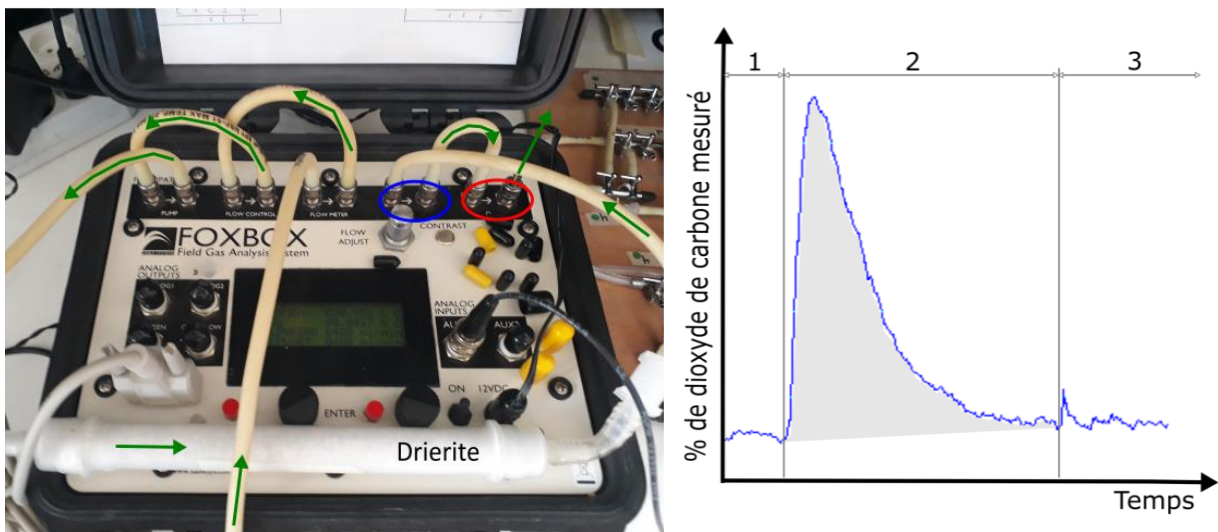
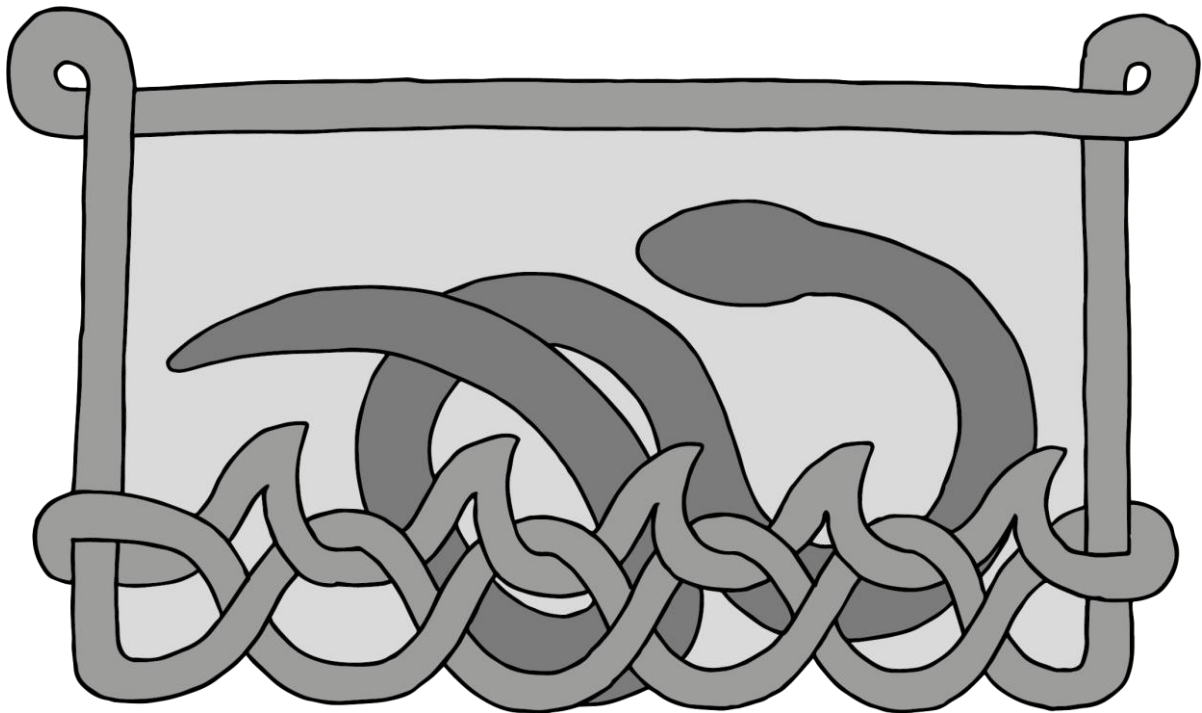


Figure 9 : (A gauche) Système de mesures des taux de concentration du dioxygène et du dioxyde de carbone (Foxbox-C Field O_2 and CO_2 Analysis System), Moulis (09, France), le 12 septembre 2018. Les flèches vertes indiquent le sens de circulation de l'air en provenance de la chambre métabolique, le cercle bleu représente l'emplacement du capteur de mesure du pourcentage de dioxyde de carbone et le cercle rouge représente l'emplacement du capteur de mesure du pourcentage de dioxygène. (A droite) Mesure du pourcentage de dioxyde de carbone (CO_2) présent dans l'air en fonction du temps. La partie 1 représente le pourcentage en CO_2 de l'air extérieur (ligne de base), la partie 2 représente le pourcentage en CO_2 de l'air extrait de la chambre métabolique après 60 minutes, la partie 3 représente le pourcentage en CO_2 de l'air passant par la chambre métabolique en circuit ouvert. L'aire en gris représente, après calcul sur le logiciel ExpeData, le volume de CO_2 produit par le juvénile de Couleuvre vipérine.

Chapitre 3.

EFFETS DE L'HYPOXIE D'ALTITUDE SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LES PERFORMANCES JUVÉNILES



3.1. Présentation et hypothèses du chapitre

Ce chapitre tente de mettre en évidence, dans un premier temps, les effets de l'hypoxie d'altitude sur le développement embryonnaire chez la Couleuvre vipérine. Pour s'affranchir des effets croisés de la température et de l'hypoxie, tout le développement s'effectue à la température optimale d'incubation (*i.e.* 28°C). L'objectif est de déterminer si les embryons de Couleuvre vipérine sont capables, à travers la plasticité phénotypique, de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales. Dans un second temps, ce chapitre s'intéresse aux performances physiques des juvéniles à leur température optimale de performance (*i.e.* 25°C). Pour cela, la première étape consiste à mesurer la vitesse de nage et la durée d'apnée des individus en condition hypoxique puis de les comparer au groupe témoin, incubé et testé en condition de normoxie. L'objectif est de savoir si les juvéniles incubés et testés en hypoxie peuvent maintenir des performances équivalentes à celles du groupe témoin. Puis pour la seconde étape de test les groupes sont transférés d'une condition à l'autre. Le but est de savoir si les performances des juvéniles sont modifiées avec un retour à un niveau d'oxygène normal, mais aussi de connaître les effets d'une hypoxie aiguë sur les performances physiques des individus incubés et nés en basse altitude. Dans ce contexte, nous prédisons qu'en condition hypoxique et à une température optimale de développement ou de performance :

- La fréquence cardiaque des embryons (*i.e.* un proxy du métabolisme *cf.* section 2.3.2) sera diminuée entraînant une réduction du métabolisme.
- La durée de développement ne sera pas impactée.
- La réduction du métabolisme durant le développement va modifier le phénotype à l'éclosion avec des juvéniles plus petits qui auront des taux de croissance plus faible.
- Les performances des juvéniles seront réduites.
- Après avoir été transférés en basse altitude, les performances des juvéniles seront améliorées alors que pour les juvéniles incubés en normoxie puis transférés en haute altitude les performances seront réduites.

L'article présenté dans ce chapitre à été publié le 10 juillet 2020 dans ***Integrative Zoology*** :

Souchet J, Gangloff EJ, Micheli G, Bossu C, Trochet A, Bertrand R, Clobert J, Calvez O, Martinez-Sylvestre A, Darnet E, Le Chevalier H, Guillaume O, Mossoll-Torres M, Barthe L, Pottier G, Philippe H & Aubret F. 2020. *High-altitude hypoxia impacts perinatal physiology and performance in a potential montane colonizer*. Integr Zool. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12468>

3.2. Résumé

Les changements climatiques entraînent des modifications dans l'aire de répartition de nombreux organismes, notamment le long de gradients altitudinaux dans les écosystèmes montagnards. Cependant, le fait de monter en altitude expose les organismes à une plus faible disponibilité de l'oxygène, ce qui peut réduire le succès de reproduction et le développement des organismes ovipares. Pour tester cette possibilité chez une espèce colonisatrice du milieu montagnard, nous avons incubé artificiellement des embryons de Couleuvre vipérine, *Natrix maura*, en utilisant un plan expérimental où chaque ponte est séparée en deux traitements. Un groupe est incubé dans des conditions d'hypoxie (extrême haute altitude; 2877 m au-dessus du niveau de la mer ; disponibilité d'O₂ équivalente à 72 % de celle du niveau de la mer). L'autre groupe est incubé en normoxie (groupe témoin ; basse altitude ; 436 m au-dessus du niveau de la mer). Le succès de l'éclosion n'a pas varié entre les deux traitements. Les embryons qui se développaient en extrême haute altitude avaient un rythme cardiaque plus élevé en moyenne et les juvéniles ont éclos plus tôt, étaient plus petits à l'éclosion et nageaient plus lentement que ceux incubés en basse altitude. La transplantation réciproque des juvéniles dix jours après l'éclosion a en outre montré que les serpents qui se sont développés en altitude, une fois transférés de nouveau en basse altitude, n'ont pas retrouvé la pleine performance de nage montrée par les serpents incubés et testés à basse altitude. Ces résultats suggèrent que l'hypoxie de haute altitude n'empêchera pas les organismes ectothermes ovipares de produire des petits viables, mais elle peut poser des défis physiologiques importants pour le développement de la progéniture. Ces limitations de performance au début de la vie imposées par l'hypoxie pourraient avoir des conséquences négatives sur les phénotypes adultes, y compris sur les traits liés à la condition physique.

Mots clés : *Métabolisme embryonnaire; Plasticité développementale; Natrix maura; Hypoxie d'altitude; Performances locomotrices*

High-elevation hypoxia impacts perinatal physiology and performance in a potential montane colonizer

Short running title: Snake development in hypoxia

<https://doi.org/10.1111/1749-4877.12468>

Jérémy Souchet^{1,†}, Eric J. Gangloff^{1,2}, Gaëlle Micheli¹, Coralie Bossu¹, Audrey Trochet¹, Romain Bertrand¹, Jean Clobert¹, Olivier Calvez¹, Albert Martinez-Silvestre³, Elodie Darnet¹, Hugo Le Chevalier¹, Olivier Guillaume¹, Marc Mossoll-Torres^{4,5}, Laurent Barthe⁶, Gilles Pottier⁶, Hervé Philippe^{1,7} & Fabien Aubret¹

1- Station d'Ecologie Théorique et Expérimentale du Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5321 CNRS – Université Paul Sabatier, 09200 Moulis, France.

2- Department of Zoology, Ohio Wesleyan University, Delaware, Ohio, USA

3- Catalonia Reptile and Amphibian Rescue Center (CRARC), 08783 Masquefa, Barcelona, Spain

4- Bomosa, Pl. Parc de la Mola, 10 Torre Caldea 7^o, AD700 Les Escaldes, Andorra

5- Pirenalía, c/ de la rectoria, 2 Casa Cintet, AD200 Encamp, Andorra

6- Nature En Occitanie, 14 rue de Tivoli, 31 000 Toulouse, France

7- Département de Biochimie, Centre Robert-Cedergren, Université de Montréal, Montréal, Canada

† Corresponding author. E-mail: jeremie.souchet@gmail.com

Author Contributions

JS and FA contributed to experimental design and logistics. JS, GM, CB and FA conducted experiments. JS, EJG and FA conducted statistical analyses. JS, EJG, FA, AT, RB, JC, OC, OG, AMS, ED, HLC, MMT, LB, GP and HP drafted the manuscript. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

3.3. Introduction

Climate envelopes are typically much narrower across altitudinal than latitudinal gradients (Loarie et al., 2009; Chen et al., 2011), fostering rapid migration along the elevational gradient as the climate warms (*e.g.* Bässler et al., 2013; Freeman et al., 2018; Parmesan and Yohe, 2003; Pauchard et al., 2016; Walther et al., 2002). While lower-elevation valleys may have provided refuge to many organisms during past glaciation events (Hewitt, 1999; Tzedakis, 2004), elevated areas may play a similar role for escaping global warming (Sinervo et al., 2018). As high-elevation environments may represent climate refugia, it is important to identify constraints on upslope colonization. While it is well established that warming may promote range expansion towards higher altitudes, organismal function may be affected by the decrease in the oxygen partial pressure (for instance, oxygen availability is 25% lower at 2500 m above sea level [ASL] compared to sea level; Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010). Yet, there are many unanswered questions regarding the effects of high elevation hypoxia on the ability of ectothermic vertebrates to colonize and adapt to these elevations.

The acute and chronic effects of high-altitude hypoxia on organismal function seem to vary widely among taxa. Well documented in birds and mammals (Beall et al., 2002; Lague et al., 2016; Monge and Leon-Velarde, 1991; Storz et al., 2004), the acute effects of hypoxia commonly include hyperventilation, tachycardia, altitude sickness, and the down-regulation of non-essential physiological functions (such as digestion). These studies also demonstrate that chronic effects range from an alteration of cardiorespiratory pathways (increased lung and heart size, increased blood pressure), blood composition (increased haematocrit, increased haemoglobin concentration), and muscle performance (increased vascularization, increased amount of myoglobin and mitochondria) to effects on embryonic development, birth size, and early growth rates (Beall et al., 2002; Lague et al., 2016; Monge and Leon-Velarde, 1991; Storz et al., 2004). The consequences of high-altitude hypoxia, induced by elevation, are less well known in reptiles. However, we can surmise that they might be similar to the consequences of high-altitude hypoxia in birds and mammals or to underwater or underground hypoxia in reptiles. For instance, even short exposures to hypoxia can have lasting effects on subsequent growth and development of turtle embryos, including reduced mass at hatching, decreased oxygen consumption, and depressed metabolism, despite a comparable incubation period (Cordero et al., 2017a; Kam, 1993). Incubation in hypoxic conditions is known to reduce embryo heart rates (in lizards: Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019), produce smaller juveniles with decreased growth rate during the first months of life (in alligators: Owerkowicz et al., 2009; in turtles: (Wearing et al., 2015), and increase heart and lung size at birth (in alligators: Owerkowicz et al., 2009, and lizards: Cordero et al., 2017a). Chronic hypoxia specifically elicits

changes in the cardio-respiratory pathways (increases lung and heart size, higher blood pressure; Cordero et al., 2017a; Crossley and Altimiras, 2005; lungman and Piña, 2013; Wearing et al., 2015); increases haematocrit and haemoglobin concentration (Gangloff et al., 2019; González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015; Newlin and Ballinger, 1976; Vinegar and Hillyard, 1972; Weathers and White, 1972); and alters muscle physiology (increases vascularisation and myoglobin concentration; Jochmans-Lemoine and Joseph, 2018). Although many of the physiological and anatomical changes that accumulate under chronic hypoxia improve function under low O₂ partial pressure (PO₂; *i.e.*, individuals show acclimation), these changes may only partially compensate for reduced oxygen availability. For example, low weights at birth and reduced growth in juveniles have been reported in a variety of vertebrate taxa, from humans (Monge and Leon-Velarde, 1991) to turtles (Wearing et al., 2015). Rats and mice showed delayed brain growth due to long-term exposure to hypoxia (Golan and Huleihel, 2006), cognitive effects which may be true in reptiles as well (Sun et al., 2014).

Predicting if and how animals will adapt to high altitude under global warming requires a detailed study of physiological, morphological and behavioural responses to hypoxia across an altitudinal gradient in a species that undergoes upward range expansion. This knowledge is incomplete, particularly in snakes. The successful colonisation of higher elevations in animals escaping warming temperatures depends on their ability to cope with lower partial pressure in oxygen so that they can (1) move, acquire food, mate and escape predators and (2) produce eggs (embryos) able to develop, hatch, and survive. Here we focused on the latter as effective colonization (*i.e.*, all former steps) depends on successful recruitment of offspring (Warner et al., 2012; Aubret, 2013a; While et al., 2015). To identify physiological, morphological, and behavioral alterations associated with altitude-induced hypoxia, we performed an elevation transplant experiment utilizing a generally low-elevation ectothermic species. In our experiment, we exposed eggs of the viperine snake, (*Natrix maura*, Linnaeus 1758; Colubridae), to two alternative incubation treatments: extreme high elevation (EHE, above current range limits, *i.e.* hypoxia) and low elevation (LE, native elevation, *i.e.* normoxia).

The viperine snake is a circum-mediterranean species that has been colonizing mountainous and lowland environments alternately in conjunction with historical warming and cooling cycles (Gómez and Lunt, 2007). The Iberian Peninsula provided a glacial refuge during the Pleistocene and allowed the viperine snake to re-colonize the Pyrenees and Western Europe from 12,000 years ago onwards during the Holocene (Guicking et al., 2008). This aquatic species (Vacher and Geniez, 2010) has been recorded up to 1000 m ASL in France (Aubret et al., 2015) and 1500 m ASL in Spain (Martinez-Rica and Reiné-Viñales, 1988; Santos, 2015). We collected gravid females from low elevation (475 m ± 43 m ASL) and, using a split-clutch design, incubated the eggs at low elevation (normoxia, 95% O₂

availability compared to sea level equivalent) or at extreme high elevation (hypoxia, 72% O₂ availability compared to sea level equivalent). We monitored embryo physiology (heart rates; an indicator of cardiovascular output and a proxy for metabolism in ectothermic amniotes; Crossley and Burggren, 2009) and egg mass throughout the incubation. We then measured important aspects of hatchling phenotype (body mass and body size) and two aspects of fitness-related performance (sprint swimming speed and apnea duration) of the juveniles (Aubret et al., 2015). Finally, we tested whether expected deleterious effects of incubation at extreme high elevation would persist after hatchlings are returned to low elevation, which would indicate that changes in physiology and performance are due to remodeling of related pathways beyond the immediate restrictions of oxygen reduction.

3.4. Materials and methods

3.4.1. *Experimental design*

We captured 12 gravid female viperine snakes along the banks of the Lez River (Department of Ariège, France) between June and July 2016. Capture sites spanned from 432 m to 518 m ASL. A total of 113 eggs were obtained between 8 July 2016 and 28 July 2016 (mean clutch size \pm SD = 9.4 ± 4.3 eggs). All females were returned to their exact site of capture within two weeks of egg-laying. 23 eggs were infertile or died within the first 7 days post-oviposition, leaving 90 eggs from 11 females allocated to two treatments for experiments (Figure 1): low elevation (LE) and extreme high elevation (EHE). The LE treatment was located at the Theoretical and Experimental Ecology Station of Moulis, National Center for Scientific Research (SETE-CNRS; 42.958394 N, 1.086440 E; 436 m ASL; PO₂ \sim 20.1 kPa) and the EHE treatment was located at the Observatory Midi-Pyrénées of the Pic du Midi de Bigorre (42.936389 N, 0.142472 E; 2877 m ASL; PO₂ \sim 15.3 kPa). This difference in elevation results in a decrease in atmospheric pressure, with associated reduction in the partial pressure of gases, including oxygen, carbon dioxide, and water vapor (Millet and Debevec, 2020; Richalet, 2020). Most relevant to our hypotheses is the 25% reduction in oxygen availability at the Pic du Midi de Bigorre lab in comparison to sea level (Bouverot, 2012; Cordero et al., 2017a).

Eggs were weighed using a digital scale to the nearest 0.01 g within 12 hours of oviposition, individually marked for identification with a pencil, and allocated to LE and EHE treatments using a split-clutch design within 24 hours of oviposition. Because egg mass influences both embryo metabolism and hatching phenotype (Nelson et al., 2004; Aubret, 2013a), and egg mass varied

among clutches (Kruskal-Wallis test: $H = 61.97$, $Df = 10$, $P < 0.001$), eggs were ranked within each clutch from lightest to heaviest and alternately assigned to treatments in order to ensure no difference in egg mass between treatments (Kruskal-Wallis test: $H = 0.082$, $Df = 1$, $P = 0.774$). LE and EHE treatment half clutches were placed in a plastic container (20 cm x 15 cm x 5 cm) on a 2 cm layer of wet vermiculite (1:5 water to vermiculite by volume) and incubated in two identical incubation chambers (ExoTerra Model PT-2445, Rolf C. Hagen Inc., USA) set at a constant 28°C, a temperature successfully used for artificially incubating eggs of the viperine snake (Aubret, 2013a; Aubret et al., 2016a, 2017). Water bowls placed within each incubator ensured ambient humidity remained at 100% throughout incubation.

Out of 90 eggs, 65 embryos from ten females successfully hatched (72.2% hatching success rate) while 25 died at various stages during incubation. Another five neonates died shortly after hatching. We measured morphology (see below) and performance (see below) first on all 60 hatchlings at their altitude of incubation (LE or EHE). Nine days post-hatching (after all yolk was assimilated: Ji et al., 1999) hatchlings were tested for swimming performance and at 10 days for apnea performance (see below). At 13 days post-hatching, LE treatment hatchlings were transferred to EHE while hatchlings from the EHE treatment were brought down to LE. After a 24-hour acclimation period, snakes were tested for swimming and apnea performance at age 15 days and 16 days (Figure 1). Water temperature was 25°C for both performance measures because it is within the range of optimal temperature for swimming speed in this species (Aubret et al., 2015; Hailey and Davies, 1986b). Once tests were completed, young snakes were fed and released at the maternal capture site.

3.4.2. Egg mass and heart rate measurements

We weighed each egg using a digital scale (to the nearest 0.01 g) within 12 hours of oviposition, and then every 7 days until hatching (Figure 1; test 1). Embryo heart rates were first measured at 7 days post-oviposition and then every 7 days until hatching (Figure 1; test 1). To measure embryo heart rates, we used the Buddy digital egg monitor (MK2, Avitronics, Cornwall, UK) under the standardized protocol described for eggs. We conducted the measures at the same temperature as incubation (28°C). Each egg was gently placed on the sensor pad for heart rate reading (a stable reading was obtained after approximately 30 seconds) and then returned to its clutch. All eggs were only briefly (≤ 1 min) placed in the digital egg monitor to mitigate potential temperature changes owing to exposure to infrared sensors (Sartori et al., 2015; Hulbert et al., 2017). While embryonic heart rates are correlated with rates of oxygen consumption in snake and lizard embryos (Souchet J. and Gangloff E. J., unpubl. data; Kouyoumdjian et al., 2019), we note that change in heart rate is but one

of several physiological mechanisms important for the maintenance of energy flux (Sartori et al., 2017).

3.4.3. Hatchling measurements

Hatching occurred between 20 August 2016 and 8 September 2016 and hatchlings were individually marked for identification by the hot branding technique on the ventral scales (Winne et al., 2006) within 24 hours of emergence. Hatchlings were weighed using a digital scale (to the nearest 0.01 g), measured for snout-vent length (SVL) using a measuring tape (to the nearest 0.1 mm), and sexed via hemipene eversion (Figure 1; test 2). While sex is genetically determined in snakes and so we did not expect an effect of treatment on sex determination, we tested for differential effects of treatments between the sexes in developing embryos which could result in skewed hatchling sex ratio. We also weighed the yolk leftover in the eggshell (residual egg yolk) using a digital scale (to the nearest 0.01 g). Juveniles were housed together by hatching date in plastic containers (15 cm x 10 cm x 5 cm) with a water dish, shelter, and paper towel as a substrate in incubation chambers (ExoTerra Model PT-2445, Rolf C. Hagen Inc.) set at constant 20°C. While below the optimum temperature for performance, this temperature was chosen because it provides high levels of survival and growth for juveniles of this species (J.S., unpublished personal data). Juveniles were measured again at 9 days post-hatching for SVL and body mass prior to performance testing. We also calculated body condition as the residual of the \log_{10} -mass on \log_{10} -SVL linear regression at hatching day and at 9 days post-hatching.

3.4.4. Swimming performance

For this test, we were interested in measuring the maximal sprint swimming speed to evaluate the potential limitation of hypoxia on this ecologically-relevant performance. To estimate sprint swimming performance, we used a procedure that has been validated for snakes (Aubret, 2004; Aubret et al., 2005; Shine and Shetty, 2001), modified for juvenile viperine snakes. A high-definition wide-angle digital camera (25 fps, Sony Model HDR-XR160E, Sony Corporation) was fitted above a linear 100 cm x 20 cm x 20 cm swimming track and used to record swimming trials (Figure 1; test 3). The tank was filled to a depth of 5 cm with water maintained at 25°C using aquarium heaters. Each snake swam ten consecutive lengths. Raw data were extracted from video files with the software Tracker (Brown, 2019). The fastest performance over 10 cm from all trials (sprint swimming speed) was utilized for swimming analysis.

3.4.5. Apnea performance

To test for maximum voluntary breath-holding (Figure 1; test 4), we used the procedure described in Aubret et al. (2015). Briefly, a glass aquarium (25 cm x 15 cm x 20 cm) was filled with 20 cm of water maintained at 25°C. Up to four snakes were tested simultaneously. Snakes were presented to the open end of a tube (opaque PVC tubes 10 cm in length and 2 cm in diameter, closed at one end and ballasted to ensure stability under water). As soon as the snake voluntarily entered the tube, the unit was fully immersed in the water and tilted upward to make sure no air bubbles remained trapped. The tubes were then oriented towards the side of the aquarium, facing the observer, with the tube opening in direct contact with the glass. This allowed the observer to monitor the movement of the snakes inside the tube. When snakes made contact between their snout and the glass, the observer gently knocked the glass with the tip of a finger to scare them back down into the tube. This stimulus, repeated as long as necessary, encouraged the animal to prolong the duration of its time in the safety of the tube, presumably until its need to breathe overcame the perceived risk of predation imposed by the observer. At this point, the juvenile pushed against the glass with its snout and moved the tube away from the glass, allowing the snake to exit. The time taken from immersion to surface was recorded with digital chronometers (± 1 s).

3.4.6. Data analysis

We first assessed the influence of LE and EHE treatments and time on two measures of embryo development (test 1): egg mass and heart rate. We used linear mixed-effect models, including as main effects treatment (LE or EHE), age at measurement (in days after hatching, treated as a categorical effect), and their interaction. Then we assessed the influence of both treatments on ten measures of hatchling phenotypes (test 2): survival to hatching, sex ratio, incubation time, residual egg yolk, body mass at 1 day and 9 days post-hatching, body size (SVL) at 1 day and 9 days post-hatching, and body condition at 1 day and 9 days post-hatching. For survival to hatching and sex ratio, we used generalized linear mixed models and for the eight other tests we used linear mixed-effect models, including in all models the main effects of treatment. We also assessed the influence of treatment on the two measures of performance: sprint swimming speed (test 3) and apnea time (test 4). We used linear mixed-effect models, including the main effects of treatment (LE or EHE), the location of the test (low elevation or extreme high elevation), sex (male or female), and the covariates of body size (SVL) for swimming performance or body mass for apnea performance.

To meet assumptions of normal distribution of residuals, we square root transformed egg mass and apnea time. To account for the non-independence of siblings we included the clutch of origin as a random effect in all models. In models for which we measured individuals repeatedly (egg mass, heart rates, sprint swimming speed, and apnea time), we also included individual as a random effect. We used type III sums of squares to assess the significance of main effects, incorporating a Kenward-Roger denominator degree of freedom approximation (Kenward and Roger, 1997). All analyses were conducted with the lme4 package (Bates et al., 2014) and figures were made with the ggplot2 package (Wickham, 2016) in the programming language R 3.4.3 (R Development Core Team, 2017).

3.5. Results

3.5.1. *Egg mass variation and embryonic heart rates*

Elevation treatments significantly altered egg mass trajectories (Table 1, Figure 2A). Eggs incubated at LE maintained higher mass across the incubation period compared to eggs incubated at EHE. Further, the drop in egg mass prior to hatching was sharper in the LE treatment (-8.69% mass change between 28 days and 35 days) compared to eggs in the EHE treatment (-6.34% mass change between 28 days and 35 days; Figure 2A). Eggs incubated at LE gained mass until 28 days before decreasing, while eggs incubated at EHE maintained their initial mass until 21 days before decreasing (Table 1). Nevertheless, the eggs from EHE lost more mass between oviposition and hatching compared with eggs from LE (mass loss of -7.69% and -2.38%, respectively). Heart rates from both incubation treatments followed a similar trend across the incubation period (Figure 2B). Heart rates decreased throughout incubation but remained consistently and significantly higher in embryos incubated at EHE (Table 1).

3.5.2. *Hatching success and morphological measurements*

Hatching success (test 2) did not differ significantly between embryos incubated at LE versus EHE (68.2% versus 76.1% success respectively; $\chi^2 = 2.31$, Df = 1, P = 0.128). Hatchling sex ratio did not differ significantly between embryos incubated at LE versus EHE (50% versus 62.9% females respectively; $\chi^2 = 1.11$, Df = 1, P = 0.293). Embryos incubated at LE had on average a longer incubation time (by 2%) compared to embryos incubated at EHE (Table 2). LE eggs also produced heavier hatchlings (by 9%; Table 2), although hatchlings did not differ in length or body condition (Table 2). LE embryos assimilated more yolk than embryos incubated at EHE (*i.e.* had 44% less

residual yolk; Table 2). At 9 days post-hatching, juveniles from embryos incubated at LE were significantly longer (by 3%; Table 2) than juveniles incubated at EHE. On the other hand, body mass and body condition at 9 days did not differ between treatments (Table 2).

3.5.3. *Effects of incubation and translocation on swimming performance of juveniles*

All snakes showed higher sprint swimming speed (test 3) at LE rather than EHE (Table 3, Figure 3A). The swimming speed of snakes incubated at EHE increased after being translocated to LE (5% faster) while the swimming speed of snakes incubated at LE decreased after translocation to EHE (13% slower). This is demonstrated by the significant interaction of incubation treatment and test location (Table 3): snakes incubated at LE exhibited higher performance at LE, but groups did not differ at EHE. As expected based on other studies of snake swimming speed (Shine and Shetty, 2001), longer snakes swam faster than smaller snakes (Table 3).

3.5.4. *Effects of incubation and translocation on apnea performance of juveniles*

There was no effect of treatment on apnea performance (test 4), while snakes for both groups showed higher apnea performance at LE rather than EHE (15% longer; Table 3, Figure 3B). Additionally, body mass influenced apnea performance, with lighter snakes holding their breath for longer durations (Table 3).

3.6. Discussion

Our study is intended to quantify the restrictions imposed by transplantation to extreme high elevation and the potential limits of organismal responses to these constraints, relevant in the current context of global warming. We explored the way egg incubation and hatching success (primary components of successful population establishment during colonization processes) were affected by extreme high elevation (*i.e.*, hypoxia) compared to control eggs (incubated at low elevation) in the viperine snake. Although the EHE treatment did not significantly alter hatching success, it generated significant differences in egg development and affected hatchling phenotypes, including performance decrements that persisted after translocation back to the native elevation.

3.6.1. *Embryo development and hatchling measurements*

Typical physiological adjustments to hypoxia in other taxa include suppressed embryo metabolism, often measured as reduced heart rate (Cordero et al., 2017a, 2017b; Crossley and Altimiras, 2005; Crossley and Burggren, 2009; Du et al., 2011; Kouyoumdjian et al., 2019; Laughlin, 1978; Monge and Leon-Velarde, 1991). However, heart rates of developing viperine snake embryos exhibited the opposite trend: their heart rates increased at EHE (Figure 2B). This is a puzzling result and a physiological response that is opposite to what is observed in other taxa (see above references). Further, while eggs incubated at LE tended to gain mass during incubation, eggs incubated at EHE maintained their mass over the same period (Figure 2A), suggesting a low efficiency of water or carbon dioxide diffusion (Cunningham and Hurwitz, 1936). Excessive water loss in snake eggs may gradually increase yolk viscosity and impede absorption by the developing embryo (Aubret et al., 2005; Cunningham and Hurwitz, 1936). Eggs exposed to EHE, by losing excessive water, may have exposed the embryo to a similar constraint, leading to lesser yolk intake (and higher amounts of residual yolk post-hatching) and consequently smaller body size at hatching (Table 2). These results collectively suggest that either higher metabolic rates (*i.e.*, heart rates), excessive water loss (rendering the yolk hard to assimilate), or a combination of both, generated early hatching at EHE (Spencer et al., 2001; Du et al., 2009) compared to sibling eggs incubated at LE. Further investigations will also be needed to ascertain whether higher heart rates in EHE embryos resulted from exposure to hypoxia (a counter-intuitive finding, see references above) or from excessive water loss causing physiological stress to the embryos.

Because the difference in incubation time was minimal between the two treatment groups (*i.e.*, < 24 h; Table 2), one could question the biological relevance of this effect on hatching fitness and long term survival prospects. While further investigations are needed to address this question, there is evidence that incubation times (at 28°C) are heavily constrained in the viperine snake (*i.e.*, always remain within a 24-hour boundary, irrespective of experimental treatments; Aubret et al., 2017, 2016a, 2016b) and early hatching may entail deleterious effects. For example, early hatched Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*) take 1–2 h longer to stand than normal chicks (Vince and Chinn, 1971), while early hatched turtles (*Chrysemys picta*) showed reduced neuromuscular function for at least 9 months after hatching (Colbert et al., 2010). Nevertheless, in areas where growing seasons are short (such as at high elevation), hatching early can be advantageous to respond to temporal constraints on food acquisition (Edge et al. 2017). In our study, however, early hatching is combined with a lesser ability to absorb egg yolk, smaller body size at hatching, poorer body condition at hatching and slower growth rates (Table 2). These results are

consistent with metabolic compensation, a physiological mechanism whereby stressful incubation conditions generate faster paces of development (McGlashan et al., 2012; McGlashan et al., 2015; Aubret et al., 2016b). Further, or alternatively, low partial pressure of O₂ at high altitude (> 2000 m ASL) is known to render embryonic development challenging, due to aerobic energetic restrictions in converting egg energy (yolk) into tissue (Bouverot, 1985; León-Velarde and Monge, 2004; Monge and Leon-Velarde, 1991; Noble, 1991; Rahn et al., 1977; Vleck and Hoyt, 1991; Vleck and Vleck, 1996; Wangenstein et al., 1974). Importantly, change in heart rate is one of many possible compensatory physiological mechanisms to accommodate abiotic limitations and may, in itself, not represent increased metabolism (Sartori et al., 2017). Whether or not metabolic compensation or a comparable physiological mechanism operated in embryos incubated at EHE remains unclear at this stage and will warrant future investigation. Importantly though, EHE did not prevent eggs from developing and hatching altogether, as hatching success did not differ between the two treatments groups (LE: 68.2% versus EHE: 76.1%; see Results). Nevertheless, EHE altered body size in neonate snakes as well as post-hatching growth rates, both important fitness proxies in squamates (Gangloff et al., 2018; Kissner and Weatherhead, 2005; Mayer et al., 2016). However, the long-term adaptive potential for observed changes in development and physiology has yet to be tested.

3.6.2. *Swimming and apnea performance*

Our results show that EHE significantly affected hatchling swimming performance, but not apnea performance. This difference persisted even after translocation to low elevation, suggesting a genuine long-term change of physiological and performance capacity. EHE juveniles, when transferred back to LE, did not recover full performance compared to their siblings from the LE treatment. Further, juveniles incubated at EHE did not perform better than the LE siblings when tested at EHE (Figure 3A). These findings suggest that (1) snakes' physiology was impaired during development (muscle function, locomotion, or cardiorespiratory capacity) beyond a simple reduction of body size at birth and that (2) physiology and body size were affected in a way that did not enhance organismal function in hypoxic conditions. As a result, such morphological and physiological shifts are likely a mechanistic consequence of development in hypoxic conditions, considered developmental constraints rather than an acclimation effect and thus non adaptive (Bennett, 1997; Forsman, 2015).

3.6.3. General conclusion

It should be kept in mind that our experiment did not aim at mimicking a biologically relevant situation: these organisms are unlikely to climb over 2500 m (*i.e.*, the distance separating origin populations from the extreme high elevation treatment) along the altitudinal gradient to breed. Any range shift driven by climate change is likely to be gradual, potentially allowing for animals to adjust their physiology and behavior by means of phenotypic plasticity and natural selection acting on advantageous genetic variants (mixed selection on plastic and non-plastic attributes over different time scales, eventually leading to local adaptation; Beall, 2006; Hammond et al., 2006; Mueller et al., 2015; Powell and Hopkins, 2010; Rezende et al., 2005; Storz et al., 2010). Indeed, several squamate species have adapted to permanent life at extreme high elevations (*i.e.*, Atlas Day gecko, *Quedenfeldtia trachyblepharus*: Bouazza et al., 2016; *Liolaemus* lizards: Marquet et al., 1989; Qinghai toad-headed lizards, *Phrynocephalus vlangalii*: Wu et al., 2018; western fence lizard, *Sceloporus occidentalis* and sagebrush lizard, *Sceloporus graciosus*: Adolph, 1990; Pyrenean rock lizard, *Iberolacerta bonnali*; Pottier, 2012). These records are testimony that colonization and life at extreme high altitude is possible for oviparous ectotherm amniotes, although the interactions between elevation, colonization dynamics, warming speed, plasticity, and local adaptation remain to be understood. Our study shows that extreme high elevation colonization by the viperine snake will not be prevented, but likely slowed down by hypoxia. Notably, in the context of global warming, it will be essential to measure how a combination of different environmental factors might interact to affect development and performance. For example, the effects of oxygen level may manifest differently depending on temperatures, with the effects of reduced oxygen availability stronger at high temperatures (Gangloff and Telemeco, 2018). These impacts could in turn limit the ability to colonize higher elevation. As a start, our study demonstrates that extreme high elevation has significant effects on embryo development and hatchling phenotypes, prompting further research on the matter, specifically on the interactive effects of oxygen levels and temperature.

3.7. Acknowledgements

We are grateful to the staff of Observatoire Midi-Pyrénées for logistical support at Pic du Midi de Bigorre as well as Isabel Verdaguer, Joaquim Soler and Zuleica Alonso for their help in the laboratory. This work was supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02), INTERREG POCTEFA ECTOPYR (no. EFA031/15), and the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 752299. All experimental protocols (including animal collection, housing, experimentation and release) were approved by the DREAL Midi-Pyrénées (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) and by the Préfectures of Ariège, Aude, Haute-Garonne, Hautes-Pyrénées and Pyrénées Orientales districts (Arrêté Préfectoral No. 2017-s-02 du 30 mars 2017) and ethical committee (APAFIS#16359-201808011445465 v4). All experiments were carried out in accordance with the approved guidelines. Animal caretakers and handlers were trained to use wildlife in scientific purposes (Decree No. 2013-118 du 01 février 2013 and approval of the Ministry of Agriculture under No. I-75-MNHN-F1-15 du 17 juin 2015).

3.8. Tables and figures

Table 1

Results of linear mixed-effect models testing for the effect of incubation treatment (LE or EHE), age at measurement (day post-hatching), and their interaction on embryo developmental parameters in eggs of the viperine snake. Sample numbers (N) for low elevation (LE) and extreme high elevation (EHE) treatments are indicated under the developmental parameters. Significant factors shown in bold with one ($P < 0.05$), two ($P < 0.01$) or three ($P < 0.001$) asterisks.

	Egg mass <i>LE (N=44); EHE (N=46)</i>	Heart rates <i>LE (N=44); EHE (N=46)</i>
Day	$F_{5, 437.43} = 2707$; $P < 0.001$***	$F_{4, 348.50} = 24.71$; $P < 0.001$***
Treatment	$F_{1, 78.37} = 7.62$; $P = 0.007$**	$F_{1, 77.92} = 15.36$; $P < 0.001$***
Day x Treatment	$F_{5, 437.06} = 4.59$; $P < 0.001$***	$F_{4, 348.46} = 0.26$; $P = 0.924$

Table 2

Differences in hatchling traits over the first 9 days of post-hatching life between juvenile viperine snakes incubated at low elevation (LE) and at extreme high elevation (EHE). Linear mixed-effect models were used to test the effects of treatment on the relevant traits. Raw means \pm SD are given. Significant factors shown in bold with one ($P < 0.05$), two ($P < 0.01$) or three ($P < 0.001$) asterisks.

	LE	EHE	F (dfn, dfd)	P
Incubation time (days) <i>LE (N=30); EHE (N=35)</i>	44.77 \pm 1.27	44.03 \pm 1.29	20.43 (1, 54.50)	< 0.001***
Body mass (g) at 1 day <i>LE (N=30); EHE (N=35)</i>	2.95 \pm 0.50	2.71 \pm 0.52	10.12 (1, 55.04)	0.002**
Body size (cm) at 1 day <i>LE (N=30); EHE (N=35)</i>	14.83 \pm 0.73	14.53 \pm 1.14	2.03 (1, 56.57)	0.159
Body condition at 1 day <i>LE (N=30); EHE (N=35)</i>	0.01 \pm 0.05	-0.01 \pm 0.04	3.08 (1, 56.64)	0.084
Residual egg yolk (g) <i>LE (N=30); EHE (N=35)</i>	0.25 \pm 0.15	0.45 \pm 0.49	4.64 (1, 58.88)	0.035*
Body size (cm) at 9 days <i>LE (N=30); EHE (N=34)</i>	15.52 \pm 0.79	15.09 \pm 0.91	8.77 (1, 54.13)	0.005*
Body mass (g) at 9 days <i>LE (N=30); EHE (N=34)</i>	2.07 \pm 0.41	1.98 \pm 0.35	2.16 (1, 54.45)	0.147
Body condition at 9 days <i>LE (N=30); EHE (N=34)</i>	0.008 \pm 0.049	-0.005 \pm 0.042	0.52 (1, 54.23)	0.472

Table 3

Results of linear mixed-effect models testing the determinants of performance in juvenile Viperine snakes. Sample numbers (N) for both low elevation (LE) and extreme high elevation (EHE) treatments are indicated under the performance tested. Significant factors shown in bold with one ($P < 0.05$), two ($P < 0.01$) or three ($P < 0.001$) asterisks.

	Sprint swimming speed <i>LE (N=29); EHE (N=31)</i>	Apnea time <i>LE (N=29); EHE (N=31)</i>
Test location	$F_{1, 58.00} = 16.82$; $P < 0.001$***	$F_{1, 58.00} = 4.49$; $P = 0.038$*
Treatment	$F_{1, 51.94} = 1.01$; $P = 0.319$	$F_{1, 49.92} = 0.01$; $P = 0.920$
Test location x Treatment	$F_{1, 58.00} = 4.06$; $P = 0.048$*	$F_{1, 58.00} = 0.01$; $P = 0.912$
Sex	$F_{1, 52.22} = 0.74$; $P = 0.392$	$F_{1, 51.60} = 0.64$; $P = 0.428$
Body size (cm) at 9 days	$F_{1, 42.83} = 15.86$; $P < 0.001$***	-
Body mass (g) at 9 days	-	$F_{1, 53.86} = 4.72$; $P = 0.034$*

Figure 1

Experimental design. Eggs were collected from gravid females sampled from low elevation viperine snake populations in the foothills of the Pyrenees (432 m to 518 m ASL). Within 24 hours of oviposition, clutches were evenly split into two groups with equal average egg masses. For each clutch, one half-clutch was transplanted to the extreme high elevation (EHE) laboratory at 2877 m ASL, while the second half-clutch underwent incubation at low elevation (LE) 436 m ASL. Eggs mass and embryo heart rate were measured throughout incubation (test 1). At hatching, a number of morphometric traits were measured in juveniles (test 2). All hatchlings were tested for swimming and apnea performance in the environment their eggs were incubated (test 3 & 4) and then again after being translocated to the alternative treatment (test 3 & 4).

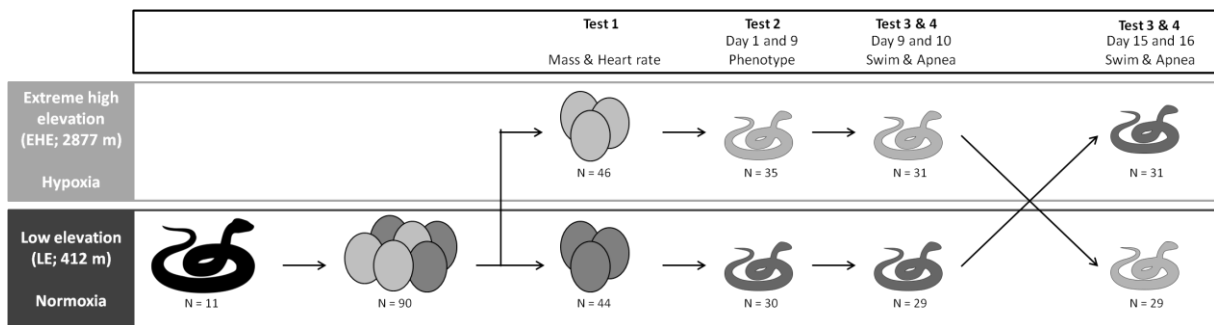


Figure 2

Egg mass (A) and embryo heart rate (B) through incubation time in viperine snakes at low elevation (LE; N = 44; circle) and extreme high elevation (EHE; N = 46; triangle). Least-squares means \pm SE estimated by linear mixed models are plotted.

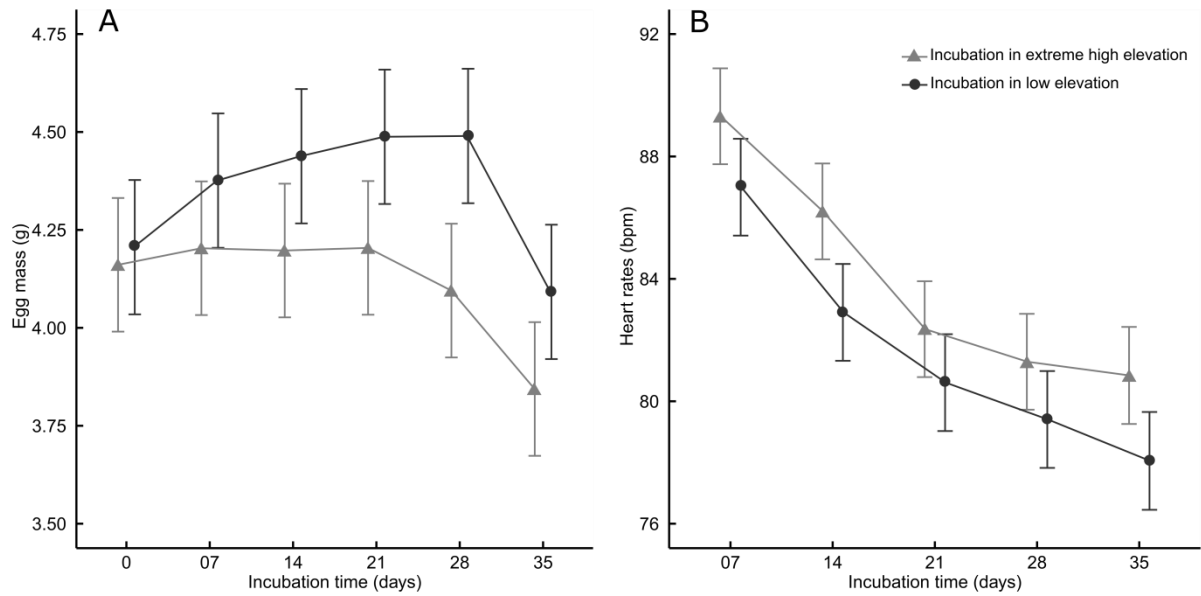
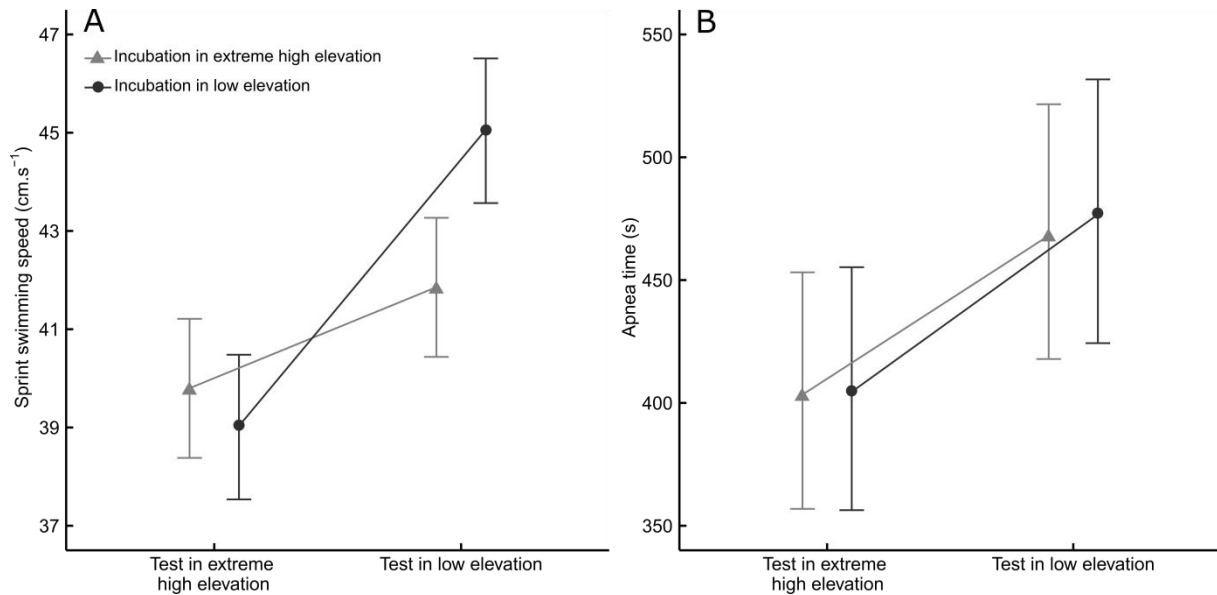


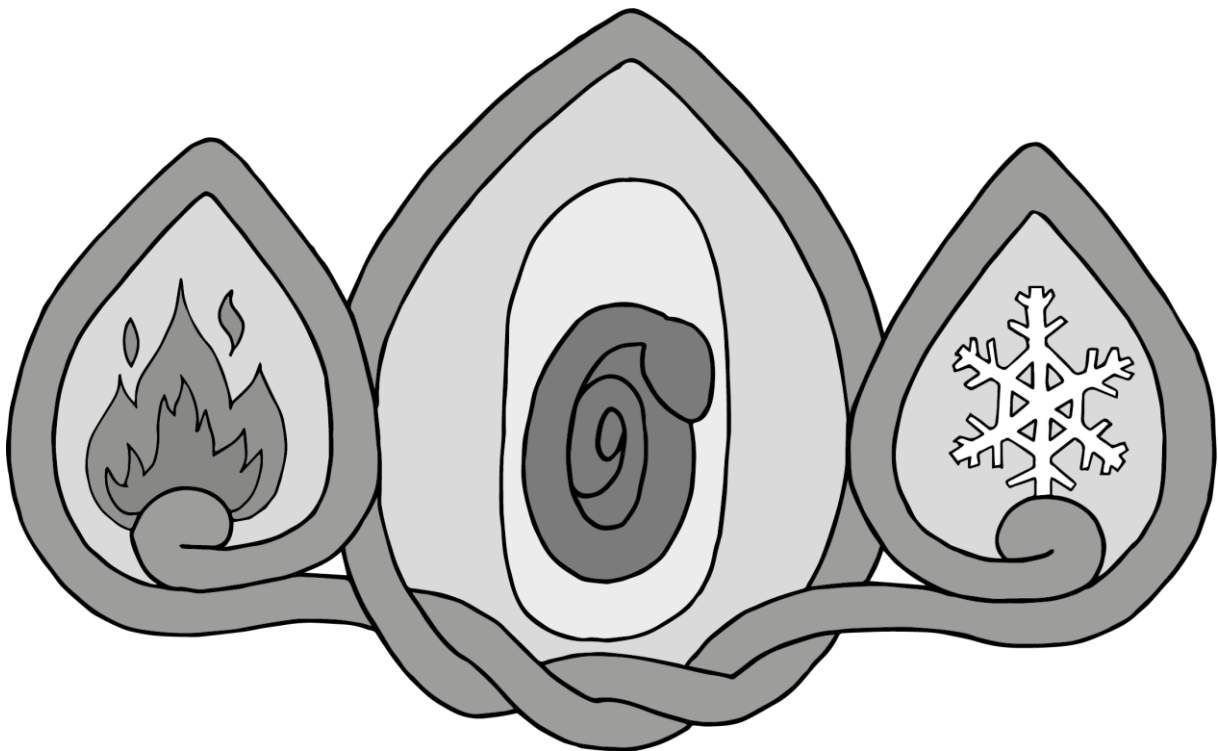
Figure 3

Sprint swimming speed (A) and apnea performance (B) by incubation treatment (LE; N = 29; circle and EHE; N = 31; triangle) and test location (low elevation and extreme high elevation) in viperine snakes. Least-squares means \pm SE estimated by linear mixed models are plotted.



Chapitre 4.

EFFETS DE L'HYPOXIE D'ALTITUDE ET DES
VARIATIONS DE TEMPÉRATURES SUR LE
DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LES
PERFORMANCES JUVÉNILES



4.1. Présentation et hypothèses du chapitre

Ce chapitre s'intéresse dans un premier temps aux effets croisés de la température et de l'hypoxie sur le développement embryonnaire chez la Couleuvre vipérine. Compte tenu des conséquences physiologiques connues des contraintes thermiques et d'oxygène simultanées (*cf. section 1.5.3*), cette première partie tente d'évaluer différents scénarios possibles induits par le réchauffement climatique : 1) une haute disponibilité en oxygène (*i.e.* 95% à 436 m d'altitude) et une température d'incubation froide (*i.e.* 24°C, 4°C au dessous de l'optimum thermique pour l'incubation) ce qui correspond à une condition passée récente; 2) une haute disponibilité en oxygène (*i.e.* 95% à 436 m d'altitude) et une température d'incubation chaude (*i.e.* 32°C, 4°C au dessus de l'optimum thermique pour l'incubation) ce qui correspond à une condition actuelle pour des populations qui subissent sans déplacement d'aire de répartition le changement climatique; 3) une faible disponibilité d'oxygène (*i.e.* 70% à 2 877 m d'altitude), et une température d'incubation froide (*i.e.* 24°C, 4°C au dessous de l'optimum thermique pour l'incubation) ce qui correspond à une condition actuelle pour des populations qui se sont déplacées en altitude; 4) une faible disponibilité d'oxygène (*i.e.* 70% à 2 877 m d'altitude), et une température d'incubation chaude (*i.e.* 32°C, 4°C au dessus de l'optimum thermique pour l'incubation) ce qui correspond pour des populations qui auraient migrées en altitude à une condition future proche selon les scénarios du GIEC. Cette conception expérimentale permet de distinguer les effets individuels et combinés de la température d'incubation et des niveaux d'oxygène sur le développement de l'embryon et les phénotypes d'éclosion. Dans un deuxième temps, ce chapitre s'intéresse aux performances physiques des juvéniles à la température optimale de performance connue pour cette espèce (*i.e.* 25°C). Pour cela, la vitesse de nage, un indicateur de la capacité de fuite face aux prédateurs et de l'acquisition de nourriture chez les serpents semi aquatique, est mesurée. Dans un premier temps les vitesses de nage sont mesurées à l'altitude d'incubation des juvéniles. L'objectif est de déterminer si les conditions d'incubation influencent les performances des juvéniles. Dans un second temps, la moitié des juvéniles de chaque groupe sont de nouveaux testés à court et moyen long terme à leur altitude d'origine alors que l'autre moitié est transférée à l'altitude opposée pour être également testée à court et moyen long terme. L'objectif est de connaître plus précisément les effets croisés des niveaux d'oxygène et des températures sur le stade précoce de l'espèce, mais aussi de connaître l'impact potentiellement négatif de la double contrainte environnementale durant l'incubation. Dans ces contextes, nous prédisons que :

- Les fréquences cardiaques (*i.e.* un proxy du métabolisme *cf. section 2.3.2*) seront similaires pour les embryons incubés en hypoxie et en normoxie à des températures d'incubation froides.

- Une température d'incubation chaude va augmenter la fréquence cardiaque des embryons avec une fréquence cardiaque supérieure pour les embryons incubés en hypoxie.
- La durée de développement sera augmentée et similaire entre les groupes à température d'incubation froide alors qu'elle sera réduite à la température d'incubation chaude et d'autant plus pour les embryons incubés en hypoxie.
- Le phénotype des embryons sera maintenu et similaire entre les groupes à température d'incubation froide alors que les juvéniles seront de plus petites tailles et plus légers à la température d'incubation chaude d'autant plus pour les embryons incubés en hypoxie.
- La vitesse de nage des juvéniles qui ont été incubés et qui ont été testés en hypoxie sera réduite et d'autant plus pour les juvéniles qui ont été incubés à la température chaude.
- Peu importe la température d'incubation, après avoir été transférés en basse altitude, la vitesse de nage des juvéniles sera améliorée alors que pour les juvéniles incubés en normoxie puis transférés en haute altitude elle sera réduite.

L'article présenté dans ce chapitre a été accepté le 5 octobre 2020 pour publication dans ***Biological Journal of the Linnean Society*** :

Souchet J, Bossu C, Darnet E, Le Chevalier H, Poignet M, Trochet A, Bertrand R, Calvez O, Martinez-Sylvestre A, Mossoll-Torres M, Guillaume O, Clobert J, Barthe L, Pottier G, Philippe H, Gangloff EJ & Aubret F. *High temperatures limit developmental resilience to high-elevation hypoxia in the snake *Natrix maura* (Squamata: Colubridae)*. Biol J Linn Soc.

4.2. Résumé

Le changement climatique génère des déplacements chez de nombreux organismes, notamment le long du gradient altitudinal. Cependant, monter en altitude expose les organismes à une diminution de la disponibilité en oxygène, ce qui peut négativement affecter le développement et l'aptitude des organismes, en particulier à des températures élevées. Pour tester cette possibilité chez une espèce ectotherme qui monte en altitude, nous avons artificiellement incubé des embryons de Couleuvre vipérine (*Natrix maura*, Linnaeus 1758), en utilisant un plan expérimental où chaque ponte est séparée en quatre traitements à conditions croisées. Les conditions de ces traitements sont une haute altitude (hypoxie) ou une basse altitude (normoxie) et deux températures d'incubation importantes sur le plan écologique (24°C et 32°C). Les individus incubés à basse ou haute altitude et à des températures fraîches ne différaient pas en termes de temps de développement, de phénotype d'éclosion ou de performances de nage. Toutefois, pour les individus incubés à la température d'incubation plus chaude associée à une haute altitude, le succès d'éclosion était réduit. De plus, le rythme cardiaque embryonnaire était plus faible, la durée d'incubation plus courte et les juvéniles plus petits. Néanmoins, les serpents de ce traitement nageaient plus vite que les juvéniles des autres traitements, ce qui suggère un compromis de développement entre la taille et la performance. Les contraintes de développement peuvent être compensées par le maintien d'importantes mesures de performance, permettant ainsi une colonisation réussie de l'habitat de haute altitude même sous la double limitation d'une réduction de l'oxygène et d'une augmentation de la température.

Mots clés : *changement climatique - développement embryonnaire - plasticité du développement - métabolisme embryonnaire - rythme cardiaque - hypoxie de haute altitude - température d'incubation - performance de nage*

High temperatures limit developmental resilience to high-elevation hypoxia in the snake *Natrix maura* (Squamata: Colubridae)

Short running title: Snake development in hypoxia and high temperature

Jérémie Souchet^{1*}, Coralie Bossu¹, Elodie Darnet¹, Hugo Le Chevalier¹, Manon Poignet¹, Audrey Trochet², Romain Bertrand³, Olivier Calvez¹, Albert Martinez-Silvestre⁴, Marc Mossoll-Torres^{5,6}, Olivier Guillaume¹, Jean Clobert¹, Laurent Barthe^{2,7}, Gilles Pottier⁷, Hervé Philippe^{1,8}, Eric J. Gangloff^{1,9} & Fabien Aubret^{1,10}

1- *Station d'Ecologie Théorique et Expérimentale du Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5321 CNRS – Université Paul Sabatier, 09200 Moulis, France*

2- *Société Herpétologique de France, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP41, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France*

3- *Laboratoire Évolution et Diversité Biologique, UMR 5174 Université de Toulouse III Paul Sabatier, CNRS, IRD, 31062 Toulouse, France*

4- *Catalonia Reptile and Amphibian Rescue Center (CRARC), 08783 Masquefa, Barcelona, Spain*

5- *Bomosa, Pl. Parc de la Mola, 10 Torre Caldea 7^o, AD700 Les Escaldes, Andorra*

6- *Pirenalía, c/ de la rectoria, 2 Casa Cintet, AD200 Encamp, Andorra*

7- *Nature En Occitanie, 14 rue de Tivoli, 31 000 Toulouse, France*

8- *Département de Biochimie, Centre Robert-Cedergren, Université de Montréal, Montréal, Canada*

9- *Department of Zoology, Ohio Wesleyan University, Delaware, Ohio, USA*

10- *School of Molecular and Life Sciences, Curtin University, Brand Drive, Bentley, WA 6102, Australia*

* Corresponding author. E-mail: jeremie.souchet@gmail.com

Author contributions

JS, HP and FA contributed to experimental design and logistics. JS, CB, ED, HLC, and MP conducted experiments. JS and EJC conducted statistical analyses. JS, EJC, and FA drafted the manuscript. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

4.3. Introduction

The effects of global warming on biodiversity are a growing concern at all levels of ecosystem functioning (Parmesan, 2006; Scheffers et al., 2016; Pecl et al., 2017). Range shifts toward higher latitudes and elevations are now commonly observed as organisms and populations alter their geographic distributions to track their thermal requirements (Sinervo et al., 2018). The rapid contemporary pace of global warming has resulted in a process coined “thermophilization”, where community compositions shift in favour of warm-affinity species (Devictor et al., 2012; De Frenne et al., 2013; Stuart-Smith et al., 2015; Fadrique et al., 2018). Many organisms, however, are unable to track the temperature changes due to habitat fragmentation, slow dispersal, and long life spans (Sinervo et al., 2010; Bertrand et al., 2016; Lenoir et al., 2020), leading to climatic debts in community responses to macroclimate warming (Devictor et al., 2012; Alexander et al., 2018; Zellweger et al., 2020). Consequently, many organisms’ and populations’ ecological requirements are rapidly becoming mismatched with their thermal environment, potentially leading to local extirpation (Whitfield et al., 2007; Sinervo et al., 2010; Bestion et al., 2015a), unless successful range shifts occur towards more suitable thermal latitudes or altitudes (Lenoir et al., 2020). While altitudinal range shifts have been reported in a wide range of organisms (Walther et al., 2002; Parmesan and Yohe, 2003; Bässler et al., 2013; Pauchard et al., 2016; Freeman et al., 2018), moving up in elevation exposes organisms to lower oxygen availability, potentially impacting reproduction, dispersal and overall range shift dynamics (Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010; Jacobsen, 2020). Moreover, under IPCC’s current projection (Mokhov and Eliseev, 2012), temperatures are expected to keep rising, even at high elevation (Jacobsen, 2020). This may eventually expose newly established populations at high-elevation to the double constraints of low oxygen availability and sub-optimal temperatures.

Ectotherm physiology and behavioural processes are strongly dependent on environmental temperatures (Huey and Stevenson, 1979; Angilletta et al., 2002; Gillooly et al., 2002; Deutsch et al., 2008; Huey et al., 2012), and therefore they are often utilized as a model in climate change related experiments and studies (Pen et al., 2010; Sinervo et al., 2010; Bestion et al., 2015a; Dahlhoff et al., 2019). Our current study focuses on embryo development and hatching success, because the production of viable and fit offspring is a required condition for successful dispersal and population establishment in novel environments (Baguette et al., 2012). Further, incubation temperature is the main driver of embryonic development and hatchling phenotype in ectotherms such as reptiles (Deeming and Ferguson, 1991; Deeming, 2004; Booth, 2006; Goodman, 2008; Warner, 2014; Refsnider et al., 2019). The influence of incubation temperatures (notably above the optimal range;

Andrews and Schwarzkopf, 2012) on hatchling phenotype is especially well known in reptiles, affecting development, sex determination, incubation duration, body size, growth rate, locomotor performance, cognitive abilities, and post-natal behaviour (Shine, 2004; Deutsch et al., 2008; Daufresne et al., 2009; Gardner et al., 2011; Sheridan and Bickford, 2011; Bestion et al., 2015a; Cunningham et al., 2017; Noble et al., 2018; Pellerin et al., 2019; Refsnider et al., 2019). Additionally, the effects of low oxygen availability on physiology have attracted recent attention, including in the context of altitudinal range shifts driven by climate change (Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010; Jacobsen, 2020). For instance, it was shown that common wall lizards (*Podarcis muralis*, Laurenti, 1768) transplanted to high elevation enhanced oxygen-carrying capacity by increasing hematocrit and blood hemoglobin concentration, though transplanted lizards still suffered a reduction in running endurance (Gangloff et al., 2019). Further, reptile embryos exposed to hypoxia increased heart rates in some studies (Du et al., 2010a; Souchet et al., 2020), while in other cases hypoxia leads to decreased heart rates and cardiac hypertrophy (Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019). In viperine snakes, exposure to hypoxia during incubation resulted in hatchlings that were smaller in body size and slower swimmers (a proxy for predator avoidance and food acquisition in snakes; Jayne and Bennett, 1990; Kingsolver et al., 2001) compared to their siblings incubated at lower elevation (Souchet et al., 2020).

Recent work suggests that the interaction of high temperature and oxygen limitation will alter embryo development (Jackson, 2007; Flewelling and Parker, 2015; Smith et al., 2015; Gangloff and Telemeco, 2018; Hall and Warner, 2020; Li et al., 2020). Here we experimentally tested the effect of high temperature (*i.e.*, current populations caught in the climatic debt), low oxygen availability (*i.e.*, populations having shifted their range in altitude in the near future), and the combined effect of high temperature and low oxygen (*i.e.*, extreme high elevation in the year 2070) on the development, hatching success and hatchling phenotype in a temperate snake species (viperine snake, *Natrix maura*, Linnaeus 1758). This is a first step toward assessing the colonization potential to high elevation in a potentially upward-migrating species. We used a split-clutch design and incubated eggs in four ecologically relevant treatments: 1) oxygen availability at native elevation (normoxia; 436m above sea level [ASL]) and 32°C incubation temperature (*i.e.*, populations lagging behind climate change); 2) low oxygen availability (2877 m ASL), 24°C incubation (*i.e.*, range shifted in altitude); 3) low oxygen availability, 32°C incubation (*i.e.*, high altitude in the year 2070), and 4) a normal oxygen availability, 24°C incubation control treatment (*i.e.*, recent past conditions). We monitored embryo heart rates (a proxy for metabolism and cardiovascular function; Crossley and Burggren, 2009) and egg mass throughout the incubation and measured fitness-relevant aspects of hatchling phenotypes (body size and swimming performance) at hatching. This factorial design allowed us to tease apart

the individual and combined effects of incubation temperature and oxygen levels on embryo development and hatchling phenotypes. Based on our previous work (Souchet et al., 2020), we expected that the extreme high elevation will decrease egg mass and induce higher heart rates throughout incubation. Moreover, we predicted incubation duration will be shorter and the hatchlings will be smaller in high-elevation hypoxia. Further, we predicted that the combined constraints imposed by higher metabolic rates induced by warmer incubation temperature (Huey, 1982; Angilletta, 2009; Dillon et al., 2010) and oxygen limitation on juveniles will result in a reduced performance capacity. Specifically, we predicted that embryos incubated at extreme high elevation will produce slower-swimming juveniles and that embryos developing under conditions of both high temperature and high-elevation hypoxia will be the slowest. Finally, we further partitioned treatment groups to test whether the effects of embryonic environment would be ontogenetically stable even after hatchlings were transplanted to the alternative elevation.

4.4. Materials and methods

4.3.1. *Experimental design*

We captured 17 gravid females viperine snake along the banks of the Lez River (Department of Ariège, France), between May and July 2017. This aquatic species (Vacher and Geniez, 2010) has been recorded up to 1000 m above sea level [ASL] in France (Aubret et al., 2015; Pottier, 2016) and 1500 m ASL in Spain (Martinez-Rica and Reiné-Viñales, 1988; Santos, 2015). The viperine snake has been exposed to fluctuating temperatures and has migrated along the elevational gradient throughout its evolutionary history, colonizing mountainous environments repeatedly in conjunction with historical warming and cooling cycles (Gómez and Lunt, 2007). Capture sites spanned from 412m to 715m ASL. Each female was maintained in the Station d'Ecologie Théorique et Expérimentale du Centre National de la Recherche Scientifique (SETE-CNRS; 42.958394 N, 1.086440 E) and laid a single clutch for a total of 205 eggs between 21 June 2017 and 22 July 2017 (mean clutch size \pm SD = 11.9 \pm 4.9 eggs). Three eggs were infertile, leaving 202 eggs for the experiment. All females were returned to their exact site of capture within two weeks of egg-laying.

We first investigated how temperature (cool temperature at constant 24°C; and hot temperature at constant 32°C) and oxygen availability interact to influence embryonic development. Oxygen treatments were normoxia at the SETE-CNRS (low elevation at 436 m ASL, 95% sea-level equivalent O₂ availability, PO₂ ~20.1 kPa) and high-elevation hypoxia at the Observatory Midi-Pyrénées of the Pic du Midi de Bigorre (42.936389 N, 0.142472 E, above current range limits at 2877 m ASL, 72% sea-

level equivalent O₂ availability, PO₂ ~15.3 kPa). This difference in elevation results in a decrease in atmospheric pressure, with associated reduction in the partial pressure of gases, including oxygen, carbon dioxide, and water vapor (Millet and Debevec, 2020; Richalet, 2020). Most relevant to our hypotheses is the 25% reduction in oxygen availability at the Pic du Midi de Bigorre lab in comparison to sea level (Bouverot, 2012). Eggs were weighed using a digital scale (to the nearest 0.01 g) within 12 hours of oviposition and individually marked for identification with a pencil. We used a split-clutch design and allocated eggs to four incubation treatments within 24 hours of oviposition (Figure 1): Low Elevation and Cool temperature (LEC; normoxia at constant 24°C), Low Elevation and Hot temperature (LEH; normoxia at constant 32°C), Extreme High Elevation and Cool temperature (EHEC; hypoxia at constant 24°C) and Extreme High Elevation and Hot temperature (EHEH; hypoxia at constant 32°C). Because egg mass influences both embryo metabolism and hatching phenotype (Nelson et al., 2004; Aubret, 2013a), and egg mass varied among clutches (Kruskal-Wallis test: $H=148.42$, $Df=15$, $P < 0.001$), eggs were ranked within each clutch from lightest to heaviest and alternately assigned to treatments in order to ensure no difference in egg mass between treatments (Kruskal-Wallis test: $H=0.151$, $Df=3$, $P = 0.985$). LEC, LEH, EHEC and EHEH treatment quarter-clutches were placed in a plastic container (20 cm x 15 cm x 5 cm) on a 2 cm layer of wet vermiculite (1:5 water to vermiculite by volume) and incubated in four identical incubation chambers (ExoTerra Model PT-2445, Rolf C. Hagen Inc., USA). Water bowls placed within each incubator, directly under the incubator's fan, ensured high levels of humidity throughout incubation (indicated by condensation on the incubator walls).

Out of 202 eggs, 177 embryos from 16 females successfully hatched (87.6% hatching success rate) while 25 died at various stages during incubation. Another 17 neonates died shortly after hatching (between 24 hours to two weeks). We measured morphology (Test2, Figure1; see below) first on all 177 hatchlings at their incubation location (low or extreme high elevation). Our experimental design allowed us to measure the effects of temperature and hypoxia during incubation on juvenile development and performance. It also allowed us to measure the short-term effects on juvenile development and performance in acute high-elevation hypoxia after translocation to extreme high elevation. In order to assess these questions, at nine days post-hatching (after all yolk was assimilated; Ji et al., 1999) we measured morphology and swimming performance (Test 3, Figure1; see below) first on all 160 hatchlings at their incubation elevation (low or extreme high elevation). After this first measurement, half of the hatchlings in the LEC and LEH treatments were transferred to extreme high elevation while half of the hatchlings from the EHEC and EHEH treatments were brought down to the low elevation site. All juveniles were then tested for swimming performance and morphology at 11 days, 25 days, and at 40 days post-hatching (respectively one day, two weeks

and one month of acclimation for transferred juveniles; Test 4, Figure 1). Once tests were completed, young snakes were fed with small dead minnows (0.5 g to 1 g) and released between 42 and 45 days post-hatching at the maternal capture site.

4.3.2. Egg mass and heart rate measurements

We weighed each egg using a digital scale (to the nearest 0.01 g) within 12 hours of oviposition, and then every 7 days until hatching (Figure 1; Test 1). Embryo heart rates were first measured at 7 days of incubation and then every 7 days until hatching (Figure 1; Test 1) at the same temperature as incubation. To measure embryo heart rates, we used the Buddy digital egg monitor (MK2, Avitronics, Cornwall, UK) under the standardized protocol described for eggs (Aubret, 2013a; Cordero et al., 2017a; Souchet et al., 2020). Each egg was gently placed onto the sensor pad for heart rate reading (a stable reading was obtained after approximately 30 seconds) and then returned to its clutch. All eggs were only briefly (≤ 1 min) placed in the digital egg monitor to mitigate potential temperature changes owing to exposure to infrared sensors (Sartori et al., 2015; Hulbert et al., 2017). Heart rates can be influenced by a variety of factors (Clark et al., 2006; Du et al., 2010a) and are linked to metabolic rate in some circumstances (Kouyoumdjian et al., 2019), though this relationship may become less clear especially late in development (Sartori et al., 2017). We also calculated the total number of heart beats (THB) of embryos throughout embryonic development using the formula $THB = \text{average heart rate} \times \text{total minutes of developmental duration}$ (Du et al., 2009, 2011).

4.3.3. Hatchling measurements

Hatching occurred between 8 August 2017 and 29 September 2017 (Figure 1; Test 2) and hatchlings were individually marked for identification with a medical cauterizer (Model HIT0, Bovie, USA) on the ventral scales (Winne et al., 2006) within 24 hours of emergence. Hatchlings were weighed using a digital scale (to the nearest 0.01 g), measured for snout-vent length (SVL) and total body length (TL) using a measuring tape (to the nearest 0.1 cm), and sexed via hemipene eversion. Since sex is genetically determined in snakes, we did not expect an effect of treatment on sex determination, but tested for differential effects between the sexes in developing embryos which could result in skewed hatchling sex ratios. We calculated body condition as the residual of the \log_{10} -mass on \log_{10} -SVL linear regression at hatching day. Finally, we weighed the yolk leftover in the eggshell (residual egg yolk) using a digital scale (to the nearest 0.01 g). Juveniles were housed together by hatching date in plastic containers (15 cm x 10 cm x 5 cm) with a water dish, shelter and paper towel as a substrate in incubation chambers (ExoTerra Model PT-2445, Rolf C. Hagen Inc. Canada) set at constant 20°C. Our

experience with viperine snake shows that cooler temperatures (below thermal optimum for performance or preferred temperatures) results in higher juvenile survivorship (93% survival at one month in this species; J.S. and F.A. unpubl. data). Juveniles were measured again at 9 days, 11 days, 25 days and 40 days post-hatching for SVL, TL and body mass prior to performance testing.

4.3.4. *Swimming performance*

For this test, we were interested in measuring the maximal swimming speed to evaluate the potential limitation of hypoxia on this ecologically-relevant performance. To estimate the swimming speed we used a procedure that has been validated for snakes (Shine and Shetty, 2001; Aubret, 2004; Aubret et al., 2005), modified effectively for juveniles (Souchet et al., 2020). A high-definition wide-angle digital camera (25 fps, Sony Model HDR-XR160E, Sony Corporation) was fitted above a linear swimming track (100 cm x 20 cm x 20 cm) and used to record swimming trials. The tank was filled to a depth of 5 cm with water maintained at 25°C using aquarium heaters. A standard testing temperature of water at 25°C was used because it approximates the optimal temperature for swimming speed of the viperine snake (Hailey and Davies, 1986a; Aubret et al., 2015). At 9 days, 11 days, 25 days and 40 days post-hatching, each snake was acclimated to 25°C for 30 minutes and swam 10 consecutive lengths. Raw data were extracted from video files by measuring swimming speed ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) for each length (ten per individual and day of measurement) with the software Tracker (Brown, 2019). The fastest performance from all trials was utilized for swimming analysis. Analyzing the average swimming speed of the 10 trials gives the same qualitative results; however, since our focus is performance capacity, we include results for maximum swimming speed here.

4.3.5. *Data analysis*

We first assessed the influence of the temperature and elevation of incubation, and time of development on egg mass and embryo heart rate (Test 1). We used linear mixed-effect models, including as main effects the temperature of incubation (cool: 24°C; warm: 32°C), the elevation of incubation (low elevation: normoxia; extreme high elevation: high-elevation hypoxia), the age at measurement (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63 days post-laying) treated as a categorical effect to account for the expected nonlinear response over time (Burggren and Warburton, 1994; Cordero et al., 2017a; Sartori et al., 2017), and all three- and two-way interactions. We then assessed the influence of temperature and elevation of incubation on eight measures of hatchling phenotype at hatching (Test 2): survival to hatching, sex, incubation time, total number of heartbeats (THB), body mass, body size (SVL), body condition, and residual egg yolk. We used linear mixed-effect models,

including in all models the same main effects of the temperature of incubation (cool: 24°C; warm: 32°C), the elevation of incubation (low elevation: normoxia; extreme high elevation: high-elevation hypoxia), and interactions as above. Finally, we assessed the influence of the temperature and elevation of incubation on swimming performance of juveniles (Test 3 and Test 4). We used linear mixed-effect models, including as the main effects the temperature of incubation (cool: 24°C; warm: 32°C), the elevation of incubation (low elevation: normoxia; extreme high elevation: high-elevation hypoxia), the age at measurement (9, 11, 25 and 40 days post-hatching), the location of test (low elevation or extreme high elevation), and all four-, three- and two-way interactions. We also include as covariates the total body length (TL) and the sex of juveniles.

To account for the non-independence of siblings we included the clutch of origin as a random effect (intercept) in all models. In models for which we measured individuals repeatedly (egg mass, embryo heart rates, and swimming performance), we also included individual as a random effect (intercept), nested within clutch. We used type III sums of squares to assess the significance of main effects, incorporating a Kenward-Roger denominator degree of freedom approximation (Kenward and Roger, 1997). We also conducted a pairwise comparison of least-squares means and adjusted p-values for multiple comparisons with the Tukey method. All analyses were conducted with the lme4 package (Bates et al., 2014) and the emmeans package (Lenth, 2016) and figures were made with the ggplot2 package (Wickham, 2016) in the programming language R 3.6.1 (R Development Core Team, 2019).

4.5. Results

4.4.1. Test 1: Egg mass and embryonic heart rates

The main effects of elevation, temperature, and time of measurement (days post-laying) and their interaction significantly altered egg mass trajectories (Table 1, Figure 2A). Eggs incubated at 24°C (*i.e.*, LEC and EHEC) gained mass for 35 days post-oviposition before decreasing (Table 1, Figure 2A), while the mass of eggs incubated at 32°C (*i.e.*, LEH and EHEH) decreased throughout the incubation (Table 1, Figure 2A). The post-hoc comparison of least-squares means from the model (Table S1) indicates that eggs masses were similar in eggs incubated at the same incubation temperature whatever the oxygen availability. Nevertheless, at the last day of measurement (28 days post-hatching for LEH and EHEH; 63 days post-hatching for LEC and EHEC) the egg mass of both treatments in extreme high elevation were significantly less than those of the low elevation treatments (Figure 2A; Table S1). Eggs incubated at 24°C (*i.e.*, at LEC and EHEC) maintained higher

mass (mean difference \pm SE: 0.36 ± 0.08 g) across the incubation period compared to eggs incubated at 32°C (*i.e.*, at LEH and EHEH).

Heart rate trajectories were also significantly altered by elevation and temperature, time of measurement (days post-laying), and by the interaction between temperature and both elevation and time of measurement (Table 1, Figure 2B). Heart rates of embryos incubated at 32°C (*i.e.*, at LEH and EHEH) increased rapidly during the first 7 days of incubation before decreasing for the remainder of the incubation (Table 1, Figure 2B), while embryos incubated at 24°C (*i.e.*, at LEC and EHEC) maintained stable heart rates throughout incubation (Table 1, Figure 2B). Post-hoc comparison of least-squares means (Table S1) indicates that embryos from LEH treatment maintained higher heart rates (mean difference \pm SD: 7.25 ± 1.17 bpm) across the incubation period compared to EHEH. Further, eggs in the EHEH treatment exhibited much higher heart rates (mean difference \pm SE: 33.39 ± 1.00 bpm) compared to both embryo groups incubated at 24°C (*i.e.*, at LEC and EHEC).

4.4.2. **Test 2: Hatching success and morphological measurements**

Hatching success of embryos was dependent on incubation temperature and the interaction with the elevation (LEC = 90.2%, LEH = 91.8%, EHEC = 94.1% and EHEH = 74.5%; Table 2). Post-hoc comparison of least-squares means (Table S2) indicates that hatching success differed between eggs in the EHEC and EHEH treatments. We observed that of the 25 dead embryos, half of them are from EHEH. Moreover, in this treatment, 92% of the death appeared in the last stage of development. Elevation and temperature levels did not affect the hatchling sex ratio (LEC = 56.5%; LEH = 57.8%; EHEC = 47.9%; and EHEH = 42.1% females; Table 2). Incubation duration differed between embryos incubated in the four treatments as a function of temperature and its interaction with the elevation (Table 2, Figure 3A). All treatment groups are significantly different from each other (Table S2). Snakes in the LEC treatment incubated 2.25 ± 0.28 days longer than EHEC, EHEC treatment incubated 29.01 ± 0.29 days longer than EHEH, and EHEH treatment incubated 2.66 ± 0.30 days longer than LEH. Only the temperature of incubation affected THB of embryos (Table 2, Figure 3B). THB did not differ in embryos from the same incubation temperature (Table S2) and THB were greater in the cool incubation temperature treatments (*i.e.*, LEC and EHEC) compared to warm (*i.e.* LEH and EHEH). Moreover, the residual egg yolk was also significantly affected by the temperature of incubation (Table 2, Figure 3F). Comparison of least-squares means from the model (Table S2) indicates that residual egg yolk was similar for the treatments within an incubation temperature (*i.e.*, LEC vs EHEC and LEH vs EHEH), but that snakes in the LEC and EHEC treatments retained an average of 0.29 g (33.6%) more residual egg yolk compared to the LEH and EHEH treatments.

Elevation and temperature and their interaction influenced body mass and body size (SVL) at hatching (Tables 2 & S2, Figures 3C & 3D). Elevation and temperature influenced hatchlings' body condition (Tables 2 & S2, Figure 3E). In all cases, the two cool treatments (*i.e.*, at LEC and EHEC) did not significantly differ from each other. For the body mass at one day post-hatching, LEH treatment did not differ from either LEC or EHEC treatments. However, the EHEH treatment was 0.39 ± 0.12 g (13.2%) lighter compared to the three other treatments. For body size at one day post-hatching, cool-temperature treatments were 0.72 ± 0.17 cm (5.1%) longer than snakes in the LEH treatment, which in turn were 0.49 ± 0.18 cm (4.7%) longer than snakes in the EHEH treatment. Finally, the different treatments also influenced the body condition at one day post-hatching (Tables 2 & S2, Figure 3E), with snakes in the LEH treatment having a 35.4% higher body condition compared to the three other treatments.

4.4.3. Tests 3 & 4: Swimming performance

Globally, maximum swimming speed (Table 3) was influenced by the effect of incubation temperature (24°C and 32°C), the time of measurement (9, 11, 25, and 40 days post-hatching), and their interaction with test location (low elevation and extreme high elevation). Moreover, size positively influenced swimming speed within each treatment group, with longer snakes swimming faster (slope estimate \pm SE: 2.71 ± 0.31 ; Table 3, Figure 4).

At nine days post-hatching, for the first swimming performance measurement (Test 3) conducted at the elevation of incubation, the post-hoc comparison of least-squares means (Table S3) indicates that maximum swimming speed was similar for both treatments at the cool incubation temperature (*i.e.*, LEC vs EHEC; Figure 5A). Juveniles from LEH treatments swam significantly faster (by 22.0%) than LEC and EHEC (Figure 5A; Table S3). Finally, the juveniles from the EHEH treatment swam significantly faster (by 10.4%) compared to the LEC treatment (Figure 5A; Table S3). After translocation to the opposite oxygen level treatment, maximum swimming speed was only significantly altered in the EHEH treatment at 25 days post hatching (Figure 5B; Table S3). That is, individuals translocated to low elevation (EHEH-LE) swam faster (by 18.7%) compared to siblings retained at extreme high elevation (EHEH-EHE). These results remained qualitatively unchanged when measuring swimming speed expressed as body length per second (analysis not shown).

The proportion of residual variance attributed to clutch was up to 67% (for egg mass) and the inclusion of this random effect significantly improved model fit for most traits measured (Table S4).

Siblings most strongly covaried for traits related to offspring size (egg mass and body mass at hatching) as well as developmental duration (incubation duration and total heart beats). Only heart rate and sex ratio were not influenced by significant maternal effects.

4.6. Discussion

Our study demonstrates the impact of high-elevation hypoxia coupled with temperature regime on development, physiology, and early-life performance in an oviparous ectotherm. Irrespective of oxygen availability during incubation, eggs incubated at cool temperature (*i.e.*, LEC and EHEC) maintained higher mass and much lower heart rates throughout incubation compared to siblings incubated at a warmer temperature (Figure 2; Table 1). The longer incubation duration combined with reduced heart rate at the cool incubation temperature suggests a lowered metabolic rate (Table 1), as expected (Deeming and Ferguson, 1991; Deeming, 2004; Booth, 2006; Goodman, 2008; Warner, 2014). At warm incubation temperatures (*i.e.*, LEH and EHEH), viperine snake embryos in extreme high-elevation hypoxia exhibited typical physiological adjustments to hypoxia found in other taxa, including reduced heart rate (Table 1, Figure 2; Laughlin, 1978; Monge and Leon-Velarde, 1991; Crossley and Altimiras, 2005; Crossley and Burggren, 2009; Du et al., 2011; Cordero et al., 2017a; b; Kouyoumdjian et al., 2019). Importantly, this trend was not exhibited in snakes incubated at extreme high elevation and low temperatures and furthermore is counter to that we demonstrated in our previous study conducted at an intermediate incubation temperature of 28°C (Souchet et al., 2020), suggesting that this is an effect of combined increased metabolism and reduced oxygen availability. Reduced heart rates were observed only in embryos incubated at the warmer temperature and extreme high elevation. The interaction of temperature and oxygen availability also influenced other important fitness-related parameters, including offspring development times, hatching success, body size at birth, and swimming performance. Notably, the potential negative consequences of reduced oxygen availability were exacerbated by high incubation temperatures.

We observed the strongest effects on development in embryos incubated at extreme high elevation and at high temperature, suggesting that these factors interact to limit the functional capacity of ectotherms. Gas exchange in embryos is diffusion-limited, likely constraining their ability to compensate for reduced oxygen availability through increased oxygen transport capacity (Vitt and Caldwell, 2013). These effects are then exacerbated by the increased demand induced by high temperatures. Under conditions of high temperature and low oxygen availability, we expect reductions in maximal performance, limitations on physiological processes generally, and potentially

reductions of critical thermal limits (Gangloff and Telemeco, 2018). For example, recent work demonstrated that lizard embryos suffer a mismatch between oxygen supply and demand at high temperatures, which may serve as the proximal cause of death (Hall and Warner, 2020). Our results demonstrate for the first time these effects in snake embryos, in concordance with previous work studying embryonic development *in ovo* under varying temperatures and levels of oxygen availability in other reptile taxa (Birds: Vimmerstedt et al., 2019; Crocodiles: lungman and Piña, 2013; Lizards: Flewelling and Parker, 2015; Smith et al., 2015; Li et al., 2020; Turtles: Liang et al., 2015). For example, embryos of the lizard *Podarcis muralis* increase incubation times in conditions of hypoxia when incubated at 28°C, but not at 24°C (Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019). In this study, we found that snake embryos incubated in warm temperature and in hypoxia were less likely to survive to hatching, especially because the last-stage embryos have higher oxygen demand (Dmi'el, 1970; Sartori et al., 2017), and, when they did survive, were smaller than snakes in other treatment groups (Table 2, Figure 3D). In accordance with previous work (Shine, 2004; Daufresne et al., 2009; Du et al., 2009; Gardner et al., 2011; Sheridan and Bickford, 2011; Noble et al., 2018; Refsnider et al., 2019), our results show that snakes incubated at warm temperatures were smaller and shorter than their counterparts, and hatched after fewer total heartbeats, regardless of oxygen availability (Table 2, Figure 3C & 3D). Moreover, there was less residual egg yolk in both warm treatments (*i.e.*, LEH and EHEH) compared to cool treatments (*i.e.*, LEC and EHEC) and yet these animals were also smaller, suggesting higher basal metabolic demands associated with high-temperature incubation may reduce growth efficiency (conversion of yolk to body mass). Hatchlings incubated at cool temperatures in hypoxia did not exhibit reduced body size or mass (Table 2; Figure 3C & 3D). This result demonstrates that reduced metabolic rates and increased ability to assimilate energy stores associated with cool temperatures mitigate the negative impacts of reduced oxygen availability (Jackson, 2007; Gangloff and Telemeco, 2018).

Swimming speed is an ecologically relevant trait important to predator avoidance and food acquisition in snakes (Jayne and Bennett, 1990; Kingsolver et al., 2001), that typically correlates (positively) with body length (Shine and Shetty, 2001; Aubret et al., 2015). Although this trend was found within each treatment group (Figure 4), it was not observed across treatments: snakes incubated under both hypoxia and high temperatures demonstrated the fastest swimming speeds compared to all other treatment groups, despite exhibiting the smallest body size on average (Table 3, Figure 4). Previous studies in other ectothermic species demonstrate that cool incubation temperatures produce faster swimmers (Shine, 1999; Angilletta and Dunham, 2003; Watkins and Vraspir, 2006; Gahm et al., 2020). At nine days post hatching, juveniles in this experiment did not follow this trend: juveniles from warm treatments (*i.e.*, LEH and EHEH) were faster swimmers than

their siblings from cool treatments (*i.e.*, LEC and EHEC) in both absolute and relative swimming speed. Most surprisingly, juveniles from the EHEH treatment were also faster than juveniles from LEH despite smaller body size and conditions of oxygen limitation (Figure 5A). One potential explanation for this finding is that warm incubation temperature and oxygen limitation may reduce the optimal temperature for performance (Gangloff and Telemeco, 2018). We suggest that juveniles from EHEH potentially reduced their optimal temperature for performance, thus swimming faster than the other groups at the test temperature of 25°C. Alternatively, exposure to hypoxia during development may have induced plastic changes in cardiovascular, muscular, or mitochondrial function to increase performance capacity (Eme et al., 2013; Sun et al., 2015; Galli et al., 2016). Further experiments directed towards quantifying the effects of incubation temperature on the entire thermal performance curve are necessary to fully characterize how incubation temperature influences both physiology and performance across a range of temperatures (Taylor et al., 2020).

After relocation to low elevation, juveniles from the EHEH treatment swam faster than siblings remaining at extreme high elevation, which maintained swimming speeds similar to other treatment groups measured at both extreme high and low elevation (Figure 5B). In birds and mammals the acclimation to high-elevation hypoxia can include an alteration of cardio-respiratory pathways, a modification of blood composition, and increased muscle performance (Monge and Leon-Velarde, 1991; Beall et al., 2002; Storz et al., 2004; Lague et al., 2016). Similar effects have been demonstrated in other reptiles (lungman and Piña, 2013; González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015; Wearing et al., 2015; Jochmans-Lemoine and Joseph, 2018; Gangloff et al., 2019). These modifications may allow the maintenance of locomotor performance such as swimming. Furthermore, these physiological and anatomical changes due to development in chronic hypoxia serve to improve performance under normoxic conditions, similar to athletes training at high altitudes for competition at sea level (*e.g.*, Khodae et al., 2016). Repeated measurements throughout ontogeny are necessary to quantify the time frame over which such compensatory mechanisms remain relevant (Mitchell et al., 2018a). Finally, although we cannot speculate on the adaptive value of such behavior at this stage, this response to a double constraint (high incubation temperature and low oxygen level) may be yet another case of informed dispersal in reptiles (as in *Zootoca vivipara*, Lichtenstein, 1823 and *Natrix maura*; Clobert et al., 2009; Bestion et al., 2015c; Aubret et al., 2016a): environmental clues may convey important information about the quality of the natal environment and foster dispersal behaviour and/or dispersal enhancing traits (*i.e.*, high locomotor performance). Importantly, the high level of observed maternal effects (Table S4) indicates the necessity of a split-clutch design in any experiment measuring similar traits in Squamate reptiles. Future work directed towards partitioning

this estimate into narrow-sense heritability and maternal effects will be important to predict the evolutionary response to novel conditions within populations, especially at the colonization front.

Our results suggest that even though body size, development, and physiology are altered, and hatching success is lowered, the majority of embryos developing in high-elevation hypoxia produced viable young snakes. Furthermore, these snakes were able to equal or exceed the swimming performance of snakes incubated under native conditions. We stress that the results of this experiment represent an extreme case of abiotic limitation (exposing developing embryos from low elevation to a 32°C incubation temperature and 72% sea-level equivalent O₂ availability). Such approaches are important to identify patterns among

4.7. Acknowledgements

We are grateful to the staff of Observatoire Midi-Pyrénées for logistical support in Pic du Midi de Bigorre as well as Isabel Verdaguer, Joaquim Soler and Zuleica Alonso for their help in the laboratory. This work was supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02), INTERREG POCTEFA ECTOPYR (no. EFA031/15), and the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 752299. All experimental protocols (including animal collection, housing, experimentation and release) were approved by the DREAL Midi-Pyrénées (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) and by the Préfectures of Ariège, Aude, Haute-Garonne, Hautes-Pyrénées and Pyrénées Orientales districts (Arrêté Préfectoral No. 2017-s-02 du 30 mars 2017) and ethical committee (APAFIS#16359-201808011445465 v4). All experiments were carried out in accordance with the approved guidelines. Animal caretakers and handlers were trained to use wildlife in scientific purposes (Decree No. 2013-118 du 01 février 2013 and approval of the Ministry of Agriculture under No. I-75-MNHN-F1-15 du 17 juin 2015).

4.8. Tables and figures

Table 1

Results of linear mixed-effect model testing for the effects of incubation temperature, incubation elevation, age at measurement (days post-oviposition), and their interaction on embryo developmental parameters in the snake *Natrix maura* (Test 1 Figure 2). The four incubation treatments are extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 51), extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 51), low elevation at 24°C (LEC; N = 51), and low elevation at 32°C (LEH; N = 49). Significant factors shown in bold with two (P < 0.01) or three (P < 0.001) asterisks.

	Egg mass	Embryo heart rates
Temperature	$F_{1,426.8} = 2602.33$; P < 0.001***	$F_{1,1142.3} = 635.04$; P < 0.001***
Elevation	$F_{1,283.7} = 8.02$; P = 0.003 **	$F_{1,1144.2} = 13.22$; P < 0.001***
Day	$F_{9,1130.0} = 30.92$; P < 0.001***	$F_{9,1179.6} = 11.82$; P < 0.001***
Temperature x Elevation	$F_{1,426.1} = 22.57$; P = 0.500	$F_{1,1143.0} = 9.61$; P = 0.002 **
Temperature x Day	$F_{4,1138.8} = 97.60$; P < 0.001***	$F_{4,1194.3} = 7.21$; P = 0.007 **
Elevation x Day	$F_{9,1139.8} = 5.66$; P < 0.001***	$F_{9,1191.2} = 2.38$; P = 0.123
Temperature x Elevation x Day	$F_{4,1138.5} = 5.75$; P < 0.001***	$F_{4,1191.8} = 0.24$; P = 0.626

Table 2

Results of linear mixed-effect model testing for the effect of incubation temperature, incubation elevation, and their interaction on the juvenile traits at hatching in the snake *Natrix maura* (Test 2, Figure 3). The four incubation treatments are low elevation at 24°C (LEC; N = 46), low elevation at 32°C (LEH; N = 45), extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 48), and extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 38). Least-squares means ± SE are given. Significant factors shown in bold with one (P < 0.05) two (P < 0.01) or three (P < 0.001) asterisks.

	EHEC	EHEH	LEC	LEH	Temperature effect	Elevation effect	Temperature x Elevation effect
	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	F (dfn, dfd) P-value	F (dfn, dfd) P-value	F (dfn, dfd) P-value
Hatching success	-	-	-	-	4.04 (1, 184.4) P = 0.046 *	2.43 (1, 185.2) P = 0.120	5.72 (1, 185.2) P = 0.018 *
Sex	-	-	-	-	0.09 (1, 163.7) P = 0.764	2.56 (1, 165.0) P = 0.112	0.22 (1, 166.9) P = 0.643
Incubation duration (days)	65.59 ± 0.42	36.59 ± 0.44	67.85 ± 0.43	33.93 ± 0.43	24415.32 (1, 158.4) P < 0.001***	0.99 (1, 158.8) P = 0.321	145.83 (1, 159.1) P < 0.001***
Total number of embryo heart beats	7650391 ± 105481	6954688 ± 111257	7689242 ± 105997	7036319 ± 106591	108.49 (1, 158.8) P < 0.001***	0.86 (1, 159.4) P = 0.355	0.11 (1, 159.9) P = 0.744
Body mass (g) at hatching	2.87 ± 0.12	2.56 ± 0.12	3.00 ± 0.12	2.97 ± 0.12	11.87 (1, 158.7) P < 0.001***	24.39 (1, 158.7) P < 0.001***	7.20 (1, 158.9) P = 0.008 **
Body length (cm) at hatching	15.30 ± 0.20	14.09 ± 0.21	15.37 ± 0.20	14.58 ± 0.20	67.12 (1, 158.8) P < 0.001***	5.27 (1, 159.3) P = 0.023 *	2.83 (1, 159.8) P = 0.094
Body condition at hatching	-0.029 ± 0.010	-0.007 ± 0.010	-0.015 ± 0.010	0.031 ± 0.010	30.95 (1, 158.8) P < 0.001***	18.47 (1, 159.3) P < 0.001***	3.69 (1, 159.9) P = 0.056
Residual egg yolk (g)	0.655 ± 0.055	0.431 ± 0.061	0.815 ± 0.056	0.456 ± 0.56	34.61 (1, 60.8) P < 0.001***	3.46 (1, 162.0) P = 0.065	1.81 (1, 163.4) P = 0.180

Table 3

Results of linear mixed-effect model testing for the effect of incubation temperature, incubation elevation, age at measurement (days post-hatching), test elevation, and their interaction on the maximum swimming performance in juveniles in the snake *Natrix maura* (Tests 3 & 4, Figure 4 & 5). Sex and total body length (TL) were included as covariates. The four incubation treatments are extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 41), extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 37), low elevation at 24°C (LEC; N = 41), and low elevation at 32°C (LEH; N = 41). Significant factors shown in bold with one (P < 0.05) two (P < 0.01) or three (P < 0.001) asterisks.

	F (dfn, dfd)	P-value
Sex	0.70 (1,145.5)	P = 0.401
Total body length (cm)	73.81 (1,169.2)	P < 0.001 ***
Temperature	49.80 (1,156.4)	P < 0.001 ***
Elevation	0.45 (1,165.5)	P = 0.501
Day	12.62 (3,500.6)	P < 0.001 ***
Location of test	0.02 (1,442.8)	P = 0.964
Temperature x Elevation	0.002 (1,163.5)	P = 0.962
Temperature x Day	4.84 (3,506.1)	P = 0.003 **
Temperature x Location of test	0.01 (1,442.8)	P = 0.909
Elevation x Day	1.14 (3,487.8)	P = 0.331
Elevation x Location of test	9.80 (1,440.7)	P = 0.002 **
Day x Location of test	13.85 (2,460.9)	P < 0.001 ***
Temperature x Elevation x Day effect	0.18 (3,487.1)	P = 0.913
Temperature x Elevation x Location of test	0.04 (1,446.9)	P = 0.839
Temperature x Day x Location of test	3.25 (2,457.5)	P = 0.040 *
Elevation x Day x Location of test	0.04 (2,456.9)	P = 0.961
Temperature x Elevation x Day x Location of test	0.79 (2,456.6)	P = 0.456

Figure 1

Experimental design. Eggs were collected from gravid females (represented by different colors) sampled from low-elevation population of the snake *Natrix maura* in the foothills of the Pyrenees, France (412 m to 715 m ASL). Within 24hr of oviposition clutches were evenly split into four groups of eggs with similar average egg mass. For each clutch two quarter-clutches were transplanted to the extreme high elevation site (2877 m ASL, Observatoire Midi-Pyrénées du Pic du Midi de Bigorre), with one quarter-clutch incubated at 24°C and the other at 32°C. The two remaining quarter-clutches were incubated at 24°C and at 32°C at the low-elevation site (436 m ASL, Station d'Ecologie Théorique et Expérimentale du Centre National de la Recherche Scientifique). Egg mass and embryo heart rate were measured throughout incubation (Test 1). At hatching a number of phenotypic traits were measured in juveniles (Test 2). All hatchlings were first tested for swimming performance in the environment their eggs were incubated (Test 3). Each treatment was then again split in half with half of each treatment group translocated to the alternative environment for additional swimming measures (Test 4). Snake color represents incubation temperature treatment (cool or warm) and snake pattern represents incubation elevation treatment (low or extreme high elevation).

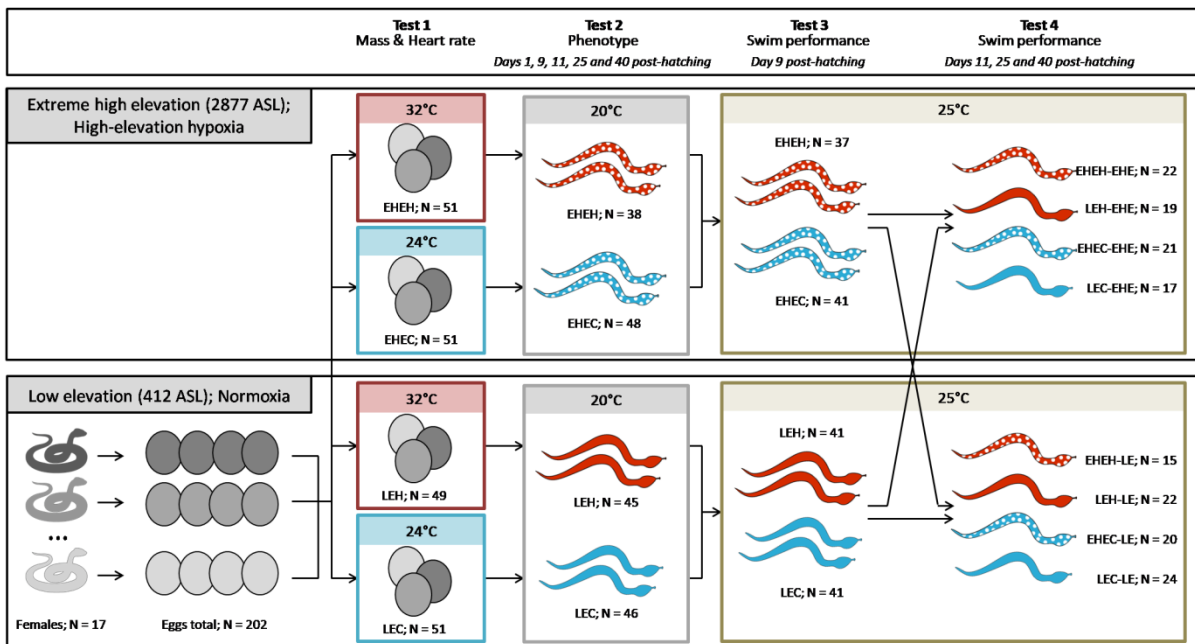


Figure 2

Egg mass (A) and embryo heart rate (B) measured at the same temperature as the incubation temperature through incubation duration in the snake *Natrix maura* at extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 51; blue triangle), extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 51; red triangle), low elevation at 24°C (LEC; N = 51; blue circle), and low elevation at 32°C (LEH; N = 49; red circle). Least-squares means \pm SE estimated by linear mixed-effect models are plotted.

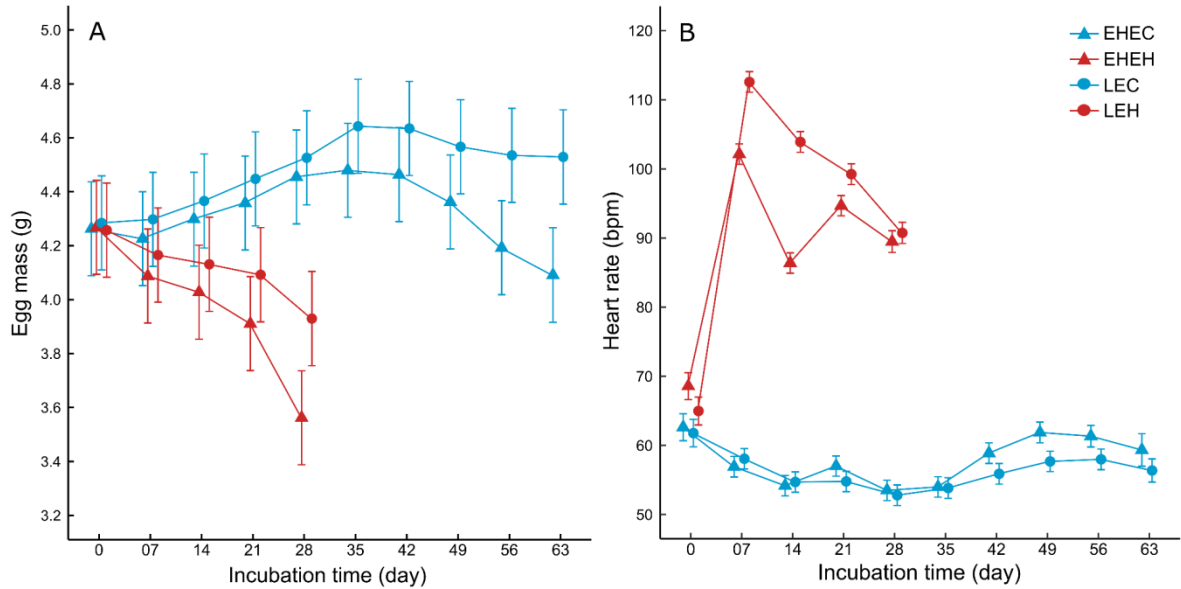


Figure 3

Hatching phenotypes in juveniles of the snake *Natrix maura*: incubation duration (A), total number of embryo heartbeats (B), body mass (C), body size (D), body condition (E), and residual egg yolk (F) for each incubation treatment: low elevation at 24°C (LEC; N = 46; blue circle), extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 48; blue triangle), low elevation at 32°C (LEH; N = 45; red circle), and extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 38; red triangle). Least-squares means \pm SE estimated by linear mixed-effect models are plotted. Significant differences between least-squares means are shown with one ($P < 0.05$) or three ($P < 0.001$) asterisks.

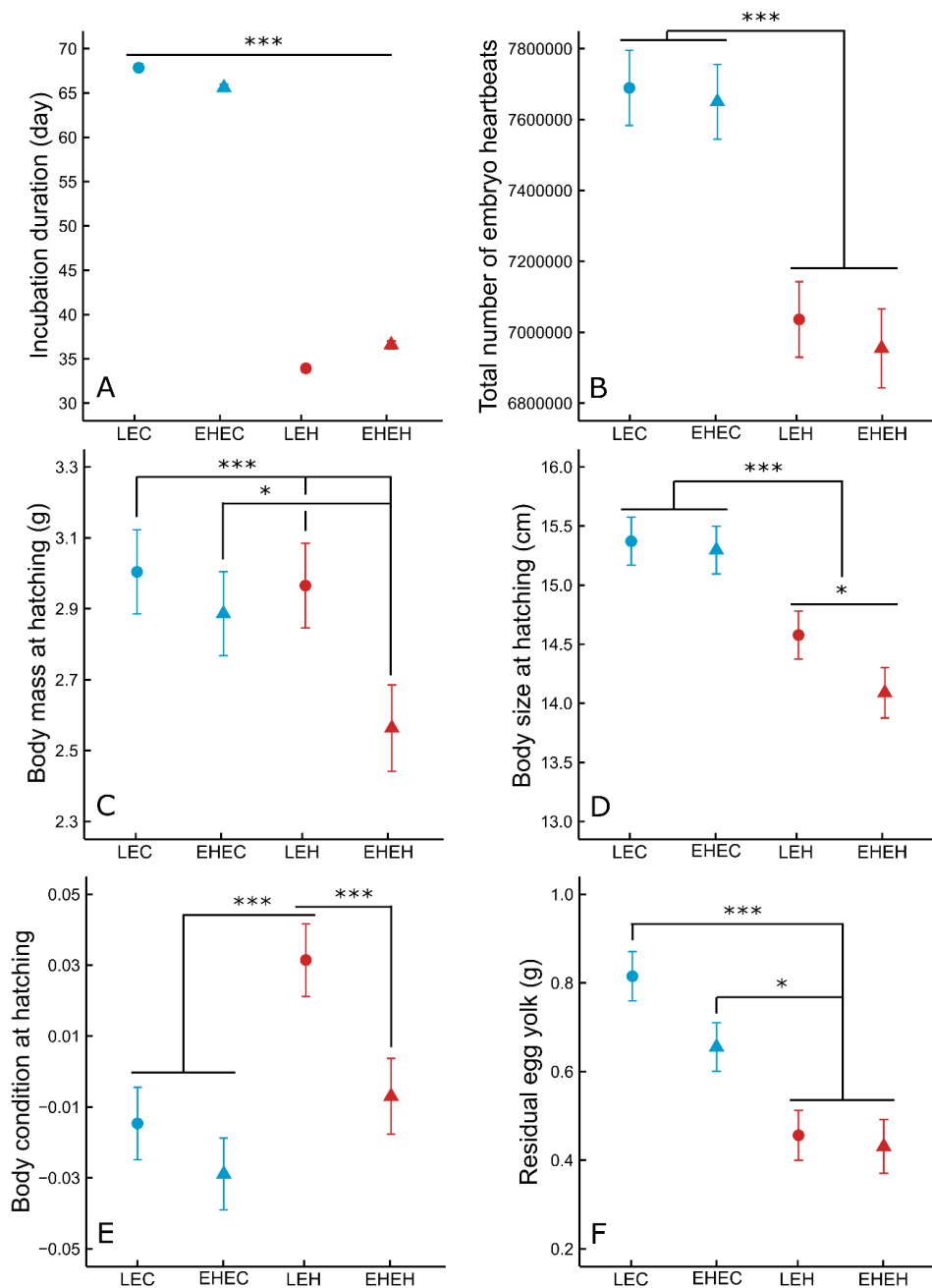


Figure 4

Maximum swimming speed as a function of body length in juveniles of the snake *Natrix maura* incubated in four treatments: low elevation at 24°C (LEC; N = 41; blue circle), extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 41; blue triangle), low elevation at 32°C (LEH; N = 41; red circle), and extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 37; red triangle). Raw data for each individual are plotted with regression lines and 95% CI.

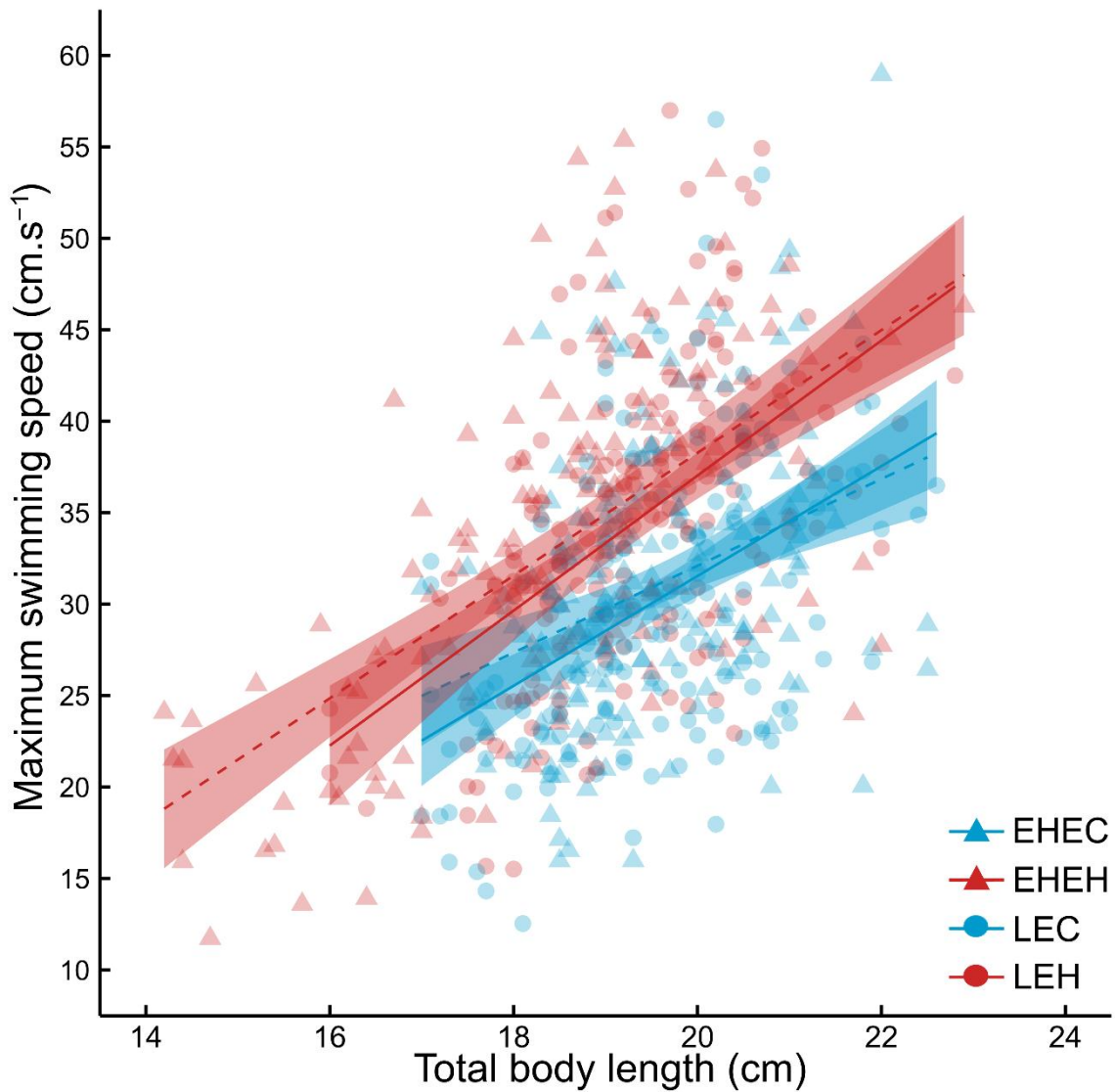
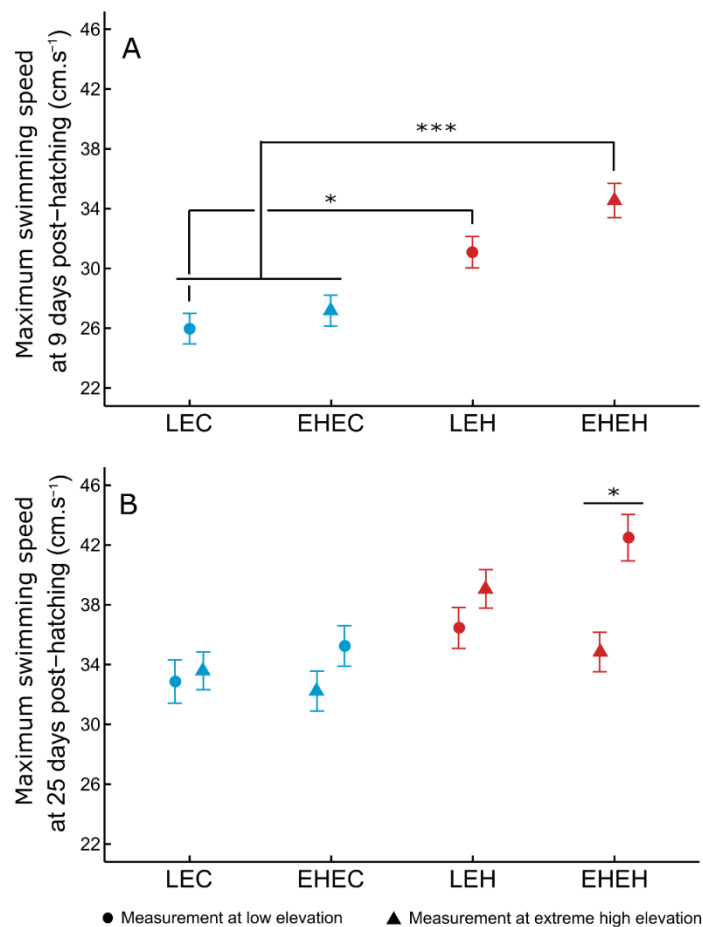


Figure 5

Maximum swimming speed in juveniles of the snake *Natrix maura* for each incubation treatment. First at 9 days post-hatching (A) at elevation of incubation (low elevation or extreme high elevation) for all juveniles of the four incubation treatments: low elevation at 24°C (LEC; N = 41; blue circle) extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 41; blue triangle), low elevation at 32°C (LEH; N = 41; red circle), and extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 37; red triangle). Second, at 11 days post-hatching (B) at the same elevation as incubation for half of the juveniles: low elevation at 24°C (LEC-LE; N = 24; blue circle), extreme high elevation at 24°C (EHEC-EHE; N = 21; blue triangle), low elevation at 32°C (LEH-LE; N = 22; red circle), and extreme high elevation at 32°C (EHEH-EHE; N = 22; red triangle). Also at 11 days post-hatching (B) at opposite elevation as incubation for the other half of the juveniles: low elevation at 24°C (LEC-EHE; N = 17; blue triangle), extreme high elevation at 24°C (EHEC-LE; N = 20; blue circle), low elevation at 32°C (LEH-EHE; N = 19; red triangle), and extreme high elevation at 32°C (EHEH-LE; N = 15; red circle). Least-squares means \pm SE estimated by linear mixed-effect models are plotted. Significant differences between least-squares means are shown with one ($P < 0.05$) or three ($P < 0.001$) asterisks.



Supplementary table 1

Results of the pairwise comparison of least-squares means and adjusted p-values for multiple comparisons with the Tukey method from the linear mixed-effect model testing for the effect of incubation temperature, incubation elevation, age at measurement (day post hatching), and their interaction on embryo traits in the snake *Natrix maura*. The four incubation treatments are extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 51), extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 51), low elevation at 24°C (LEC; N = 51), and low elevation at 32°C (LEH; N = 49). Significant differences between least-squares means shown in bold with one (P <0.05) two (P < 0.01) or three (P < 0.001) asterisks.

	Egg mass			Embryo heart rate		
	Estimate	SE	P-value	Estimate	SE	P-value
EHEC D0 - EHEH D0	-0.005	0.090	1.000	-5.941	2.650	0.971
EHEC D0 - LEC D0	-0.022	0.090	1.000	0.851	2.676	1.000
EHEC D0 - LEH D0	0.005	0.091	1.000	-2.348	2.703	1.000
EHEH D0 - LEC D0	-0.016	0.090	1.000	6.792	2.675	0.868
EHEH D0 - LEH D0	0.010	0.091	1.000	3.593	2.702	1.000
LEC D0 - LEH D0	0.027	0.091	1.000	-3.199	2.726	1.000
EHEC D0 - EHEC D7	0.037	0.040	1.000	5.708	2.352	0.920
EHEH D0 - EHEH D7	0.180	0.040	0.005 **	-33.564	2.343	< 0.001 ***
LEC D0 - LEC D7	-0.013	0.041	1.000	3.706	2.372	1.000
LEH D0 - LEH D7	0.092	0.041	0.971	-47.589	2.411	< 0.001 ***
EHEC D7 - EHEH D7	0.138	0.090	1.000	-45.213	1.976	< 0.001 ***
EHEC D7 - LEC D7	-0.072	0.091	1.000	-1.150	1.976	1.000
EHEC D7 - LEH D7	0.061	0.091	1.000	-55.645	1.986	< 0.001 ***
EHEH D7 - LEC D7	-0.210	0.090	0.949	44.063	1.965	< 0.001 ***
EHEH D7 - LEH D7	-0.078	0.091	1.000	-10.432	1.975	< 0.001 ***
LEC D7 - LEH D7	0.132	0.091	1.000	-54.494	1.975	< 0.001 ***
EHEC D7 - EHEC D14	-0.072	0.040	0.999	2.747	1.975	1.000
EHEH D7 - EHEH D14	0.060	0.041	1.000	15.755	1.964	< 0.001 ***
LEC D7 - LEC D14	-0.068	0.041	1.000	3.367	1.964	1.000
LEH D7 - LEH D14	0.034	0.041	1.000	8.671	1.995	0.009 **
EHEC D14 - EHEH D14	0.271	0.090	0.528	-32.205	1.965	< 0.001 ***
EHEC D14 - LEC D14	-0.068	0.091	1.000	-0.530	1.966	1.000
EHEC D14 - LEH D14	0.167	0.091	0.999	-49.721	1.986	< 0.001 ***
EHEH D14 - LEC D14	-0.338	0.091	0.095	31.675	1.965	< 0.001 ***
EHEH D14 - LEH D14	-0.103	0.091	1.000	-17.516	1.986	< 0.001 ***

CHAPITRE 4. HYPOXIE D'ALTITUDE ET TEMPÉRATURES

LEC D14 - LEH D14	0.235	0.091	0.847	-49.191	1.986	< 0.001 ***
EHEC D14 - EHEC D21	-0.060	0.041	1.000	-2.838	1.955	1.000
EHEH D14 - EHEH D21	0.117	0.041	0.634	-8.294	1.955	0.014 *
LEC D14 - LEC D21	-0.082	0.041	0.996	-0.082	1.964	1.000
LEH D14 - LEH D21	0.039	0.042	1.000	4.660	2.006	0.953
EHEC D21 - EHEH D21	0.447	0.090	0.001 ***	-37.661	1.946	< 0.001 ***
EHEC D21 - LEC D21	-0.090	0.091	1.000	2.226	1.956	1.000
EHEC D21 - LEH D21	0.266	0.091	0.597	-42.224	1.976	< 0.001 ***
EHEH D21 - LEC D21	-0.537	0.091	< 0.001 ***	39.887	1.956	< 0.001 ***
EHEH D21 - LEH D21	-0.181	0.091	0.995	-4.563	1.977	0.957
LEC D21 - LEH D21	0.356	0.091	0.059	-44.450	1.986	< 0.001 ***
EHEC D21 - EHEC D28	-0.097	0.041	0.937	3.511	1.955	0.999
EHEH D21 - EHEH D28	0.349	0.041	< 0.001 ***	5.196	2.024	0.852
LEC D21 - LEC D28	-0.078	0.041	0.998	1.992	1.975	1.000
LEH D21 - LEH D28	0.163	0.042	0.047 *	8.500	2.028	0.017 *
EHEC D28 - EHEH D28	0.893	0.090	< 0.001 ***	-35.976	2.034	< 0.001 ***
EHEC D28 - LEC D28	-0.071	0.091	1.000	0.707	1.977	1.000
EHEC D28 - LEH D28	0.525	0.091	< 0.001 ***	-37.235	2.009	< 0.001 ***
EHEH D28 - LEC D28	-0.964	0.091	< 0.001 ***	36.683	2.045	< 0.001 ***
EHEH D28 - LEH D28	-0.368	0.091	0.037 *	-1.259	2.076	1.000
LEC D28 - LEH D28	0.596	0.091	< 0.001 ***	-37.942	2.019	< 0.001 ***
EHEC D28 - EHEC D35	-0.025	0.041	1.000	-0.490	1.964	1.000
LEC D28 - LEC D35	-0.117	0.041	0.651	36.683	2.045	< 0.001 ***
EHEC D35 - LEC D35	-0.163	0.091	0.999	-1.259	2.076	1.000
EHEC D35 - EHEC D42	0.016	0.041	1.000	-37.942	2.019	< 0.001 ***
LEC D35 - LEC D42	0.008	0.041	1.000	-4.892	1.975	0.898
EHEC D42 - LEC D42	-0.171	0.091	0.998	2.991	1.986	1.000
EHEC D42 - EHEC D49	0.101	0.041	0.903	-2.988	1.996	1.000
LEC D42 - LEC D49	0.068	0.041	1.000	-1.792	1.975	1.000
EHEC D49 - LEC D49	-0.205	0.091	0.966	4.187	1.987	0.989
EHEC D49 - EHEC D56	0.170	0.041	0.022 *	0.534	2.054	1.000
LEC D49 - LEC D56	0.032	0.041	1.000	-0.299	1.975	1.000
EHEC D56 - LEC D56	-0.342	0.091	0.086	3.355	2.046	1.000
EHEC D56 - EHEC D63	0.101	0.046	0.977	1.994	2.741	1.000
LEC D56 - LEC D63	0.006	0.043	1.000	1.614	2.130	1.000
EHEC D63 - LEC D63	-0.438	0.094	0.003 **	2.974	2.805	1.000

1 **Supplementary table 2**

2 Results of the pairwise comparison of least-squares means and adjusted p-values for multiple
 3 comparisons with the Tukey method from the linear mixed-effect model testing for the effect of
 4 incubation temperature, incubation elevation, and their interaction on the juvenile traits in the snake
 5 *Natrix maura*. The four incubation treatments are low elevation at 24°C (LEC), low elevation at 32°C
 6 (LEH), extreme high elevation at 24°C (EHEC), and extreme high elevation at 32°C (EHEH). Significant
 7 differences between least-squares means shown in bold with one (P < 0.05) or three (P < 0.001)
 8 asterisks.

9

	Hatching success	Sex	Incubation duration (day)	Total number of heart beats	Body mass at hatching (g)	Body size at hatching (cm)	Body condition at hatching	Residual egg yolk (g)
EHEC - EHEH	0.194 ± 0.062 P = 0.011 *	0.058 ± 0.011 P = 0.951	29.01 ± 0.29 P < 0.001 ***	695703 ± 94019 P < 0.001 ***	0.323 ± 0.076 P = 0.011 *	1.21 ± 0.18 P < 0.001 ***	-0.022 ± 0.009 P = 0.064	0.225 ± 0.072 P = 0.011 *
EHEC - LEC	0.037 ± 0.062 P = 0.935	-0.086 ± 0.010 P = 0.840	-2.25 ± 0.28 P < 0.001 ***	-38851 ± 88811 P = 0.972	-0.118 ± 0.072 P = 0.359	-0.07 ± 0.17 P = 0.971	-0.015 ± 0.008 P = 0.311	-0.160 ± 0.068 P = 0.091
EHEC - LEH	0.020 ± 0.063 P = 0.989	-0.099 ± 0.010 P = 0.780	31.66 ± 0.28 P < 0.001 ***	614072 ± 88776 P < 0.001 ***	-0.079 ± 0.072 P = 0.687	0.72 ± 0.17 P < 0.001 ***	-0.061 ± 0.008 P < 0.001 ***	0.199 ± 0.068 P = 0.020 *
EHEH - LEC	-0.157 ± 0.062 P = 0.058	-0.144 ± 0.011 P = 0.559	-31.26 ± 0.29 P < 0.001 ***	-734554 ± 94583 P < 0.001 ***	-0.441 ± 0.077 P < 0.001 ***	-1.28 ± 0.18 P < 0.001 ***	0.008 ± 0.009 P = 0.828	-0.384 ± 0.072 P < 0.001 ***
EHEH - LEH	-0.174 ± 0.063 P = 0.030 *	-0.157 ± 0.011 P = 0.493	2.66 ± 0.30 P < 0.001 ***	-81631 ± 95322 P = 0.827	-0.402 ± 0.077 P < 0.001 ***	-0.49 ± 0.18 P = 0.036 *	-0.038 ± 0.009 P < 0.001 ***	-0.025 ± 0.073 P = 0.985
LEC - LEH	-0.017 ± 0.063 P = 0.993	-0.013 ± 0.011 P = 0.999	33.91 ± 0.28 P < 0.001 ***	652923 ± 89836 P < 0.001 ***	0.039 ± 0.073 P = 0.951	0.79 ± 0.17 P < 0.001 ***	0.046 ± 0.008 P < 0.001 ***	0.359 ± 0.069 P < 0.001 ***

10 **Supplementary table 3**

11 Results of the pairwise comparison of least-squares means and adjusted p-values for multiple
 12 comparisons with the Tukey method from the linear mixed-effect model testing for the effect of
 13 incubation temperature, incubation elevation, age at measurement (days post-hatching), test
 14 location, and their interaction on the maximum swimming performance in juveniles of the snake
 15 *Natrix maura*. The four incubation treatments are extreme high elevation at 24°C (EHEC; N = 41),
 16 extreme high elevation at 32°C (EHEH; N = 37), low elevation at 24°C (LEC; N = 41), and low elevation
 17 at 32°C (LEH; N = 41). Significant factors shown in bold with one (P < 0.05) or three (P < 0.001)
 18 asterisks.

19

	<i>Estimate</i>	<i>SE</i>	<i>P-value</i>
EHEC D9 - EHEH D9	-7.358	1.386	< 0.001 ***
EHEC D9 - LEC D9	1.211	1.290	1.000
EHEC D9 - LEH D9	-3.905	1.305	0.423
EHEH D9 - LEC D9	8.568	1.396	< 0.001 ***
EHEH D9 - LEH D9	3.453	1.339	0.752
LEC D9 - LEH D9	-5.115	1.308	0.035 *
EHEC D9 - EHEC-EHE D11	3.416	1.330	0.761
EHEC D9 - EHEC-LE D11	1.872	1.356	1.000
EHEH D9 - EHEH-EHE D11	3.237	1.320	0.836
EHEH D9 - EHEH-LE D11	4.531	1.541	0.463
LEC D9 - LEC-LE D11	2.853	1.262	0.925
LEC D9 - LEC-EHE D11	-0.586	1.450	1.000
LEH D9 - LEH-LE D11	1.436	1.307	1.000
LEH D9 - LEH-EHE D11	-2.419	1.397	0.998
EHEC-EHE D11 - EHEC-LE D11	-1.543	1.710	1.000
EHEH-EHE D11 - EHEC-LE D11	5.993	1.785	0.187
LEC-EHE D11 - LEC-LE D11	3.439	1.733	0.985
LEH-EHE D11 - LEH-LE D11	3.855	1.718	0.932
EHEC-EHE D11 - EHEC-EHE D25	-8.464	1.450	< 0.001 ***
EHEC-LE D11 - EHEC-LE D25	-9.940	1.489	< 0.001 ***
EHEH-EHE D11 - EHEH-EHE D25	-3.538	1.420	0.811
EHEH-LE D11 - EHEH-LE D25	-12.488	1.733	< 0.001 ***
LEC-EHE D11 - LEC-EHE D25	-6.313	1.610	0.034 *
LEC-LE D11 - LEC-LE D25	-10.467	1.357	< 0.001 ***
LEH-EHE D11 - LEH-EHE D25	-2.962	1.532	0.990

CHAPITRE 4. HYPOXIE D'ALTITUDE ET TEMPÉRATURES

LEH-LE D11 - LEH-LE D25	-9.403	1.443	< 0.001 ***
EHEC-EHE D25 - EHEC-LE D25	-3.020	1.709	0.998
EHEH-EHE D25 - EHEH-LE D25	-7.656	1.831	0.013 *
LEC-EHE D25 - LEC-LE D25	-0.714	1.734	1.000
LEH-EHE D25 - LEH-LE D25	-2.586	1.714	1.000
EHEC-EHE D25 - EHEC-EHE D40	-2.137	1.448	1.000
EHEC-LE D25 - EHEC-LE D40	-0.724	1.485	1.000
EHEH-EHE D25 - EHEH-EHE D40	-2.375	1.417	0.999
EHEH-LE D25 - EHEH-LE D40	4.279	1.719	0.813
LEC-EHE D25 - LEC-EHE D40	-2.154	1.609	1.000
LEC-LE D25 - LEC-LE D40	0.607	1.355	1.000
LEH-EHE D25 - LEH-EHE D40	-2.342	1.525	1.000
LEH-LE D25 - LEH-LE D40	4.080	1.419	0.517
EHEC-EHE D40 - EHEC-LE D40	-1.607	1.709	1.000
EHEH-EHE D40 - EHEH-LE D40	-1.002	1.835	1.000
LEC-EHE D40 - LEC-LE D40	2.046	1.735	1.000
LEH-EHE D40 - LEH-LE D40	3.836	1.714	0.934

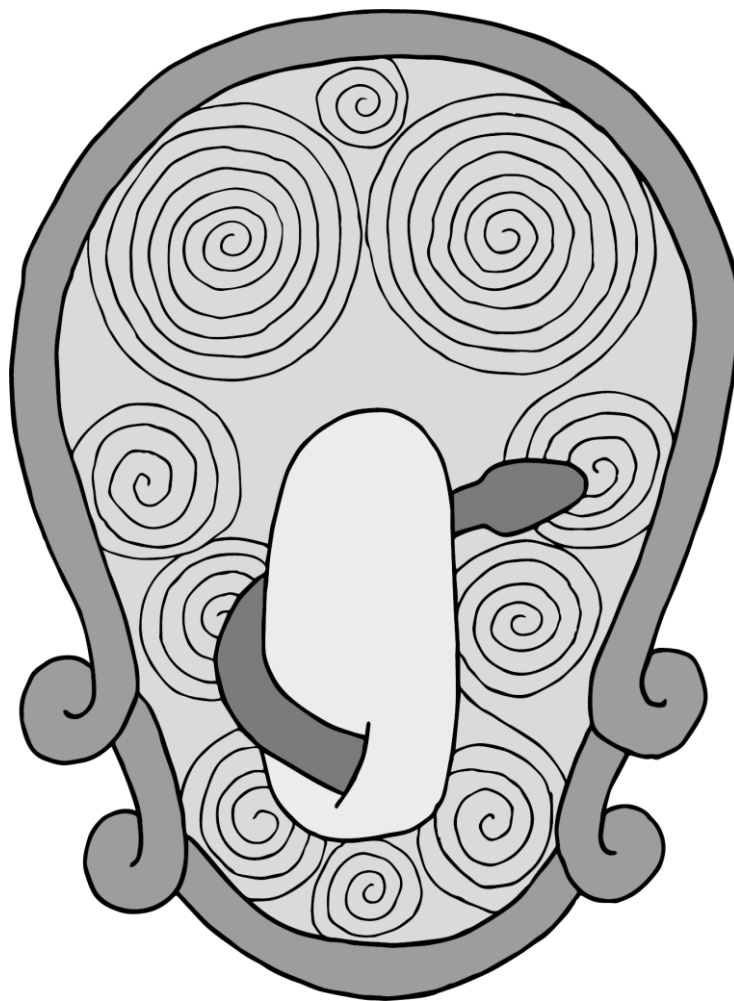
Supplementary table 4

Residual variance estimates from linear and generalized linear mixed models. Traits were measured in embryos and in juveniles of the snake *Natrix maura*. The significance of model fit improved by inclusion of clutch as a random effect is indicated by one (P < 0.05) two (P < 0.01) or three (P < 0.001) asterisks. See text for model details.

	Residual	Individual	Clutch				
	variance	variance	variance	Proportion of residual variance	χ^2	Df	P-value
Egg mass	0.041	0.165	0.418	0.67	197.48	1	< 0.001 ***
Embryo heart rate	94.550	0.000	3.765	0.038	13.50	1	0.999
Hatching success	0.252	-	0.000	~ 0	4.23	1	0.040 *
Sex	0.097	-	0.007	0.067	2.27e-13	1	> 0.99
Incubation duration	1.754	-	2.252	0.56	104.20	1	< 0.001 ***
Total number of heart beats	1.815 x10 ¹¹	-	1.137 x10 ¹¹	0.39	51.59	1	< 0.001 ***
Residual egg yolk	0.107	-	0.011	0.093	5.95	1	0.015 *
Body mass at hatching	0.119	-	0.182	0.60	120.86	1	< 0.001 ***
Body size at hatching	0.646	-	0.426	0.40	53.71	1	< 0.001 ***
Body condition at hatching	0.002	-	0.001	0.33	59.78	1	< 0.001 ***
Swimming speed	22.010	11.697	3.186	0.086	9.72	1	0.002 **

Chapitre 5.

EFFETS DE L'HYPOXIE D'ALTITUDE SUR LE MÉTABOLISME RESPIRATOIRE DES EMBRYONS ET DES JUVÉNILES



5.1. Présentation et hypothèses du chapitre

Ce chapitre tente de mettre en évidence les effets de l'hypoxie d'altitude sur le métabolisme des embryons pendant l'incubation puis chez les juvéniles. Chez les reptiles, les niveaux métaboliques peuvent être reliés aux battements cardiaques mais peuvent aussi être estimés à travers des mesures de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone. Les réponses physiologiques du métabolisme respiratoire mesurées chez les embryons puis chez les juvéniles pourraient indiquer des modifications physiques du système cardiovasculaire ou des modifications biochimiques de la composition du sang. Dans le contexte du réchauffement climatique, si une remontée altitudinale de l'espèce pourrait dans un premier temps être envisageable (*cf. Chapitre 3*), elle pourrait être limitée par un métabolisme réduit ou amélioré par la plasticité développementale des embryons. Pour cela, l'activité respiratoire ainsi que les battements cardiaques ont été mesurés chez des embryons de Couleuvre vipérine à la température optimale d'incubation connue pour cette espèce (*i.e.* 28°C). Un lot était placé en normoxie et un deuxième lot en hypoxie (*i.e.* 70% de l'oxygène disponible à 2 877 m d'altitude). À l'éclosion, les mesures de l'activité respiratoire des juvéniles s'est poursuivie à une température de repos de 20°C. Ce chapitre tente également de définir si une plasticité comportementale maternelle, en plaçant les femelles gravides en hypoxie, pourrait améliorer l'adaptation développementale des embryons dans ces conditions. En effet, bien qu'il n'y ait pas de soins parentaux après la ponte, les comportements de thermorégulation des femelles peuvent modifier les premières étapes du développement (*cf. section 1.3.3*) permettant aux embryons de se préparer aux conditions futures qu'ils rencontreront durant l'incubation. L'activité respiratoire des embryons et des juvéniles de ce troisième lot a également été mesurée.

Dans ce contexte, nous prédisons qu'en condition hypoxique et à une température optimale de développement ou de maintien:

- La fréquence cardiaque des embryons, la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone seront diminuées indiquant une réduction du métabolisme.
- La durée de développement ne sera pas impactée.
- La réduction du métabolisme durant le développement va modifier le phénotype à l'éclosion avec des juvéniles plus petits
- La consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone des juvéniles seront diminuées indiquant également une réduction du métabolisme.
- Néanmoins, pour les embryons issus des mères gravides maintenues en condition d'hypoxie, la réduction du métabolisme embryonnaire et juvénile ainsi que les modifications du phénotype devrait être moins marquée

L'article présenté dans ce chapitre est en actuellement en préparation :

Souchet J, Josserand A, Darnet E, Le Chevalier H, Trochet A, Bertrand R, Clobert J, Calvez O, Martinez-Sylvestre A, Guillaume O, Mossoll-Torres M, Barthe L, Pottier G, Philippe H, Aubret F & Gangloff EJ.
High-elevation hypoxia alters embryonic and juvenile metabolism in the viperine snake.

5.2. Résumé

La colonisation d'un nouvel environnement implique, pour les espèces, de s'adapter à des conditions rarement rencontrées dans l'histoire récente des populations. En milieu montagneux, les individus doivent faire face à une pression atmosphérique plus faible en altitude et donc à une disponibilité réduite en dioxygène. Les réponses physiologiques induites par ce stress pourraient favoriser la survie de la progéniture durant une hypoxie chronique, contribuant ainsi à l'invasion des écosystèmes alpins en réponse au réchauffement climatique. Pour tester cette réponse à l'hypoxie de haute altitude chez la couleuvre vipérine, *Natrix Maura*, nous avons maintenu artificiellement des femelles gravides de populations de basse altitude en haute altitude (*i.e.* hypoxie d'altitude) et leurs embryons ont également été incubés en haute altitude. Un autre groupe de femelles gravides a été maintenu en basse altitude (*i.e.* normoxie) et la moitié de leurs embryons ont été incubés à cette altitude, l'autre moitié ont été transplantés en haute altitude. Les embryons incubés en haute altitude ont présenté une réduction du métabolisme à la fin de l'incubation. Ces réactions ont pu contribuer à maintenir une durée d'incubation, un succès d'éclosion ou un phénotype d'éclosion similaire aux juvéniles incubés à basse altitude. Néanmoins, après avoir été maintenus en haute altitude, les juvéniles présentent un métabolisme réduit et une hyperventilation par rapport aux juvéniles maintenus à basse altitude. Enfin, la gestation des femelles en haute altitude n'a pas affectée les réponses des embryons et des juvéniles à l'hypoxie d'altitude. Ces résultats soulignent le rôle de la plasticité physiologique dans le maintien des phénotypes pertinents pour la forme physique dans les environnements de haute altitude.

Mots-clés : *Métabolisme embryonnaire; Métabolisme juvénile; Natrix maura; Hypoxie d'altitude; Consommation de dioxygène; Production de dioxyde de carbone*

High-elevation hypoxia alters embryonic and juvenile metabolism in the viperine snake

Jérémie Souchet^{1,*}, Alicia Josserand¹, Elodie Darnet¹, Hugo Le Chevalier¹, Audrey Trochet², Romain Bertrand¹, Jean Clobert¹, Olivier Calvez¹, Albert Martinez-Silvestre³, Olivier Guillaume¹, Marc Mossoll-Torres^{4,5}, Laurent Barthe^{2,6}, Gilles Pottier⁶, Hervé Philippe^{1,7}, Fabien Aubret^{1,8} & Eric J. Gangloff^{1,9}

- 1- Station d'Ecologie Théorique et Expérimentale du Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5321 CNRS – Université Paul Sabatier, 09200 Moulis, France.
- 2- Société Herpétologique de France, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP41, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France
- 3- Catalonia Reptile and Amphibian Rescue Center (CRARC), 08783 Masquefa, Barcelona, Spain
- 4- Bomosa, Pl. Parc de la Mola, 10 Torre Caldea 7º, AD700 Les Escaldes, Andorra
- 5- Pirenia, c/ de la rectoria, 2 Casa Cintet, AD200 Encamp, Andorra*
- 6- Nature En Occitanie, 14 rue de Tivoli, 31 000 Toulouse
- 7- Département de Biochimie, Centre Robert-Cedergren, Université de Montréal, Montréal, Canada
- 8- School of Molecular and Life Sciences, Curtin University, Brand Drive, Bentley, WA 6102, Australia
- 9- Department of Zoology, Ohio Wesleyan University, Delaware, Ohio, USA

*Corresponding author. E-mail: jeremie.souchet@gmail.com

Authors contributions

JS, EJM and FA contributed to experimental design and logistics. JS and AJ conducted experiments. JS and EJM conducted statistical analyses. JS, AJ, FA and EJM drafted the manuscript. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

5.3. Introduction

In mountainous regions, the impacts of climate change are particularly pronounced (Nogués-Bravo et al., 2008; Chen et al., 2011; Dirnböck et al., 2011). Formerly inhospitable habitats at high elevations have warmed up and become thus thermally suitable for some low-altitude species (Parmesan, 2006; Sinervo et al., 2010, 2018; Pauchard et al., 2016). Nevertheless, the colonization of this novel environment depends on the species ability to adapt to the specific conditions at high altitude, which have been rarely encountered in the recent history of populations (Schluter, 2000; Aubret, 2013). In particular, individuals need to cope with low levels of atmospheric pressure and thus reduced oxygen availability (*i.e.* high-elevation hypoxia; (Bouverot, 1985; Powell and Hopkins, 2010). In oviparous reptiles, most of the embryonic development occurs after the eggs are laid in unattended subterranean nests (Packard and Packard, 1988; Ackerman and Lott, 2004). As a result, embryos must adjust to adverse soil conditions, notably to consistent low oxygen levels and fluctuations in gas concentrations (Packard and Packard, 1988; Deeming and Thompson, 1991; Ackerman and Lott, 2004). For instance, for reptiles embryo the gas exchange is diffusion-limited, likely constraining their ability to compensate for reduced oxygen availability through increased oxygen transport capacity (Vitt and Caldwell, 2013). Nevertheless, exposure to hypoxia (not only high-elevation hypoxia) during development may have induced plastic changes in cardiovascular, muscular, or mitochondrial function to increase performance capacity (Eme et al., 2013; Sun et al., 2015; Galli et al., 2016). Such stress-induced physiological responses might promote offspring survival when the partial pressure of O₂ is consistently low. Therefore, through rapid adaptive evolutionary responses to life at high elevation (Rezende et al., 2005), oviparous species may be able to colonize alpine ecosystems in response to climate warming (Storz et al., 2010; Ortega et al., 2016).

The acclimatation of reptiles to hypoxia vary depending on the Order (*i.e.*, *Testudines*, *Squamata*, *Crocodylia*; Porteus et al., 2011) and include an alteration of cardio-respiratory pathways, a modification of blood composition, and increased muscle performance (lungman and Piña, 2013; González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015; Wearing et al., 2015; Jochmans-Lemoine and Joseph, 2018; Gangloff et al., 2019). However, those responses are related to the hypoxia during the embryo development induced by the burial of eggs in subterranean nests (Kam, 1993; Crossley and Altimiras, 2005; lungman and Piña, 2013; Cordero et al., 2017b; Wearing et al., 2017; Williamson et al., 2017). The effects of high-elevation hypoxia during this stage have only received recent interest, especially on *Squamata* (lizards: Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Li et al., 2020; snakes: Souchet et al., 2020). In general, the embryos of lizards' species respond to the low level of oxygen at high-elevations by a reduction of the metabolic rates without modifying the embryonic development

or, the phenotype of juveniles at hatching (Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Li et al., 2020). Conversely, the embryo of viperine snake showed higher metabolic rates with as results the reduction of hatchling phenotype (Souchet et al., 2020).

In order to assess the potential impact of high-elevation hypoxia on the cardio respiratory system of snake and the effect of maternal parental care before laying in high-elevation hypoxia, we exposed gravid females and eggs of viperine snake, *Natrix maura* (Colubridae), to three alternative incubation treatments: gestation of females and incubation of their eggs in hypoxia (*i.e.* extreme high elevation, above current range limits; 72% O₂ availability compared to sea level equivalent [ASL]), gestation of female in normoxia (*i.e.* low elevation, native elevation; 95% O₂ availability compared to ASL) and incubation of eggs at extreme high elevation, and gestation of females and incubation of their eggs in normoxia. We collected gravid females from low elevation population (583.5 m ± 161.5 m ASL) and we maintained them in high-elevation hypoxia or normoxia during gestation. After they lay, we monitored embryo heart rate and egg mass throughout the incubation, we measured the metabolic rates across development (from embryo to juvenile) and we measured important aspects of hatchling phenotype. We predict that high-elevation hypoxia will reduce the metabolism of embryo and juveniles, leading to decreases in hatchling size, and mass. Nevertheless, maternal parental care in extreme high elevation can probably prepare the embryo and reduce the impact of this low level of oxygen availability during incubation.

5.4. Materials and methods

5.4.1. Females capture and housing

Twenty-two gravid females *Natrix maura* were captured along the banks of the Lez River (Department of Ariège, France) in June 2018. Capture sites spanned from 422 m to 745 m ASL. Fifteen gravid females were maintained at low elevation at the Theoretical and Experimental Ecology Station of Moulis, Scientific Research National Center (SETE-CNRS; 42.958394 N, 1.086440 E; 436; normoxia; low elevation at 436 m ASL; native elevation; 95% sea-level equivalent O₂ availability; PO₂ ~20.1 kPa). The seven others gravid females were maintained in extreme high elevation at the Observatoire Midi-Pyrénées at Pic du Midi de Bigorre (42.936389 N, 0.142472 E; hypoxia; extreme high elevation at 2877 m ASL, above current range limits; 72% sea-level equivalent O₂ availability; PO₂ ~15.3 kPa). This difference in elevations results in a decrease in atmospheric pressure, with associated reduction in the partial pressure of gases, including oxygen, carbon dioxide, and water

vapor (Millet and Debevec, 2020; Richalet, 2020). The reduction in oxygen partial pressure at this extreme high elevation provides a useful experimental environment to test the physiological and developmental responses to reduced oxygen availability (Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Souchet et al., 2020). All females were fed and returned to their exact site of capture within two weeks after egg-laying.

5.4.2. Embryos incubation and measurements

A total of 257 eggs were obtained between 03 July 2018 and 28 July 2018 (mean clutch size \pm SD = 11.7 ± 5.0 eggs). Among those eggs, 28 eggs were infertile or died within the first 7 days of post-laying, leaving 229 eggs from 22 females for the experiments (Figure 1). Eggs were individually marked for identification purposes with a pencil and allocated to three different (i) treatments. 97 eggs laid by seven females at extreme high elevation were maintained at extreme high elevation (EHE), (ii) 65 eggs laid by eight females at low elevation were maintained at low elevation (LE) and (iii) 67 eggs laid by seven females at low elevation were transplanted at extreme high elevation (LE-EHE; Figure 1). All eggs were incubated at 28°C under conditions identical to that described in Souchet et al. 2020. During incubation, we weighed each egg using a digital scale (to the nearest 0.01 g) within 12 hours of oviposition, and then every 7 days until hatching (Figure 1; test 1). Embryo heart rates were also measured at 28°C using a Buddy digital egg monitor (MK2, Avitronics, Cornwall, UK) under the standardized protocol described for eggs by Aubret et al. (2016b), Cordero et al. (2017a), and Souchet et al. (2020), first at 7 days post-oviposition and then every 7 days until hatching (Figure 1; test 1). During incubation, at 14 and 28 days post-laying, we measured at 28°C the metabolic rate in a subset of 155 embryos (Figure 1; test 2). Each egg was individually placed in a 250 ml metabolic chamber and replaced the chamber in the incubator. We used closed-system respirometry (Foxbox-C Field O₂ and CO₂ Analysis System, Sable Systems, Inc., Las Vegas, NV, USA) to measure gas exchange [oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) and carbon dioxide production ($\dot{V}CO_2$), both corrected for barometric pressure]. We flushed the chamber for 10 min at a flow rate of 400 ml min⁻¹ and closed valves to seal the chamber for 60 min. We then opened the valves to re-establish air flow and dried air from water vapour with Drierite, and measured O₂ and CO₂ as above. Data were analysed with the ExpeData software (v.1.7.30, Sable Systems, Inc.) to calculate $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ by integrating the change in instantaneous gas concentrations during the period in which the chamber was sealed (Lighton, 2018). We also calculated the respirometry quotient (RQ) as the ratio of the $\dot{V}CO_2$ to the $\dot{V}O_2$ at 14 and 28 days post-hatching

5.4.3. Juveniles housing and measurements

While 3 embryos out of 229 eggs died at various stages during incubation, 226 embryos from 22 females successfully hatched between 18 August 2018 and 21 September 2018 (98.7% hatching success rate). Shortly after hatching, 4 neonates died shortly after hatching, leaving 222 hatchlings for morphologic measurements. Hatchlings were sexed via hemipene eversion, individually marked for identification with medical cauterizer (low temperature power handle Model HIT0 with 0.05 mm tip Model H100, Bovie®, USA) by hot branding technique (Winne et al., 2006) within 24 hours of emergence (Figure 1; test 3) and raised at 20°C under conditions identical to that described in Souchet et al., 2020. At hatching, the yolk leftover in the eggshell (residual egg yolk) were weighed and juveniles were weighed using a digital scale (to the nearest 0.01 g) and, measured for snout-vent length (SVL) using a measuring tape (to the nearest 0.1 mm). At 14 and 28 days post-hatching, all juveniles were measured again for SVL and body mass. The resting metabolic rate at 20°C of a subset of 148 juveniles (from eggs tested before; Figure 1; test 4) was under the same protocol than eggs. We also calculated body condition as the residuals of the linear regression \log_{10} -mass against \log_{10} -SVL at hatching day, 14 and 28 days post-hatching. Once tests were completed, young snakes were fed and released at the maternal capture site.

5.4.4. Data analysis

We first assessed the influence of treatment and time on two measures of embryo development (test 1): egg mass and embryo heart rate. We used a linear mixed-effect model, including the main effects of treatment (LE, LE-EHE and EHE) and the time (post-laying). For the egg mass, the model includes the initial egg mass at laying time as covariate. Then we assessed the influence of treatment on seven measures of phenotypes (test 3): hatching success, sex ratio, incubation duration, residual egg yolk, body mass, body size (SVL) and body condition. We used a linear mixed-effect model, including the main effect of treatment (LE, LE-EHE and EHE). Finally, we assessed the influence of treatment and time on the respirometry metabolism (RQ) of embryos and juveniles (tests 2 and 4.). We used a linear mixed-effect model, including the main effect of treatment (LE, LE-EHE and EHE) and the time (post-hatching), and the heart rate (for embryos) or the body mass (for juveniles) as a covariate.

To account for the non-independence of siblings we included the clutch of origin as a random effect in all models. In the models for which we measured individuals repeatedly (egg mass, embryo heart rates and respirometry metabolism), we also included individual as a random effect. We used type III

sums of squares to assess the significance of main effects, incorporating a Kenward-Roger denominator degree of freedom approximation (Kenward and Roger, 1997). We also conducted a pairwise comparison of least-squares means and adjusted p-values for multiple comparisons with the Tukey method. All analyses were conducted with the lme4 package (Bates et al., 2014) and lsmeans package (Lenth, 2016). Figures were made with the ggplot2 package (Wickham, 2016) in the programming language R 3.6.1 (R Development Core Team, 2017).

5.5. Results

5.5.1. *Egg mass variation and embryonic heart rates*

Egg mass trajectories differed among the three treatment groups. For all treatments (Figure 2; Table 1), the egg mass increased from the laying day to the days 28 of incubation. Then, the LE egg mass continued to increase until the end of incubation whereas the egg mass decreased for the groups incubated in high-elevation hypoxia (Figure 2). Embryo heart rates trajectories differed between the three treatments (Figure 2; Table 1). For all treatments, heart rates decreased similarly between days 7 and 21, before remaining stable between days 21 and 28. Finally, embryos' heart rates from the LE-EHE treatment remained stable until the end of incubation while in LE and EHE treatment heart rates increased (Figure 3).

5.5.2. *Hatching and morphological measurements*

Hatching success and hatchling sex ratio did not differ between embryos incubated in the three treatments (Table 2). The different treatments did not influence incubation duration and residual egg yolk (Table 2). They also did not alter the body size (SVL), the body mass and the body condition at hatching day and at 14 and 28 days post-hatching (Table 2). For each trait measured, the post-hoc comparison of least-squares means from the models did not indicate any significant difference between all treatments.

5.5.3. *Embryos and juveniles metabolic rate*

The embryonic respirometry quotient was significantly affected by the incubation duration and its interaction with the treatment (Figure 3A; Table 3). At 14 days of incubation, the post-hoc comparison of least-squares means from the model (Figure 3A; Table S2) indicated that the

embryonic RQ were similar between all treatments. At 28 days post-laying, the embryonic RQ of the LE treatment was maintained, while the embryonic RQ of both LE-EHE and EHE treatments decreased identically (Figure 3A; Table S2).

The juveniles' respirometry quotient was significantly affected by the treatment, the time and their interaction (Figure 3B; Table 3). At 14 days post-hatching, the post-hoc comparison of least-squares means from the model (Figure 3B; Table S2) indicated that the juveniles' RQ were similar between EHE and LE-EHE treatments and also significantly lower compared to the LE treatment. At 28 days post-hatching, the juveniles' RQ of LE and LE-EHE treatments were maintained, whereas the embryonic RQ of the EHE treatment significantly increased (Figure 3B; Table S2).

5.6. Discussion

Our study aims to examine how low oxygen partial pressure in extreme high-elevation (*i.e.* high-altitude hypoxia) during incubation affects both embryos and juveniles' metabolism in the viperine snake. We also explored if maintaining gravid females in extreme high-elevation can prevent and help embryos to be acclimated to this environmental condition. Extreme high-elevation affected the egg mass trajectories which decreased at the end of the incubation (Figure 2A; Table 1). Additionally, the treatments affected the embryo heart rate trajectories that increased in the end of incubation for both low elevation and extreme high-elevation treatment (Figure 2B; Table 1). Regardless of the elevation of the mother during gestation, the incubation at extreme high-elevation did not affect hatchling phenotype (Table 2). Nevertheless, this condition induced a reduction of metabolism of embryo (Figure 3A; Table 3). These responses might have contributed to maintain similar incubation duration, hatching success and body phenotype of juvenile, relative to those in low elevation (Table 2). Nevertheless, after being maintained in high-elevation hypoxia, juveniles show a hyperventilation compared to juvenile maintained in normoxia (Figure 3B; Table 3).

5.6.1. *Maternal effect and hatchling phenotype*

In our experiment, we have no impact of maternal translocation of gravid females maintained to extreme high-elevation. This can be explained by the fact that most part of embryonic development will occur after eggs are laid (Packard and Packard, 1988; Ackerman and Lott, 2004). Nevertheless, hypoxia is expected to affect ATP demand and supply pathways, which ultimately decrease cellular respiration rates by down regulating ion-pumping and protein synthesis (Hochachka et al., 1996;

Bickler and Buck, 2007). This common homeostatic response ensures survival without necessarily compromising embryonic development if O₂ delivery to tissues is enhanced (Crossley and Burggren, 2009). Our results corroborate this expectation, though we did not directly measure compensatory biochemical changes in blood, for example enhanced O₂ affinity to hemoglobin or hemoglobin and hematocrit concentration (Storz et al., 2010; Lu et al., 2015; Storz, 2016; Gangloff et al., 2019). Indeed, and contrary to what we expected (Kam, 1993; León-Velarde and Monge, 2004; Du et al., 2010a; Cordero et al., 2017a; Crossley et al., 2017), incubation duration, phenotype at hatching and phenotype after being maintained one month at their elevation of incubation (*e.g.* body mass, body size and body condition; Table 2) were comparable between juveniles from all treatments. Furthermore, we did not find any effect of hypoxic condition on the egg resources (*e.g.* residual egg yolk, Table 2).

5.6.2. Embryos' and juveniles' metabolism

Developing viperine snake embryos exposed to high-elevation hypoxia exhibited typical vertebrate physiological adjustments responses. Firstly, the suppressed embryo metabolism reflected by the reduction of the heart rate throughout incubation (Laughlin, 1978; Crossley and Burggren, 2009; Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Figure 2B, Table 1). Secondly, is also confirmed by the decreasing RQ in the end of incubation (Figure 3A, Table 3), which results in an augmentation of O₂ consumption and CO₂ production (Gardner, 1996). These results are strongly correlated in snakes and lizards (Greenwald, 1971; Bennett, 1972; Butler et al., 2004; Du et al., 2010a; Kouyoumdjian et al., 2019) and indicate that high-elevation hypoxia induces hyperventilation in the end of incubation (Bouverot, 1985; Peacock, 1998; Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010; Cordero et al., 2017a).

After hatching, the juveniles' RQ were also lower for both group incubated and maintained in extreme high-elevation (*i.e.*, treatment LE-EHE and EHE; Figure 3B; Table 3). This results also indicates that high-elevation hypoxia induces hyperventilation (Bouverot, 1985; Peacock, 1998; Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010; Cordero et al., 2017a). Metabolic plasticity during development may have allowed juveniles to maintain or improve their metabolism compared to juveniles in normoxic conditions. It is possible that the development in hypoxia changes the blood composition of individuals (Storz, 2007; Storz et al., 2010), thereby improving the oxygen-carrying capacity of the blood. This biochemical change, which is well known in high-elevation reptile populations, results in higher haemoglobin concentrations and higher haematocrit counts in the blood compared to low-altitude populations (Vinegar and Hillyard, 1972; Weathers and White, 1972; Newlin and Ballinger, 1976; González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015; Megía-Palma et al., 2020).

However, while this could maintain the performance of juveniles in high-elevation hypoxia, this phenotypic plasticity could have significant costs in the long term. Indeed, increasing red blood cell density can increase blood viscosity and the energy cost of blood circulation (Hedrick et al., 1986; Dunlap, 2006).

5.6.3. General conclusion

Collectively, our findings support the hypothesis that plastic physiological responses to high-elevation hypoxia may facilitate the maintenance of fitness-related phenotypes in *Natrix maura*. Furthermore, this plastic physiological response could be increase by plastic behavior of the gravid females in their nest choice to increase the hatchlings survival (Burger and Zappalorti, 1986; Escalona et al., 2009; Pike et al., 2010; Refsnider et al., 2010; Peet-Paré and Blouin-Demers, 2012). Even though, population establishment will depend on the long-term costs associated with life in reduced oxygen availability and the consequences of reduced performance (Gangloff et al., 2019), we advocate that metabolic plasticity in embryos should facilitate altitudinal range expansion in *Natrix maura*, in response to climate warming.

5.7. Acknowledgements

We are grateful to the staff of Observatoire Midi-Pyrénées for logistical support at Pic du Midi de Bigorre as well as Isabel Verdaguer, Joaquim Soler and Zuleica Alonso for their help in the laboratory. This work was supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02), INTERREG POCTEFA ECTOPYR (no. EFA031/15), and the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 752299. All experimental protocols (including animal collection, housing, experimentation and release) were approved by the DREAL Midi-Pyrénées (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) and by the Préfecture of Ariège , Aude, Haute-Garonne, Hautes-Pyrénées and Pyrénées Orientales districts (Arrêté Préfectoral No. 2017-s-02 du 30 mars 2017) and ethical committee (APAFIS#16359-201808011445465 v4). All experiments were carried out in accordance with the approved guidelines. Animal caretakers and handlers were trained to use wildlife in scientific purposes (Decree No. 2013-118 du 01 février 2013 and approval of the Ministry of Agriculture under No. I-75-MNHN-F1-15 du 17 juin 2015).

5.8. Tables and figures

Table 1

Results of linear mixed-effect model testing for the effect of incubation treatment, age at measurement (days post-laying), and their interaction on the egg mass and on the embryo heart rates during embryo development of the snake *Natrix maura* (test 1, Figure 1; Figure 2A and 2B). The egg mass at laying time was included as covariate. The three treatments are gestation at extreme high elevation and incubation at extreme high elevation (EHE; N = 97), gestation at low elevation and incubation at extreme high elevation (LE-EHE; N = 67) and gestation at low elevation and incubation at low elevation (LE; N = 65). Significant factors shown in bold with three (P < 0.001) asterisks.

	Egg mass	Embryo heart rates
Day	$F_{6, 1346.36} = 241.93; P < 0.001$ ***	$F_{5, 1095.92} = 38.47; P < 0.001$ ***
Treatment	$F_{2, 18.73} = 0.29; P = 0.755$	$F_{2, 18.88} = 0.57; P = 0.578$
Treatment x Day	$F_{12, 1346.35} = 14.18; P < 0.001$ ***	$F_{10, 1096.02} = 6.13; P < 0.001$ ***
Egg mass at laying time	$F_{1, 170.36} = 672.11; P < 0.001$ ***	-

Table 2

Results of linear mixed-effect model testing for the effect of treatment at hatching day and at 14 and 28 days post-hatching on phenotype in juvenile of the snake *Natrix maura* (test 3, Figure 1). The 3 treatments are gestation at extreme high elevation and incubation at extreme high elevation (EHE; N = 95), gestation at low elevation and incubation at extreme high elevation (LE-EHE; N = 63) and gestation at low elevation and incubation at low elevation (LE; N = 64). Least-squares mean \pm SE or percentages are given.

	LE	LE-EHE	EHE	F (dfn, dfd)	P-value
Incubation duration (day)	52.72 \pm 3.11	52.08 \pm 3.97	50.40 \pm 2.75	2.01 (2, 35.49)	P = 0.149
Hatching success (% of success)	98.96	96.92	100.00	0.58 (2, 18.20)	P = 0.571
Sex ratio (% of females)	51.58	52.38	50.00	0.04 (2, 15.66)	P = 0.965
Body mass (g) at hatching	2.72 \pm 0.48	2.82 \pm 0.60	2.71 \pm 0.34	0.42 (2, 33.67)	P = 0.663
Body size (cm) at hatching	15.35 \pm 0.69	15.06 \pm 1.10	15.16 \pm 0.85	1.27 (2, 29.42)	P = 0.295
Body condition at hatching	-0.016 \pm 0.051	0.018 \pm 0.042	-0.001 \pm 0.032	0.99 (2, 24.75)	P = 0.386
Residual egg yolk (g)	0.88 \pm 0.50	0.84 \pm 0.47	0.60 \pm 0.44	2.39 (2, 20.21)	P = 0.117
Body mass (g) at 14 days post-hatching	2.53 \pm 0.46	2.64 \pm 0.54	2.52 \pm 0.32	0.31 (2, 33.74)	P = 0.739
Body size (cm) at 14 days post-hatching	15.70 \pm 0.74	15.41 \pm 1.08	15.55 \pm 0.85	1.15 (2, 29.53)	P = 0.331
Body condition at 14 days post-hatching	-0.016 \pm 0.043	0.022 \pm 0.034	-0.004 \pm 0.033	2.63 (2, 22.80)	P = 0.094
Body mass (g) at 28 days post-hatching	2.29 \pm 0.42	2.37 \pm 0.50	2.27 \pm 0.28	0.28 (2, 32.55)	P = 0.756
Body size (cm) at 28 days post-hatching	15.87 \pm 0.79	15.51 \pm 1.13	15.76 \pm 0.87	1.06 (2, 29.95)	P = 0.378
Body condition at 28 days post-hatching	-0.016 \pm 0.43	0.025 \pm 0.039	-0.006 \pm 0.032	3.02 (2, 22.06)	P = 0.069

Table 3

Result of linear mixed-effect model testing for the effect of incubation treatment, the age at measurement (days post-laying) and their interaction on the respirometry quotient (RQ; test 2 and 4, Figure 1; Figure 3A and 3B) in embryos and juveniles of the snake *Natrix maura*. The embryo heart rates or juvenile body mass were included as covariate. The three treatments are gestation at extreme high elevation and incubation at extreme high elevation (EHE; triangle; embryo: N = 59; and juvenile: N = 58), gestation at low elevation and incubation at extreme high elevation (LE-EHE; squares; embryo: N = 51; and juvenile: N = 48) and gestation at low elevation and incubation at low elevation (LE; circle; embryo: N = 45; and juvenile: N = 42).

	Embryo RQ	Juvenile RQ
Day	$F_{1, 148.60} = 37.92; P < 0.001$ ***	$F_{1, 436.89} = 4.40; P = 0.037$ *
Treatment	$F_{2, 18.16} = 2.26; P = 0.133$	$F_{2, 17.51} = 76.23; P < 0.001$ ***
Day x Treatment	$F_{2, 146.12} = 9.31; P < 0.001$ ***	$F_{2, 428.69} = 7.04; P < 0.001$ ***
Heart rates	$F_{1, 229.28} = 1.03; P = 0.312$	-
Body mass	-	$F_{1, 44.76} = 0.20; P = 0.655$

Figure 1

Experimental design. Gravid *Natrix maura* females were captured at low elevation in viperine snake populations in the foothills of the Pyrenees (422 m to 745 m ASL). A third of them were transplanted and maintained for gestation to the extreme high elevation laboratory at 2877 m ASL, while two thirds of them were maintained for gestation at low elevation laboratory at 436 m ASL. Within 48 hours of oviposition, half of clutch from low elevation of females gestation were transplanted and maintained for incubation to the extreme high elevation laboratory, while the other half were maintained for incubation at low elevation laboratory. Clutches from females in gestation to the extreme high elevation laboratory where maintained at this elevation. Eggs mass and embryo heart rate were measured throughout incubation (test 1). At hatching, a number of morphologic traits were measured in juveniles (test 3). A subset of eggs and juveniles in each treatment were tested for VO_2 consumption and VCO_2 production in the environment where eggs were incubated (test 2 and test4).

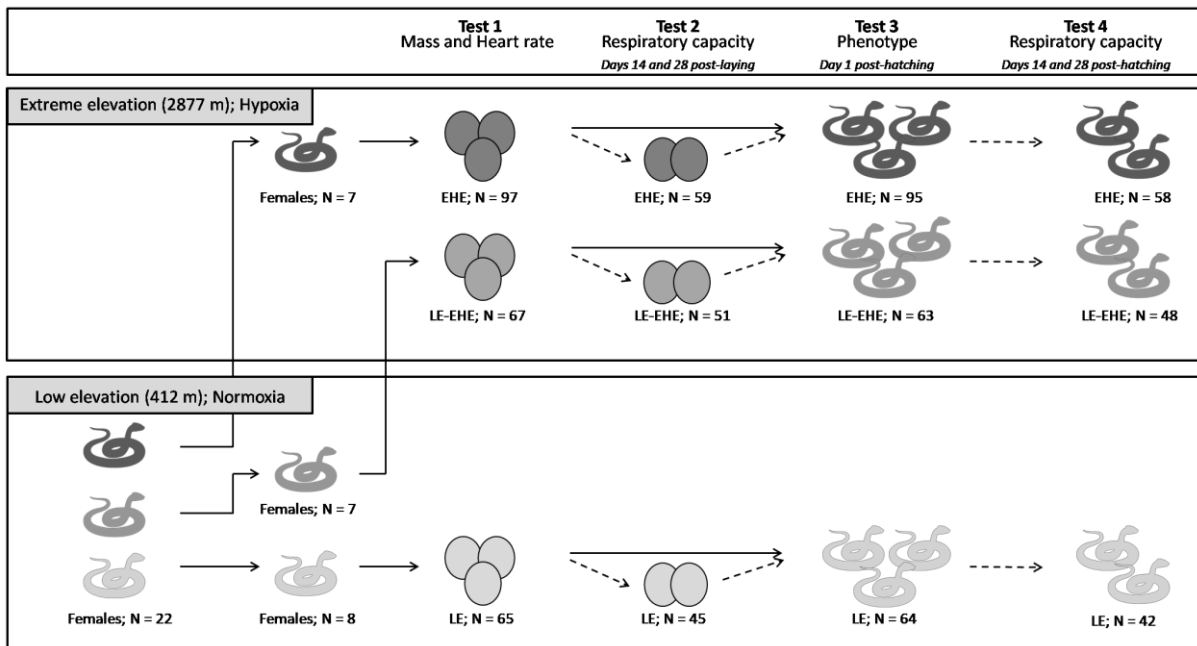


Figure 2

Egg mass (A) and embryo heart rates (B) through incubation time at 28°C in embryos of the snake *Natrix maura* (test 1, Figure 1). The three treatments are gestation at extreme high elevation and incubation at extreme high elevation (EHE; N = 97; triangle), gestation at low elevation and incubation at extreme high elevation (LE-EHE; N = 67; squares) and gestation at low elevation and incubation at low elevation (LE; N = 65; circle). Least-squares means \pm SE estimated by linear mixed models are plotted.

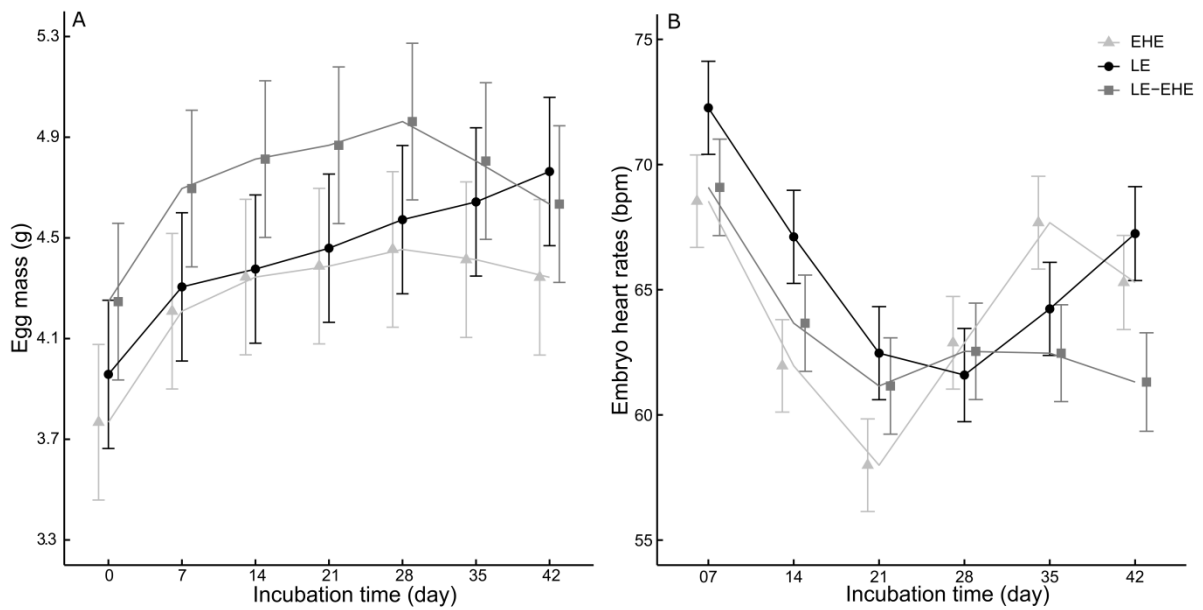
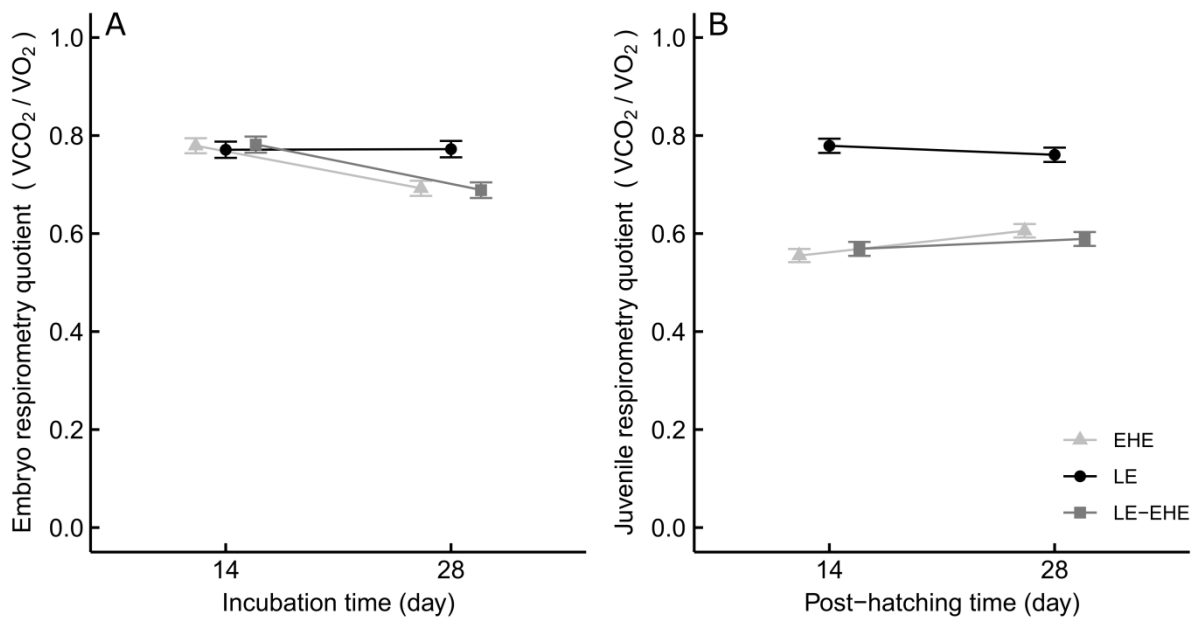


Figure 3

Embryo respirometry quotient (A) and juvenile respirometry quotient (B) in each treatment at 14 and 28 days post-laying in embryos and post-hatching in juvenile of the snake *Natrix maura*. The three treatments are gestation at extreme high elevation and incubation at extreme high elevation (EHE; triangle; A: N = 59; and B: N = 58), gestation at low elevation and incubation at extreme high elevation (LE-EHE; squares; A: N = 51; and B: N = 48) and gestation at low elevation and incubation at low elevation (LE; circle; A: N = 45; and B: N = 42). Least-squares means \pm SE estimated by linear mixed models are plotted.



Supplementary table 1

Results of the pairwise comparison of least-squares means and adjusted p-values for multiple comparisons with the Tukey method from the linear mixed-effect model testing for the effect of incubation treatment, the age at measurement (days post-laying) and their interaction on the egg mass and on the embryo heart rates during embryo development of the snake *Natrix maura* (Figure 2A & 2B; Table 1). The three treatments are gestation at extreme high elevation and incubation at extreme high elevation (EHE; N = 97), gestation at low elevation and incubation at extreme high elevation (LE-EHE; N = 67) and gestation at low elevation and incubation at low elevation (LE; N = 65). Significant differences between least-squares means shown in bold with one (P < 0.05), two (P < 0.01) or three (P < 0.001) asterisks.

	Egg mass			Embryo heart rate		
	Estimate	SE	P-value	Estimate	SE	P-value
EHE D0 - LE-EHE D0	-0.479	0.439	1.000	-	-	-
EHE D0 - LE D0	-0.190	0.427	1.000	-	-	-
LE-EHE D0 - LE D0	0.289	0.428	1.000	-	-	-
EHE D0 - EHE D7	-0.441	0.032	< 0.001 ***	-	-	-
LE-EHE D0 - LE-EHE D7	-0.449	0.038	< 0.001 ***	-	-	-
LE D0 - LE D7	-0.348	0.039	< 0.001 ***	-	-	-
EHE D7 - LE-EHE D7	-0.487	0.439	1.000	-0.552	2.668	1.000
EHE D7 - LE D7	-0.097	0.427	1.000	-3.730	2.621	0.990
LE-EHE D7 - LE D7	0.391	0.428	1.000	-3.178	2.678	0.999
EHE D7 - EHE D14	-0.136	0.032	0.003 **	6.577	1.089	< 0.001 ***
LE-EHE D7 - LE-EHE D14	-0.117	0.038	0.206	5.426	1.315	0.005 **
LE D7 - LE D14	-0.071	0.039	0.963	5.154	1.330	0.013 *
EHE D14 - LE-EHE D14	-0.469	0.439	1.000	-1.703	2.666	1.000
EHE D14 - LE D14	-0.032	0.427	1.000	-5.153	2.621	0.861
LE-EHE D14 - LE D14	0.437	0.428	1.000	-3.450	2.676	0.997
EHE D14 - EHE D21	-0.043	0.032	0.999	3.969	1.094	0.033 *
LE-EHE D14 - LE-EHE D21	-0.055	0.038	0.998	2.507	1.310	0.906
LE D14 - LE D21	-0.083	0.039	0.848	4.646	1.330	0.050 *
EHE D21 - LE-EHE D21	-0.480	0.439	1.000	-3.165	2.668	0.999
EHE D21 - LE D21	-0.071	0.427	1.000	-4.476	2.623	0.949
LE-EHE D21 - LE D21	0.409	0.429	1.000	-1.311	2.676	1.000

CHAPITRE 5. HYPOXIE ET EFFETS MATERNELS

EHE D21 - EHE D28	-0.066	0.032	0.879	-4.890	1.100	< 0.001 ***
LE-EHE D21 - LE-EHE D28	-0.094	0.038	0.634	-1.384	1.315	1.000
LE D21 - LE D28	-0.113	0.039	0.292	0.875	1.335	1.000
EHE D28 - LE-EHE D28	-0.508	0.439	0.999	0.342	2.671	1.000
EHE D28 - LE D28	-0.118	0.427	1.000	1.289	2.625	1.000
LE-EHE D28 - LE D28	0.390	0.428	1.000	0.947	2.680	1.000
EHE D28 - EHE D35	0.041	0.032	1.000	-4.797	1.106	0.002 **
LE-EHE D28 - LE-EHE D35	0.157	0.038	0.007 **	0.074	1.331	1.000
LE D28 - LE D35	-0.070	0.039	0.966	-2.644	1.335	0.878
EHE D35 - LE-EHE D35	-0.392	0.439	1.000	5.213	2.679	0.869
EHE D35 - LE D35	-0.229	0.427	1.000	3.443	2.626	0.996
LE-EHE D35 - LE D35	0.162	0.428	1.000	-1.770	2.683	1.000
EHE D35 - EHE D42	0.070	0.032	0.810	2.389	1.156	0.835
LE-EHE D35 - LE-EHE D42	0.171	0.038	< 0.001 ***	1.153	1.384	1.000
LE D35 - LE D42	-0.121	0.039	0.217	-3.006	1.352	0.738
EHE D42 - LE-EHE D42	-0.291	0.439	1.000	3.976	2.721	0.987
EHE D42 - LE D42	-0.420	0.427	1.000	-1.953	2.657	1.000
LE-EHE D42 - LE D42	-0.129	0.429	1.000	-5.929	2.719	0.752

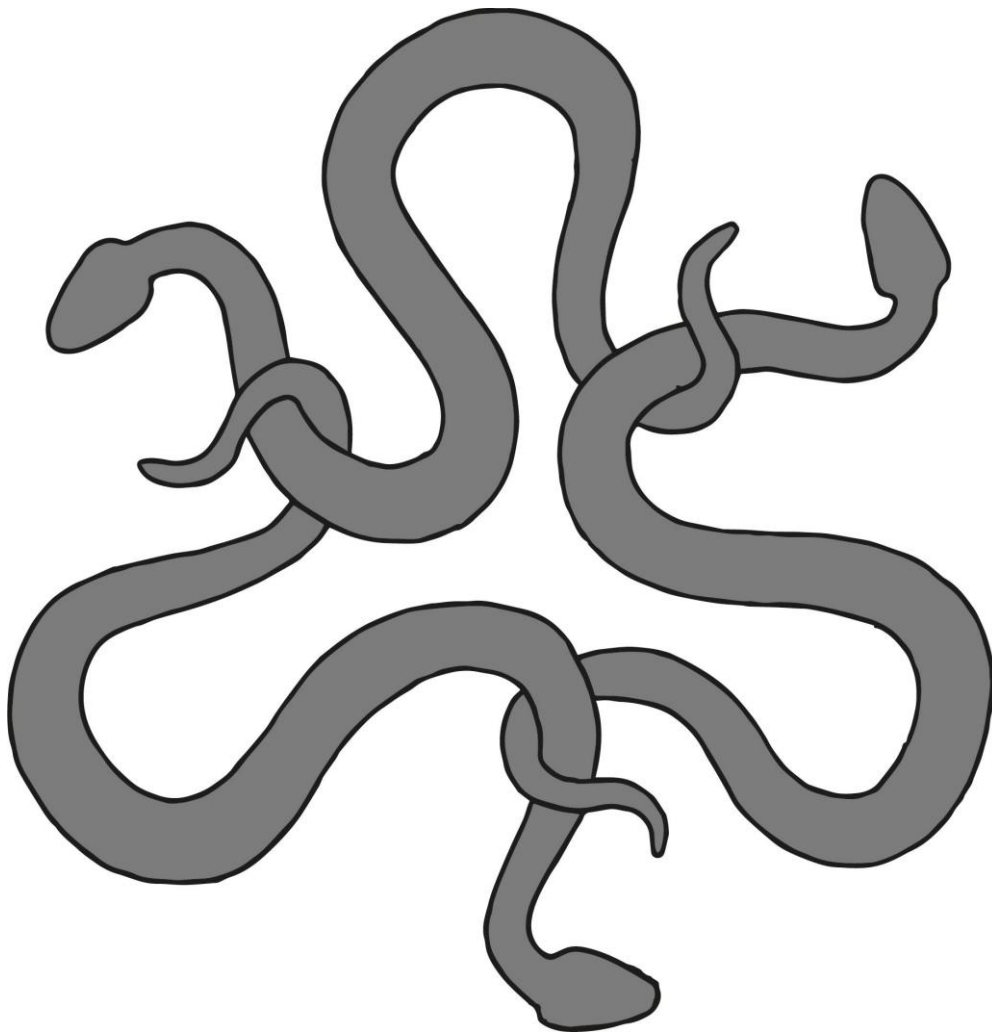
Supplementary table 2

Results of the pairwise comparison of least-squares means and adjusted p-values for multiple comparisons with the Tukey method from the linear mixed-effect model testing for the effect of incubation treatment, the age at measurement (days post-laying or days post-hatching) and their interaction on the respirometry quotient (RQ) in the embryos and juveniles on the snake of *Natrix maura* (Figure 3A & 3B; Table 3). The three treatments are gestation at extreme high elevation and incubation at extreme high elevation (EHE; embryo: N = 59; and juvenile: N = 58), gestation at low elevation and incubation at extreme high elevation (LE-EHE; embryo: N = 51; and juvenile: N = 48) and gestation at low elevation and incubation at low elevation (LE; embryo: N = 45; and juvenile: N = 42). Significant differences between least-squares means shown in bold with one (P < 0.05) or three (P < 0.001) asterisks.

	Embryo RQ			Juvenile RQ		
	Estimate	SE	P-value	Estimate	SE	P-value
EHE D14 - LE-EHE D14	-0.002	0.023	1.000	-0.014	0.020	0.981
EHE D14 - LE D14	0.008	0.023	0.999	-0.224	0.020	< 0.001 ***
LE-EHE D14 - LE D14	0.010	0.023	0.998	-0.210	0.020	< 0.001 ***
EHE D14 - EHE D28	0.087	0.015	< 0.001 ***	-0.051	0.012	< 0.001 ***
LE-EHE D14 - LE-EHE D28	0.093	0.017	< 0.001 ***	-0.020	0.014	0.670
LE D14 - LE D28	-0.001	0.018	1.000	0.018	0.014	0.802
EHE D28 - LE-EHE D28	0.004	0.022	1.000	0.017	0.020	0.954
EHE D28 - LE D28	-0.080	0.023	0.015 *	-0.155	0.020	< 0.001 ***
LE-EHE D28 - LE D28	-0.084	0.023	0.010 *	-0.172	0.020	< 0.001 ***

Chapitre 6.

DISCUSSION GÉNÉRALE



6.1. Synthèse générale

6.1.1. Remise en contexte

Selon l'hypothèse de la remonté altitudinale, on peut s'attendre à ce que la Couleuvre vipérine, *Natrix maura* (Linnaeus, 1758), bien présente dans les Pyrénées jusqu'à 1000 m en France et 1500 m en Espagne (*cf. section 2.1.1*), remonte en altitude avec l'augmentation des températures, induite par le réchauffement climatique (*cf. section 1.1.5*). La colonisation des milieux de haute altitude par cette espèce pourrait néanmoins être limitée par le manque de dioxygène entraînant à long terme une réduction de l'aire de répartition de l'espèce dans les Pyrénées. En outre, la colonisation et l'établissement des populations dans un nouveau milieu passe par le succès reproducteur des individus (Grevstad, 1999; Yeh, 2004). Pour savoir si les populations de Couleuvre vipérine vont pouvoir s'établir en haute altitude, nous avons émis différentes hypothèses des effets de l'hypoxie d'altitude sur le succès du développement embryonnaire et les performances juvéniles. Les hypothèses de travail étaient que l'hypoxie d'altitude pourrait à la fois influencer de manière négative le développement embryonnaire et réduirait également les performances des juvéniles. Elles proposaient également que les effets négatifs, dus à un développement en hypoxie, se maintiendraient même après un retour des individus en condition de normoxie. De plus, les hypothèses prédisaient qu'une augmentation des températures pendant l'incubation aggraverait les effets de l'hypoxie d'altitude. Cependant, nos hypothèses proposaient également que les effets négatifs d'une incubation en haute altitude seraient réduits par les effets maternels, c'est à dire par une « préparation aux conditions environnementales » par les femelles gravides, si la première partie du développement embryonnaire (*i.e.* avant la ponte) était effectué en condition d'hypoxie de haute altitude. En effet, à travers l'histoire de cette espèce (*cf. section 2.1.1*), qui a colonisé les environnements montagneux des Pyrénées à travers les cycles historiques de réchauffement et de refroidissement (Gómez and Lunt, 2007), il est possible que des formes de plasticité adaptative se soient développées en réponse à l'hypoxie de haute altitude.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le contexte du réchauffement climatique, plusieurs scénarios climatiques ont été utilisés pour déterminer les effets de l'hypoxie d'altitude couplés à une augmentation des températures sur le métabolisme de l'embryon et du juvénile chez la Couleuvre vipérine. Compte tenu des prédictions de réchauffement proposés par le GIEC (*cf. section 1.1.3*) et considérant le concept de la remontée altitudinale des espèces (*cf. section 1.3*), quatre scénarios possibles ont été considérés (Figure 1) :

- Scénario 1 : Un environnement normoxique (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer) avec des températures favorables (*i.e.* 24°C et 28°C), qui correspond, pour des populations de basse altitude, aux conditions actuelles, sans augmentation des températures.
- Scénario 2 : Un environnement normoxique (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer) avec une température élevée (*i.e.* 32°C), qui correspond au scénario du réchauffement climatique pour des populations de basse altitude qui ne migrent pas.
- Scénario 3 : Un environnement hypoxique (*i.e.* équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer) avec des températures favorables (*i.e.* 24°C et 28°C), qui correspond, pour des populations de basse altitude, aux conditions environnementales qu'elles pourront rencontrer en migrant en haute altitude.
- Scénario 4 : Un environnement hypoxique (*i.e.* équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer) avec une température élevée (*i.e.* 32°C), qui correspond aux conditions environnementales futures en haute altitude, si le changement climatique perdure, et qui pourront être rencontrées par des populations ayant migré et qui se seraient maintenues en haute altitude.

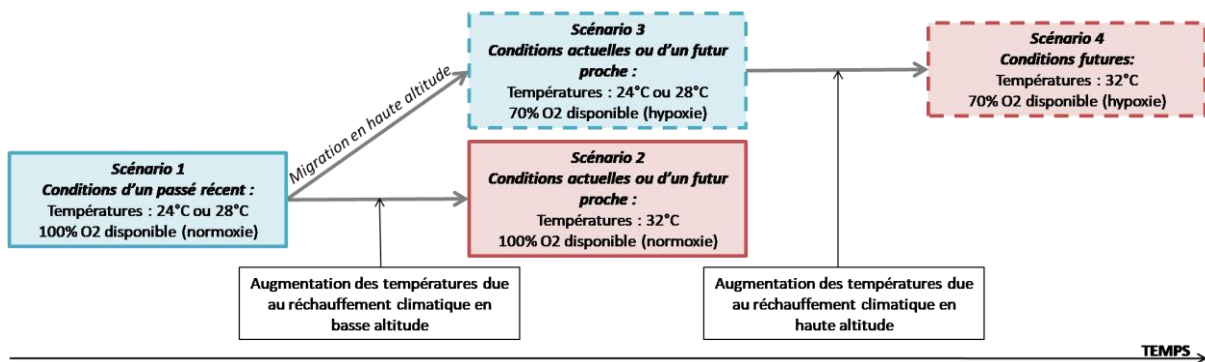


Figure 1 : Résumé temporel schématisé des différents scénarios considérés.

Deux tableaux résumant les résultats comparatifs des mesures du développement embryonnaire (Tableau 1) et des phénotypes juvéniles (Tableau 2) en fonction des différentes combinaisons de températures (*i.e.* 24°C, 28°C et 32°C) et de niveaux de dioxygène disponible (*i.e.* normoxie et hypoxie) sont présentés ci-dessous. Ces différents résultats vont être remis en contexte et discutés selon les 4 scénarios décrits.

CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Tableau 1 : Comparatif des principaux résultats des mesures du développement embryonnaire en fonction des différentes conditions d'incubation des œufs de Couleuvre vipérine.

		Traitement de comparaison			
		Normoxie à 24°C	Hypoxie à 24°C	Normoxie à 28°C	Normoxie à 32°C
Traitement initial	Hypoxie à 24°C	= Masse des œufs = Rythme cardiaque - Durée d'incubation = Succès d'éclosion	/	/	+ Masse des œufs - Rythme cardiaque + Durée d'incubation = Succès d'éclosion
	Normoxie à 24°C	/	/	/	+ Masse des œufs - Rythme cardiaque + Durée d'incubation = Succès d'éclosion
	Hypoxie à 28°C	/	/	= / - Masse des œufs - / + Rythme cardiaque - Métabolisme respiratoire = / - Durée d'incubation = Succès d'éclosion	/
	Hypoxie à 32°C	- Masse des œufs + Rythme cardiaque - Durée d'incubation - Succès d'éclosion	- Masse des œufs + Rythme cardiaque - Durée d'incubation - Succès d'éclosion	/	= Masse des œufs - Rythme cardiaque + Durée d'incubation - Succès d'éclosion

Tableau 2 : Comparatif des principaux résultats des mesures du phénotype juvénile en fonction des différentes conditions d'incubation des œufs de Couleuvre vipérine.

		Traitement de comparaison			
		Normoxie à 24°C	Hypoxie à 24°C	Normoxie à 28°C	Normoxie à 32°C
Traitement initial	Hypoxie à 24°C	= Résidu de l'œuf = Masse corporelle = Longueur du corps = Condition corporelle = Capacité de nage	/	/	+ Résidu de l'œuf = Masse corporelle + Longueur du corps - Condition corporelle = Capacité de nage
	Normoxie à 24°C	/	/	/	+ Résidu de l'œuf = Masse corporelle + Longueur du corps - Condition corporelle - Capacité de nage
	Hypoxie à 28°C	/	/	= / + Résidu de l'œuf = / - Masse corporelle = / - Longueur du corps = / - Condition corporelle - Métabolisme respiratoire - Capacité de nage = Capacité d'apnée	/
	Hypoxie à 32°C	- Résidu de l'œuf - Masse corporelle - Longueur du corps = Condition corporelle + Capacité de nage	- Résidu de l'œuf - Masse corporelle - Longueur du corps = Condition corporelle + Capacité de nage	/	= Résidu de l'œuf - Masse corporelle - Longueur du corps - Condition corporelle = Capacité de nage

6.1.2. Scénario 1 : normoxie et températures favorables

Le scénario 1 représente des conditions d'incubation actuelles de températures (*i.e.* 24°C et 28°C) et de niveau de dioxygène disponible (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer, normoxie) pour des populations de Couleuvre vipérine qui ne subiraient pas les effets du réchauffement climatique (Figure 1). Dans cette thèse, ce scénario est considéré comme le scénario contrôle.

Nos résultats montrent que la masse des œufs reste stable ou augmente légèrement durant l'incubation avant de chuter dans le dernier stade du développement. Ils montrent également pour une température d'incubation de 28°C, comparée à celle de 24°C, une augmentation du rythme cardiaque et une diminution de la durée d'éclosion. Ces résultats sont en accord avec d'autres études portant sur cette espèce dans des conditions d'incubation similaires (Aubret, 2013a; Aubret et al., 2016a; b, 2017). Ils sont aussi en accord avec une littérature plus générale chez les ectothermes qui spécifie que le rythme cardiaque s'accélère avec l'augmentation de l'activité métabolique (Greenwald, 1971; Du et al., 2010b; c) qui est elle-même positivement corrélée à la température (Bull, 1980; Shine and Harlow, 1993; Angilletta et al., 2002). Enfin, nos résultats corroborent le fait que la température soit le facteur déterminant de la durée d'incubation chez les reptiles non-aviens (Shine, 2004; Noble et al., 2018). Durant l'incubation, le métabolisme respiratoire des embryons est resté stable. Cependant, selon la littérature, en condition de normoxie et à des températures de 28°C, le métabolisme devrait augmenter en fin d'incubation (Kouyoumdjian et al., 2019). En effet, la dernière phase du développement embryonnaire est celle où la demande en dioxygène est la plus importante (Dmi'el, 1970; Sartori et al., 2017). Par conséquent, le métabolisme respiratoire de l'embryon augmente pour assurer un apport en dioxygène suffisant. Dans le cas de cette thèse, il est possible que la deuxième mesure du métabolisme ait été effectuée trop tôt dans le développement embryonnaire pour remarquer cette augmentation. Dans l'ensemble, le succès d'éclosion ($\geq 90\%$) et le sexe ratio équilibré sont comparables à ceux de la littérature pour une condition d'incubation similaire (Aubret, 2013a; Aubret et al., 2016a; b, 2017).

A l'éclosion, les juvéniles de Couleuvre vipérine sont de longueur corporelle ($\approx 15,36$ cm) et de masse corporelle ($\approx 2,86$ g) comparables à ce qui est connus chez cette espèce (Aubret, 2013a; Aubret et al., 2016a; b, 2017). Durant le premier mois post éclosion, le métabolisme respiratoire des juvéniles reste stable. Vu que l'augmentation de la consommation en dioxygène est positivement corrélée à la masse (Graham, 1974), il n'est pas étonnant de constater que les juvéniles ne grossissent pas durant le premier mois. Enfin, la vitesse de nage des juvéniles, un trait écologique important pour échapper aux prédateurs et acquérir de la nourriture (Jayne and Bennett, 1990; Kingsolver et al., 2001),

augmente progressivement durant les 40 jours post-éclosion, car elle est corrélée positivement à la longueur corporelle des individus (Shine and Shetty, 2001; Aubret et al., 2015).

Avec l'augmentation des températures de plusieurs degrés d'ici 2100 prévu par le GIEC (Pachauri et al., 2014; IPCC, 2018), notamment au niveau des surfaces émergées du globe (Arneth et al., 2019), l'espèce va certainement devoir faire face à un changement environnemental majeur. La Couleuvre vipérine étant ectotherme, l'ensemble de leur cycle biologique est dépendant de la température environnementale (*cf. section 1.2*). Ainsi, les populations de Couleuvre vipérine qui resteront à basse altitude vont devoir s'adapter, si cela est possible, à l'augmentation des températures due au réchauffement climatique, au travers de mécanismes tels que la plasticité phénotypique, notamment durant le développement embryonnaire et/ou durant le stade juvénile.

6.1.3. Scénario 2 : normoxie et réchauffement climatique

Pour tester la plasticité phénotypique des embryons et des juvéniles de Couleuvre vipérine en réponse à l'augmentation des températures en basse altitude, nous nous sommes intéressés à un second scénario (scénario 2 ; Figure 1) représentant des conditions d'incubation normoxique (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer) mais à une température élevée (*i.e.* 32°C).

Le développement embryonnaire des reptiles non-aviens est principalement contrôlé par la température d'incubation (Deeming and Ferguson, 1991; Deeming, 2004; Booth, 2006; Goodman, 2008; Warner, 2014). Le rythme cardiaque des embryons, fortement corrélé à la température d'incubation (Greenwald, 1971; Du et al., 2010a; c), ainsi qu'à la durée d'incubation (Shine, 2004; Noble et al., 2018) en sont des bons exemples. Des températures élevées durant l'incubation augmentent l'activité métabolique des individus (Bull, 1980; Shine and Harlow, 1993; Angilletta et al., 2002), ce qui peut augmenter la conversion de l'énergie métabolique de l'embryon. À ces températures, les œufs évacuent la chaleur produite par cette augmentation de l'activité métabolique par l'intermédiaire de la perte de l'eau du milieu interne de l'œuf, réduisant ainsi leur masse (Ackerman et al., 1985). Conformément à ces prédictions, nos résultats (Tableau 1), dans le cadre du scénario 2, montrent un rythme cardiaque plus élevé, une durée d'incubation plus courte et une prise de masse des œufs plus faible comparés aux résultats de ces mêmes traits en condition de normoxie à des températures plus basses (*i.e.* 24°C et 28°C). Bien que la température d'incubation élevée (*i.e.* 32°C) ait des effets non négligeables sur le développement embryonnaire, cela ne semble pas influencer ni le succès d'éclosion, ni le sexe ratio. Nos résultats mettent en évidence une plasticité du développement embryonnaire chez la Couleuvre vipérine, mais cette plasticité peut

avoir un coût. En effet, la perte d'eau dans le milieu interne de l'œuf en réponse à l'augmentation de la température d'incubation peut progressivement augmenter la viscosité du jaune et entraver l'absorption par l'embryon en développement (Cunningham and Hurwitz, 1936; Aubret et al., 2005) ce qui pourrait affecter négativement le phénotype à l'éclosion.

Nos résultats, en accord avec la littérature (Deeming and Ferguson, 1991; Shine et al., 1997; Wapstra, 2000; Blouin-Demers et al., 2004; Booth, 2006; Watkins and Vraspir, 2006; Warner, 2014) montrent qu'à l'éclosion les juvéniles ont une masse corporelle équivalente mais toutefois d'une longueur corporelle réduite comparées à celles des juvéniles issus d'une incubation en normoxie à des températures basses. Néanmoins, alors que la littérature s'accorde sur le fait que chez les ectothermes, une incubation à des températures froides produit des nageurs plus rapides (Shine, 1999; Angilletta and Dunham, 2003; Watkins and Vraspir, 2006), nos résultats montrent que les juvéniles de Couleuvre vipérine issus d'une incubation à une température élevée (*i.e.* 32°C) nagent plus rapidement que ceux incubés aux basses températures (*i.e.* 24°C et 28°C). Ce résultat s'explique potentiellement par le fait que chez les reptiles, les conditions d'incubation peuvent indiquer la qualité de l'environnement et donc favoriser, dans le cas où celui-ci ne semble pas favorable, des comportements de dispersions efficaces, comme l'augmentation des performances locomotrices (Clobert et al., 2009; Bestion et al., 2015c; Aubret et al., 2016a).

Nos résultats montrent que la température d'incubation élevée impacte le développement embryonnaire mais pas le succès d'éclosion ni le sexe ratio. Cela confirme l'hypothèse que l'augmentation des températures, induite par le réchauffement climatique, pourrait avoir un impact négatif sur le développement embryonnaire (Andrews and Schwarzkopf, 2012; Mitchell et al., 2018b), entraînant une diminution de la taille corporelle des juvéniles à l'éclosion (Daufresne et al., 2009; Gardner et al., 2011; Sheridan and Bickford, 2011). La règle de la TSR (*cf. section 1.2.2*) nous permet de supposer que l'augmentation des températures pourrait également altérer le développement juvénile et donc diminuer la taille corporelle des individus à l'âge adulte (Invertébrés: Frazier et al., 2006; Brans and Meester, 2018; Poissons: Loisel et al., 2019). Bien que cela n'a pas été mesuré durant cette thèse, il est ainsi possible que l'augmentation des températures lors du développement embryonnaire entraîne des coûts énergétique à long terme chez les individus, diminuant le taux de survie à l'âge adulte (Frazier et al., 2006; Santos, 2007; Bestion et al., 2015a). Comme chez de nombreuses espèces ectothermes, les changements phénotypiques pourront avoir pour conséquences des modifications dans la structure et la dynamique des populations de Couleuvre vipérine (Daufresne et al., 2009; Le Galliard et al., 2010; Cunningham et al., 2017) et risqueront d'impacter négativement la démographie des populations,

quand elles n'entraîneront pas leur extinction (Whitfield et al., 2007; Sinervo et al., 2010; Bestion et al., 2015a).

Par conséquent, en réaction au réchauffement climatique, certaines espèces déplacent progressivement leur étendue géographique vers des environnements aux conditions climatiques pour lesquelles elles sont pré-adaptées (Sorte et al., 2010; Wernberg et al., 2011). Elles peuvent notamment migrer en altitude (*cf. section 1.3*) pour retrouver des températures environnementales favorables (Bässler et al., 2013; Pauchard et al., 2016; Freeman et al., 2018; Sinervo et al., 2018), ce que nous avons testé dans le cadre du scénario 3.

6.1.4. Scénario 3 : hypoxie d'altitude et températures favorables.

Pour tester la plasticité phénotypique du développement embryonnaire de la Couleuvre vipérine en réponse à l'hypoxie de haute altitude, cette thèse s'est attachée à réaliser un scénario probable de migration en haute altitude. Le scénario 3 (Figure 1) représente des conditions d'incubation qui seraient rencontrées, aujourd'hui ou dans un futur proche, par des populations de Couleuvre vipérine qui migreraient en altitude, avec des températures basses (*i.e.* 24°C et 28°C) et un niveau de dioxygène disponible faible (*i.e.* équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer, hypoxie d'altitude de 30%).

Chez les serpents et les lézards, la fréquence cardiaque est fortement corrélée au taux de consommation du dioxygène (Greenwald, 1971; Bennett, 1972; Butler et al., 2004; Du et al., 2010a; Kouyoumdjian et al., 2019). Conformément à d'autres études réalisées sur le Lézard des murailles dans les mêmes conditions (Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019), nous nous attendions en effet à une réduction du rythme cardiaque en réponse à l'hypoxie chronique, comme cela a été montré chez d'autres Vertébrés endothermes (Monge and Leon-Velarde, 1991; Peacock, 1998). Nos résultats ne sont pas aussi tranchés. À une température d'incubation de 24°C, le rythme cardiaque des embryons incubés en hypoxie est resté similaire à celui des embryons incubés en normoxie (Tableau 1). En effet, à cette température d'incubation basse, l'activité métabolique est réduite (Greenwald, 1971; Bull, 1980; Shine and Harlow, 1993; Angilletta et al., 2002; Du et al., 2010b; c), limitant probablement le besoin en dioxygène et limitant ainsi les effets de l'hypoxie d'altitude. À une température d'incubation légèrement plus élevée (*i.e.* 28°C), nous avons constaté que, selon les années d'expérimentation, l'hypoxie d'altitude pouvait soit augmenter, soit diminuer le rythme cardiaque des embryons par rapport à celui des embryons incubés en basse altitude (Tableau 1). Tous les embryons répondant de la même manière au cours d'une même expérimentation, cette

variation interannuelle n'est pas vraiment expliquée. Elle pourrait découler de paramètres parfaitement non-contrôlés selon l'année d'expérimentation, tels que des modifications dans la physiologie des femelles gravides capturées dues à des variations des conditions environnementales. Si l'effet de l'hypoxie sur le rythme cardiaque des embryons de Couleuvre vipérine n'a pas pu être réellement mis en évidence, son effet sur la masse des œufs et sur la durée d'incubation s'est avéré beaucoup plus sensible. La masse des œufs incubés en hypoxie est restée stable (ou a augmenté légèrement durant l'incubation), mais la masse moyenne des œufs est restée inférieure à celle des œufs incubés en basse altitude à la même température (*i.e.* 24°C et 28°C ; Tableau 1). De plus, nos résultats montrent qu'en fin d'incubation, la masse des œufs chute de manière plus importante qu'en condition de normoxie à basses températures. Ce résultat peut s'expliquer par l'incompatibilité entre la demande en dioxygène des embryons et l'apport disponible en hypoxie de haute altitude dans la dernière phase de développement embryonnaire, au moment où la demande en dioxygène de l'embryon augmente (Dmi'el, 1970; Sartori et al., 2017). Cela peut entraîner une diminution de la fixation du carbone et donc de la transformation des réserves lipidiques en glucides (Cunningham and Hurwitz, 1936), réduisant ainsi la prise de masse de l'embryon. En effet, l'hypoxie est connue pour rendre le développement embryonnaire difficile, en raison des restrictions énergétiques aérobies dans la transformation des réserves lipidiques (oiseaux: Wangenstein et al., 1974; Rahn et al., 1977; Monge and Leon-Velarde, 1991; Noble, 1991; Vleck and Hoyt, 1991; Vleck and Vleck, 1996; León-Velarde and Monge, 2004; Mammifères: Bouverot, 1985; Monge and Leon-Velarde, 1991; reptiles: Noble, 1991; Vleck and Hoyt, 1991), susceptible de mener à une réduction de la taille des individus à la naissance (Douglas et al., 2005; Du et al., 2010a; Harrison et al., 2015; Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Parker and Dimkovikj, 2019; Li et al., 2020). Parallèlement à la réduction de la masse des œufs en fin d'incubation, nos résultats montrent les embryons de Couleuvre vipérine incubés en hypoxie présentent une hyperventilation, qui se caractérise par une augmentation de la consommation de dioxygène et une diminution de la production de dioxyde de carbone (Gardner, 1996). Ce résultat est en accord avec de nombreuses études chez les Vertébrés qui indique l'hyperventilation comme une réponse commune à l'hypoxie (Bouverot, 1985; Faraci, 1991; Monge and Leon-Velarde, 1991; Peacock, 1998; Scott and Milsom, 2006; Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010). Pour autant, le succès à l'éclosion ainsi que la masse et la taille corporelle des juvéniles (Tableau 2) issus d'une incubation en hypoxie d'altitude à une température de 24°C ou 28°C sont restés similaires à ceux des juvéniles issus d'une incubation en normoxie aux mêmes températures. Ces résultats sont en partie contraire à la littérature, où plusieurs études ont montré qu'à l'éclosion, la taille corporelle des juvéniles était réduite (alligators: Owerkowicz et al., 2009a; lungman and Piña, 2013; crustacés: Peck and Chapelle, 2003; lézards : Du et al., 2010a; Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Li et al., 2020). Dans nos

expérimentations, la perte de masse des œufs en fin d'incubation en condition hypoxique ne se traduit donc pas par une augmentation de la mortalité embryonnaire ou par une réduction de la masse corporelle des juvéniles à l'éclosion. Couplés à la réduction observée du métabolisme durant le développement des embryons en hypoxie (Tableau 1), notamment à travers la diminution du nombre de battements cardiaques par minute (Du et al., 2009, 2011) et se traduisant par une augmentation de la durée d'incubation des embryons, ces résultats suggèrent une plasticité développementale embryonnaire en réponse à l'hypoxie d'altitude qui favoriseraient le succès d'éclosion de la Couleuvre vipérine.

Au stade juvénile, nos résultats montrent que le métabolisme respiratoire au repos des Couleuvre vipérine, issus d'une incubation en hypoxie d'altitude, est inférieur à celui des juvéniles issus d'une incubation en normoxie (Tableau 2) et qu'ils présentent une hyperventilation. Ces résultats sont en accord avec la littérature, où il est montré qu'en hypoxie le métabolisme est réduit aussi bien chez des espèces ectothermes (Insectes: Hoback and Stanley, 2001; lézards: González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015; Gangloff et al., 2019; Li et al., 2020; tortues: Altland and Parker, 1955; Boyer, 1963; Jackson, 1973; Stone et al., 1992; Herman and Smatresk, 1999), que chez des espèces endothermes (Mammifères: Ramirez et al., 2007; oiseaux: Ramirez et al., 2007; Lague et al., 2016). En accord avec de récents travaux (Dahlhoff et al., 2019; Gangloff et al., 2019), nos résultats montrent également que la réduction du métabolisme des juvéniles issus d'une incubation en condition d'hypoxie à une température de 28°C réduit aussi les performances physiques (*i.e.* vitesse de nage) des individus (Tableau 2). Cependant, les juvéniles issus d'une incubation en hypoxie à une température de 24°C maintiennent des vitesses de nage similaire aux juvéniles incubés en normoxie à la même température, comme cela a été montré dans de précédentes études (Du et al., 2010a; Li et al., 2020). Dans ce cas, il est possible que le développement en hypoxie ait modifié la composition sanguine des individus (Storz, 2007; Storz et al., 2010), améliorant ainsi la capacité du sang à transporter l'oxygène et permettant le maintien des performances physiques. Ce changement biochimique, bien connu des populations de reptiles non-aviens vivant en haute altitude, se traduit par une concentration d'hémoglobine plus grande et un nombre d'hématocrites dans le sang plus élevés que dans les populations de basse altitude (Vinegar and Hillyard, 1972; Weathers and White, 1972; Newlin and Ballinger, 1976; González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015), suggérant un certain niveau de plasticité phénotypique chez les juvéniles. Enfin, les embryons incubés en haute altitude et issus des femelles gravides qui ont également réalisé leur gestation en haute altitude n'ont montré aucune différence avec les embryons incubés en haute altitude mais issus des femelles gravides qui ont réalisé leur gestation en basse altitude.

Pour résumé, nos résultats montrent que, comme chez d'autres espèces de Squamates, les embryons de Couleuvre vipérine incubés en haute altitude ne subissent pas de réduction du succès d'éclosion mais présentent des modifications phénotypiques à la naissance (Du et al., 2010a; Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Li et al., 2020). Cette plasticité développementale embryonnaire, bien qu'elle favorise l'acclimatation à l'hypoxie d'altitude pourrait entraîner des coûts à long terme pour les individus (i.e. hyperventilation, réduction des performances locomotrices, modification de la composition sanguine). Par exemple, les modifications de la composition sanguine des juvéniles, qui permet le maintien des performances est surtout due à l'augmentation de la densité des globules rouges qui à long terme, pourrait augmenter la viscosité du sang et donc les dépenses énergétiques liées à la circulation sanguine (Hedrick et al., 1986; Dunlap, 2006). Néanmoins, dans un contexte de migration en altitude pour retrouver des températures environnementales favorables, nos résultats suggèrent que le stade embryonnaire ne sera pas le facteur limitant dans la capacité à coloniser les milieux de hautes altitudes. En effet, les réponses physiologiques plastiques pourraient atténuer le stress environnemental, favorisant ainsi la survie de la progéniture et modifiant l'évolution ultérieure des populations colonisatrices (Atkinson and Thorndyke, 2001; McNab, 2002; West-Eberhard, 2003; Hammond et al., 2006; Ghalambor et al., 2007).

Cependant, bien que plusieurs espèces de reptiles soient déjà adaptées à la vie à des altitudes extrêmement élevées (i.e. les Lézards du genre *Liolaemus*: Marquet et al., 1989; le Lézards des palissades, *Sceloporus occidentalis* et le Lézard de Sagebrush, *Sceloporus graciosus*: Adolph, 1990; le Lézard de Bonnal, *Iberolacerta bonnali*; Pottier, 2012; *Quedenfeldtia trachyblepharus*: Bouazza et al., 2016; les serpents du genre *Thermophis* : Li et al., 2018; *Phrynocephalus vlangalii*: Wu et al., 2018), si l'augmentation des températures, à travers le réchauffement climatique, continue (scénario 4 ; Figure 1), le mécanisme de production énergétique aérobie des tétrapodes ectothermes pourrait être limité par la diminution de la disponibilité en dioxygène (i.e. OCLTT ; cf. section 1.4.3 (Pörtner, 2002; Pörtner et al., 2017; Gangloff and Telemeco, 2018)).

6.1.5. Scénario 4 : hypoxie d'altitude et réchauffement climatique.

Le quatrième scénario envisagé (Figure 1) concerne le devenir des populations de Couleuvre vipérine qui auraient migré et se seraient maintenues en hypoxie d'altitude (i.e. équivalent à 15% d'O₂ au niveau de la mer, hypoxie d'altitude de 30%), mais qui subiraient malgré tout, à terme, une augmentation des températures (i.e. 32°C) en réponse au changement climatique.

Nos résultats indiquent que l'incubation des embryons dans une condition hypoxique à une température de 32°C, comparée à une incubation hypoxique à une température de 24°C, entraîne une augmentation du rythme cardiaque, réduit la masse moyenne des œufs et réduit la durée d'incubation (Tableaux 1). A l'éclosion, les juvéniles sont de taille réduite et la vitesse de nage est supérieure (Tableau 2). Ces résultats sont similaires à la comparaison des résultats entre une incubation en normoxie à une température de 24°C et 32°C (*cf. section 6.1.3*). Cela indique que même si l'hypoxie d'altitude modifie le développement embryonnaire (Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019; Parker and Dimkovikj, 2019; Li et al., 2020), le facteur principal du développement des embryons reste la température d'incubation (Deeming and Ferguson, 1991; Deeming, 2004; Booth, 2006; Goodman, 2008; Warner, 2014). Pour autant, on constate également une diminution du succès d'éclosion, ce qui suggère globalement un effet délétère de la double contrainte hypoxie d'altitude – température élevée durant l'incubation.

Concernant le développement embryonnaire à une température de 32°C en hypoxie, nos résultats montrent que, comparé à une incubation à 32°C en normoxie, le rythme cardiaque des embryons est réduit (Tableau 1). Ce résultat est conforme à la littérature et est une réponse connue à l'hypoxie chronique chez les Vertébrés (Monge and Leon-Velarde, 1991; Peacock, 1998; Cordero et al., 2017a; Kouyoumdjian et al., 2019). En effet, l'augmentation des températures accélère la fréquence cardiaque des embryons et augmente leur besoin en dioxygène (Du et al., 2010a; b; Hall and Warner, 2020). Avec une disponibilité en dioxygène réduite, les embryons ne peuvent pas maintenir des niveaux métaboliques maximum (*i.e.* quand les niveaux de dioxygène ne sont pas limitant). Avec cette réduction du rythme cardiaque, la durée d'incubation est plus longue (Tableau 1). Ce résultat est en accord avec la littérature si l'on considère que le nombre de battements cardiaques est le facteur déterminant de la durée d'incubation (Du et al., 2009, 2011). Nos résultats soulignent également que la masse des œufs est similaire à celle des œufs incubés en normoxie pour la même température d'incubation de 32°C (Tableau 1), avec une chute de la masse en fin d'incubation plus importante. Cette chute plus importante en hypoxie est due à l'incompatibilité entre la demande en dioxygène des embryons et l'apport disponible en hypoxie de haute altitude, réduisant la fixation du carbone et diminuant la transformation des réserves lipidiques en glucides (Cunningham and Hurwitz, 1936; *cf. section 1.6.4*). Nos résultats montrent que dans cette condition d'incubation le succès d'éclosion est inférieur (-15%) à celui de chacune des trois autres conditions d'incubation (Tableau 1). Cette réduction du succès d'éclosion en condition d'hypoxie et d'une haute température est connue (Iungman and Piña, 2013; Flewelling and Parker, 2015; Smith et al., 2015; Hall and Warner, 2020). Plus précisément, 92% des embryons qui n'ont pas éclos sont morts dans le dernier quart du développement, là où la demande en oxygène est la plus haute (Dmi'el, 1970; Sartori et al., 2017).

A l'éclosion, les juvéniles (Tableau 2) incubés en hypoxie à 32°C, ont une masse et une longueur corporelle plus petites que ceux incubés à une température de 32°C en normoxie. Ces résultats soulignent un effet direct de la réduction du développement embryonnaire (Douglas et al., 2005; Harrison et al., 2015). Malgré ces résultats, les mesures de vitesse de nage montrent que les juvéniles issus de cette incubation sont les plus rapides (Tableau 2). Cela n'est pas en accord avec la littérature qui stipule que dans cette condition d'incubation les performances physiques des juvéniles sont réduites (Iungman and Piña, 2013; Liang et al., 2015). En effet, selon la théorie de l'OCLTT (*cf. section 1.4.3*), l'augmentation de la température, et donc du métabolisme, augmente la demande en dioxygène (Pörtner, 2002; Jackson, 2007; Pörtner and Knust, 2007; Verberk et al., 2016; Pörtner et al., 2017). Ainsi l'inadéquation entre la demande en dioxygène de l'organisme et sa capacité à la fournir réduira les performances des individus (Pörtner, 2002; Pörtner et al., 2017; Gangloff and Telemeco, 2018). Néanmoins, les performances de nage de ces juvéniles maintenu en condition hypoxique diminue rapidement après l'éclosion. La vitesse de nage étant, chez les serpents, un trait écologique important pour échapper aux prédateurs et acquérir de la nourriture (Jayne and Bennett, 1990; Kingsolver et al., 2001), il est probable que la survie des juvéniles soient réduites.

Nos résultats montrent que dans une condition d'incubation hypoxique à une température élevée, le développement embryonnaire est impacté et le succès d'éclosion réduit. Cela suggère que la plasticité développementale embryonnaire en réponse à l'augmentation des températures (scénario 2) et à l'hypoxie d'altitude (scénario 3) ne permet pas, dans un contexte de double contraintes, aux embryons de produire des juvéniles acclimatés. De plus, les juvéniles ont une longueur corporelle réduite, et, bien que les performances de nage soient dans un premier temps supérieures, elles diminuent rapidement après l'éclosion, indiquant une probable diminution du taux de survie des juvéniles. Qui plus est, si dans le futur, les températures environnementales s'approchent des températures d'incubation létales, en accord avec l'OCLTT (Pörtner, 2002; Pörtner et al., 2017; Gangloff and Telemeco, 2018), les besoins en dioxygène de l'embryon ne pourront pas être assurés ce qui diminuera encore les succès d'éclosion (Iungman and Piña, 2013; Flewelling and Parker, 2015; Smith et al., 2015; Hall and Warner, 2020). De plus, tout comme l'effet de l'augmentation des températures en basse altitude, les changements phénotypiques pourraient avoir pour conséquences des modifications dans la structure et la dynamique des populations (Daufresne et al., 2009; Le Galliard et al., 2010; Cunningham et al., 2017) ce qui impactera négativement la démographie des populations, quand elles n'entraîneront pas leur extinction (Whitfield et al., 2007; Sinervo et al., 2010; Bestion et al., 2015a).

6.2. Critiques et perspectives

Avec le réchauffement climatique, de nombreuses espèces migrent le long du gradient altitudinal des zones montagneuses pour retrouver des conditions environnementales favorables (Walther et al., 2002; Parmesan and Yohe, 2003; Hickling et al., 2006; Lenoir et al., 2008; Chen et al., 2011; Pottier, 2012; Bässler et al., 2013; Pauchard et al., 2016; Freeman et al., 2018; Bani et al., 2019). Cependant, les réponses physiologiques et comportementales à l'hypoxie de haute altitude chez les reptiles non-aviens sont encore mal connues et n'ont reçu qu'une attention récente (González-Morales et al., 2015; Lu et al., 2015; Cordero et al., 2017a; Li et al., 2018, 2020; Gangloff et al., 2019; Kouyoumdjian et al., 2019; Parker and Dimkovikj, 2019). Néanmoins, il est probable que, tout comme l'hypoxie liée à l'enfouissement des œufs ou à l'immersion prolongée dans l'eau, les réponses varient en fonction des différents ordres (*i.e.* Crocodiliens, Chéloniens et Squamates; Porteus et al., 2011). Des travaux plus poussés sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la plasticité embryonnaire, mais aussi pour évaluer la plasticité comportementale potentielle des juvéniles qui se sont développés dans des milieux de haute altitude. De plus, les aspects maternels (*i.e.* choix de site de ponte) pourraient, dans un premier temps, prendre une part importante dans la réussite de la colonisation de ces milieux, actuellement considérés comme des refuges potentiels face au changement climatique (Sinervo et al., 2018). Dans un deuxième temps, il semble important de définir si ces espèces pourront se maintenir à ces altitudes si les températures continuent d'augmenter, même dans ces zones refuges. Bien que nos résultats aient montré que les embryons de Couleuvre vipérine soient en mesure de se développer en hypoxie de haute altitude et d'être viables à la naissance, beaucoup de paramètres ne sont pas abordés dans nos expériences. Malgré le succès du développement embryonnaire en condition d'hypoxie, à travers la plasticité phénotypique, nous ne connaissons pas les conséquences sur le long terme, notamment sur la survie des juvéniles. Si ces modifications sont bénéfiques à l'individu et améliorent son acclimatation à l'hypoxie, alors la plasticité phénotypique embryonnaire sera considéré comme adaptative. A l'inverse, si les coûts réduisent l'acclimatation à long terme, alors la plasticité phénotypique embryonnaire sera considérée comme non-adaptative (Noble et al., 2018). En effet, nous savons que des températures élevées durant le développement peuvent imposer des contraintes à la croissance qui ne seront visibles que tardivement dans la vie de l'individu (Angilletta and Dunham, 2003). Il serait donc intéressant de continuer les mesures des performances des phénotypes des juvéniles à plus long terme. Enfin, afin de limiter le nombre de variables durant l'incubation et extraire des mesures précises des réponses des embryons aux différentes conditions testées, il était indispensable de simplifier les conditions d'incubation. Pour cela, nous nous sommes affranchi de plusieurs paramètres comportementaux naturels présents chez la Couleuvre vipérine. En effet, chez cette

espèce es femelles pondent dans un site de ponte adéquat pour le développement des embryons, et disposent les œufs accolés ou non. Ainsi, chez cette espèce qui pond dans des sites dits communautaires, l'éclosion des juvéniles peut se faire de manière synchrone au sein d'une même pontes mais aussi entre plusieurs pontes. En s'affranchissant des paramètres comportementaux de choix maternel et de l'éclosion synchrone, nous avons probablement modifié en partie les réponses à l'hypoxie du développement embryonnaire et donc de la durée d'incubation. De plus, en utilisant, la normoxie de basse altitude (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer) comme scénario contrôle, nous surévaluons potentiellement les différences entre les réponses en normoxie et en hypoxie. En effet, les nids des Couleuvres vipérines étant souterrains, il n'est pas impossible que le développement embryonnaire se fasse en condition d'hypoxie légère.

6.2.1. Le phénomène de synchronie à l'éclosion

La durée d'incubation des œufs bien que réduite de façon significative en condition d'hypoxie pourrait n'être due, chez les embryons de Couleuvre vipérine, qu'à la variation interindividuelle dans les durées d'incubation au sein d'une même ponte (Aubret et al., 2016a; b, 2017). Cependant, chez de nombreuses espèces ovipares, les juvéniles éclosent de manière synchrone (insectes : Nishide and Tanaka, 2016; Tanaka, 2017; poissons : Bradbury et al., 2004; amphibiens : Sih and Moore, 1993; Warkentin, 1995, 2000; oiseaux : Lack, 1968; Vince, 1969; Stoleson and Beissinger, 1999; crocodiles : Ferguson, 1985; tortues : Spencer et al., 2001; Colbert et al., 2010; Spencer and Janzen, 2011; lézards : Vitt, 1991; serpents : Aubret et al., 2017). Ce phénomène d'éclosion synchrone est également présent chez la Couleuvre vipérine (Aubret, 2013a; Aubret et al., 2016b), notamment à travers la ponte dans des sites de ponte communautaire (Vacher and Santos, 2010). L'objectif de ce cette éclosion synchrone est de diluer le risque de prédation individuel par le nombre (Arnold and Wassersug, 1978; Delm, 1990; Spencer et al., 2001; Spencer and Janzen, 2011; Santos et al., 2016). Chez les tortues par exemple, le nid subit un gradient de température vertical, avec des températures plus élevées en haut. Cette température plus élevée va accélérer le métabolisme des embryons qui vont donc éclore plus rapidement. Les embryons des œufs situés plus bas dans le nid, où les températures sont plus froides, vont palier un développement plus lent par l'augmentation de leur rythme cardiaque et accélérer leur développement ou éclore prématurément pour assurer la synchronisation de leur éclosion (Spencer et al., 2001). Cependant, les mécanismes sous-jacents de cette communication ne sont pas encore bien définis (Spencer et al., 2001; Aubret et al., 2016b). Chez les insectes ovipares, des études ont montré que des œufs maintenus en grappe synchronisaient leur éclosion contrairement à ceux maintenus isolés, avec l'hypothèse que cette synchronisation se réalise via la perception d'informations reçues des œufs voisins (Nishide and

Tanaka, 2016; Tanaka, 2017). De plus, l'information transmise nécessaire à la synchronisation ne serait ni auditive ni due à des phéromones mais vibratoire (Nishide and Tanaka, 2016). Il semblerait que chez la Couleuvre vipérine, un mécanisme informatif similaire, à travers les battements cardiaques des embryons, favorise la synchronie à l'éclosion. En effet, le rythme cardiaque des œufs plus jeunes placés à côté d'œufs plus vieux va accélérer afin qu'ils éclosent en même temps que ces œufs plus âgés (Aubret et al., 2016b). De plus, des travaux chez les oiseaux ont montré que les oisillons éclosent généralement après un nombre cumulatif fixe, mais spécifique à l'espèce, de battements cardiaques depuis le début de l'incubation (Ar and Tazawa, 1999; Tazawa, 2005). Chez les reptiles, des travaux similaires ont permis de définir que le nombre total de battements cardiaques pendant l'embryogenèse était relativement constant dans des conditions d'incubation chaudes et que pour des incubations à basse température le nombre total de battements requis pour compléter l'embryogenèse était augmenté (Du et al., 2009, 2011). Ces études démontrent que la durée d'incubation chez les reptiles non-aviens est probablement déterminée par le nombre de battements cardiaques, lui-même déterminé par la température d'incubation (Greenwald, 1971; Du et al., 2010a; c). Néanmoins, dans nos expériences, les œufs de chaque groupe de traitement n'étaient pas physiquement en contact et ne pouvaient donc pas partager d'information pour permettre une synchronisation de l'éclosion.

Compte tenu de ces connaissances, il serait peut-être nécessaire de mesurer les réponses du développement embryonnaire en condition d'hypoxie d'altitude en tenant compte de ce phénomène d'éclosion synchrone. Cela pourrait réduire la variabilité interannuelle, notamment au niveau du rythme cardiaque des embryons mais aussi modifier l'écart entre la durée d'incubation des groupes d'œufs incubés en normoxie ou en hypoxie d'altitude, à une même température.

6.2.2. *L'importance des données sur le long terme*

Les expérimentations menées durant cette thèse avaient pour objectif de fournir des réponses sur les capacités de la Couleuvre vipérine à coloniser les zones de haute altitude. Nous nous sommes uniquement intéressés à mesurer les effets de l'hypoxie et des températures sur le développement embryonnaire et sur les performances juvéniles jusqu'à un mois après l'éclosion. Ce choix expérimental ne nous permet pas d'obtenir des informations sur les modifications à plus long terme des conditions physiques des juvéniles, sur leurs comportements ou encore sur leur survie, en réponse à une hypoxie chronique avec des températures plus ou moins importantes. Comme nous avons pu le constater durant nos expériences, la température durant le développement embryonnaire peut avoir des effets sur le phénotype des juvéniles (Deeming and Ferguson, 1991;

Shine et al., 1997; Wapstra, 2000; Blouin-Demers et al., 2004; Booth, 2006; Watkins and Vraspir, 2006; Warner, 2014). Des études montrent que, pour de nombreuses espèces ectothermes, des conditions froides seraient favorables en condition hypoxique afin de réduire la température corporelle des individus, diminuant ainsi la demande en dioxygène des organismes (Dupré and Wood, 1988; Dupré et al., 1988; Jackson, 2007) et limitant la déshydratation (Dupoué et al., 2017). De plus, les conditions de température rencontrées au début de la vie pourraient également entraîner des modifications du comportement de thermorégulation des individus à plus long terme : la préférence thermique des serpent à l'âge adulte dépend d'ailleurs plus des conditions thermiques vécues pendant le développement que des conditions thermiques actuelles, démontrant les limites de la plasticité phénotypiques (Aubret and Shine, 2010). Connaître les effets de l'hypoxie d'altitude sur ces paramètres semblent d'autant plus importantes que l'hypoxie d'altitude modifie de manière importante les réponses phénotypiques des organismes ectothermes, notamment en limitant la gamme des températures optimums pour les performances (Gangloff and Telemeco, 2018).

Pour mesurer, les effets de l'hypoxie d'altitude sur les individus, nous pourrions à travers différentes expérimentations contrôlées en laboratoire mesurer les préférences thermiques des individus au repos et en activité. Les individus de Couleuvre vipérine nés et maintenus en haute altitude pourraient être placés dans un terrarium où un gradient thermique serait artificiellement maintenu et nous pourrions relever ces choix de thermorégulation. Si une telle plasticité comportementale existe chez les individus de Couleuvre vipérine, nous devrions nous attendre à ce que les individus choisissent de se maintenir à des températures plus froides que des individus nés et maintenus en basse altitude. Nous pourrions également comparer les taux de croissance ainsi que la survie des individus jusqu'à ce qu'ils soient en âge de se reproduire.

6.2.3. Choix maternel et plasticité comportementale

La plasticité comportementale peut être un mécanisme particulièrement efficace pour atténuer les effets des variations environnementales car ces comportements peuvent changer rapidement tout en étant réversibles (Charmantier et al., 2008; Huey et al., 2012; Zuk et al., 2014; Muñoz et al., 2015). Par exemple, avec le changement climatique, un modèle prédictif chez un lézard, *Sceloporus undulatus*, prévoit des échecs de reproduction sur 35 % de l'aire de répartition d'ici 2100, en réponse à la température du sol, et donc des nids, qui deviendrait létale pour les embryons. Toutefois, si les femelles pondent leurs œufs dans des microhabitats 25 % plus ombragés ou 3 cm plus profonds, les prévisions s'inversent et les populations pourraient bénéficier des modifications climatiques (Levy et al., 2015). De façon empirique, des études se sont intéressées à des comportements de sélection de

site de ponte par des femelles gravides de plusieurs espèces de reptiles qui avaient pour résultat une amélioration du phénotype physique des juvéniles (Burger and Zappalorti, 1986; Escalona et al., 2009; Pike et al., 2010; Refsnider et al., 2010; Peet-Paré and Blouin-Demers, 2012). Chez certaines espèces, quand plusieurs sites de ponte sont disponibles, les femelles choisissent des sites relativement ouverts et chauds pour pondre leurs œufs, ce qui a un effet positif sur le succès d'éclosion (Angilletta et al., 2009; Pruett et al., 2019). De même, les femelles vont chercher des sites de ponte suffisamment humides pour éviter la dessiccation des œufs et favoriser le phénotype des juvéniles (Brown and Shine, 2004). Chez des lézards dont le sexe est déterminé par la température, une plasticité comportementale des femelles dans le choix des sites de ponte compense les effets du changement climatique sur le sex-ratio des juvéniles (Doody et al., 2006). À l'inverse d'autres études ont montré que des femelles de lézard qui ont été soumises à une augmentation des températures environnementales n'ont pas ou trop peu modifié leur comportement de nidification, ce qui réduit la fitness des juvéniles à la naissance (Telemeco et al., 2009, 2016). Dans le contexte actuel du changement climatique, les femelles de Couleuvre vipérine pourraient monter en altitude pour y trouver des températures plus fraîches et s'y pondre. Les embryons seront donc soumis à des contraintes environnementales nouvelles. Dans le cadre de mes travaux, les expériences menées sur l'incubation des embryons de Couleuvre vipérine en condition d'hypoxie à basses températures ont induit une réduction des performances de nage chez les juvéniles. Cependant, l'incubation en condition d'hypoxie et à des températures plus élevées a permis d'augmenter la vitesse de nage des juvéniles, un trait écologique qui améliore l'acquisition de nourriture et l'évitement des prédateurs (Jayne and Bennett, 1990; Kingsolver et al., 2001). Afin de maximiser les performances de nage, les femelles gravides de Couleuvre vipérine en condition d'hypoxie pourraient, à travers de la plasticité comportementale, pondre leurs œufs dans des sites de ponte avec des températures plus élevées quand les sites de pontes de basse altitude. Cette plasticité pourra être considérée adaptative ce qui pourrait entraîner à terme, par la sélection naturelle, le maintien de ce comportement dans la population (Aubret and Shine, 2009).

Pour tester cette hypothèse plasticité comportementale dans la sélection de site de ponte, les femelles gravides de Couleuvre vipérine capturées en basse altitude devront être séparées en deux groupes. Un groupe de femelles gravides restera en gestation à basse altitude en condition de normoxie et un autre groupe sera transféré en haute altitude en condition d'hypoxie. Les femelles gravides seront placées individuellement dans des terrariums offrant plusieurs boîtes de ponte à différentes températures, comme par exemple les trois températures d'incubation utilisées dans cette thèse (i.e. 24°C, 28°C et 32°C ; Figure 1). À la ponte, les œufs de chaque ponte pourront être équitablement répartis dans les trois températures d'incubation. Différents paramètres du

développement embryonnaire, comme le rythme cardiaque, la masse des œufs ou encore le métabolisme respiratoire pourront être suivis. A l'éclosion différents paramètres du phénotype des juvéniles pourront être mesurés comme la durée d'incubation, la taille et la masse corporelle, la vitesse de nage ou encore le métabolisme respiratoire. Les individus juvéniles pourront être maintenus en haute altitude (*i.e.* hypoxie d'altitude) et les mesures répétées à moyen et long terme. Avec cette expérience, nous devrions être en mesure de déterminer si la femelle de Couleuvre vipérine à préalablement pondus ses œufs dans le site de ponte qui maximisait le phénotype des individus en condition d'hypoxie.

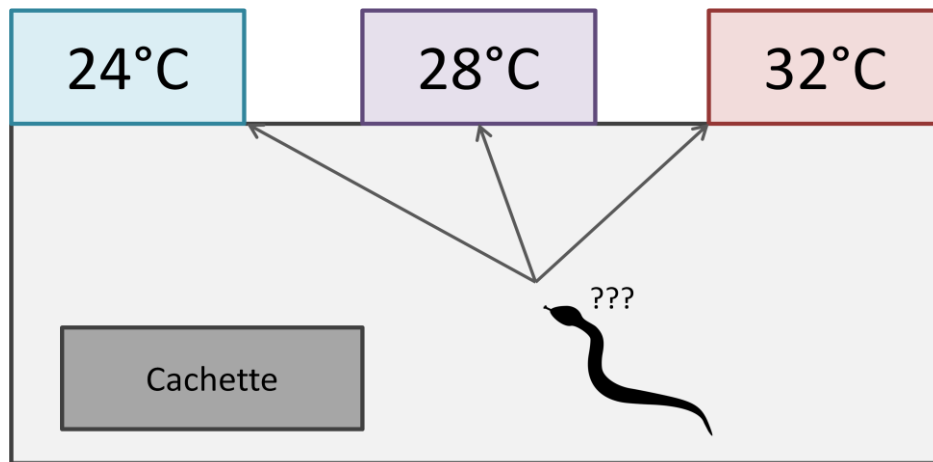


Figure 1 : Représentation schématique d'un terrarium de femelles gravides de Couleuvre vipérine, *Natrix maura*, avec trois boîtes de ponte disponibles avec chacune une température de d'incubation différente.

6.2.4. L'hypoxie d'altitude similaire à l'hypoxie des sites de pontes ?

Chez les reptiles non-aviens, la similarité entre les réponses développementales et phénotypiques à l'hypoxie d'altitude et celles à l'hypoxie liée à l'enfouissement dans des nids souterrains (Annexe 1) soulèvent une question importante quant à l'utilisation de la condition normoxique (*i.e.* équivalent à 21% d'O₂ au niveau de la mer) comme contrôle. En effet, dans les nids souterrains, les embryons doivent ajustés leur développement en fonction des fluctuations de la concentration des gaz (Packard and Packard, 1988; Deeming and Thompson, 1991; Ackerman and Lott, 2004). Par exemple, dans des nids de tortues (Prange and Ackerman, 1974; Ackerman, 1977) et de crocodiles (Lutz and Dunbar-Cooper, 1984; Whitehead, 1987), des mesures de la concentration en dioxygène chutaient progressivement durant l'incubation. Cette diminution pourrait être due à la difficulté de circulation de l'air dans les nids profonds mais aussi en fin d'incubation à la consommation en dioxygène importante des embryons. En effet, à la fin de l'incubation la demande en dioxygène des embryons augmentent (Dmi'el, 1970; Sartori et al., 2017). De plus, les tortues et les crocodiles pondent

relativement beaucoup d'œufs et de taille conséquente ce qui augmente la diminution de la concentration de dioxygène disponible dans les nids. Dans des sites de ponte moins profonds, comme chez l'iguane terrestre de Cuba, *Cyclura nubila*, des mesures de la concentration en dioxygène ont montré que les concentrations de dioxygène variaient entre 17% et 20% (équivalent au niveau de la mer), en fonction des conditions de température et d'humidité (Christian and Lawrence, 1991). Dans ces nids, aucune chute de la concentration en dioxygène n'a été enregistrée en fin d'incubation, ce qui s'explique par une taille et un nombre d'œufs réduits. La Couleuvre vipérine est une espèce qui, tout comme les iguanes, pond ses œufs, peu nombreux et de petites tailles, dans des nids souterrains peu profonds. Cependant, ces sites de pontes sont dit communautaires, c'est-à-dire que plusieurs femelles y pondent (Vacher and Geniez, 2010; Pottier, 2016). Malgré une taille et un nombre d'œufs assez faible par femelle (Vacher and Geniez, 2010), le regroupement de plusieurs pontes peu constituer une masse et un nombre d'œufs suffisant pour entraîner des diminutions de la concentration en dioxygène dans les nids entraînant une hypoxie locale. Néanmoins, aucune étude n'a actuellement mesuré les niveaux d'hypoxie dans les nids communautaires de couleuvres européennes. Bien que cela soit spéculatif, il est possible que la condition d'hypoxie d'altitude durant l'incubation utilisée dans nos expériences soit plus proche de la condition d'incubation des sites de ponte naturel que le groupe contrôle utilisé (*i.e.* normoxie en basse altitude). Si cela s'avère exacte, l'ensemble des résultats de cette thèse, ainsi que de nombreuses études traitant des effets de l'hypoxie d'altitude doivent être réévalués. Il semble donc nécessaire de mesurer différents paramètres du développement embryonnaire (*i.e.* rythme cardiaque, durée d'incubation...) et des phénotypes juvéniles à l'éclosion dans les sites de pontes naturels et de les comparer aux résultats obtenus durant une incubation en normoxie et en hypoxie d'altitude.

6.3. Conclusion générale

Avant tout chose, il est important de rappeler que les expériences menées durant cette thèse ne visaient pas à reproduire une situation biologiquement pertinente à court terme, mais plutôt à simuler des scénarios futurs qui associent une modification d'un facteur environnemental (*i.e.* le réchauffement climatique) à la remonté altitudinale d'une espèce en réponse à cette modification. En effet, nous avons dans un premier temps directement déplacé des œufs de Couleuvre vipérine de basse altitude vers des zones de haute altitude avec des écarts d'altitude allant de 2100m à 2500m, en fonction de l'origine des femelles gravides. Dans un second temps, nous avons déplacé des juvéniles de Couleuvre vipérine nés à basse altitude à haute altitude et inversement. Néanmoins, de

telles approches sont nécessaires pour pressentir les capacités des espèces (*i.e.* plasticité phénotypique) à s'acclimater à cette potentielle future contrainte environnementale qu'est l'hypoxie d'altitude. De nombreuses espèces de Squamates sont présentes à des altitudes élevées (lézards : Huey, 1977; Marquet et al., 1989; Adolph, 1990; Pottier, 2012; Bouazza et al., 2016; Wu et al., 2018; serpent : Lue et al., 1999; Luiselli et al., 2007; Huang et al., 2013), et témoignent que la colonisation et l'établissement y sont possibles pour les amniotes ectothermes ovipares. Ces colonisations ancestrales suggèrent que les espèces d'ectothermes de basse altitude pourront, en réponse à l'augmentation des températures (Pachauri et al., 2014; IPCC, 2018), atteindre ces zones de haute altitude pour y trouver un refuge thermique (Sinervo et al., in prep., 2018; Pottier, 2012; Bäessler et al., 2013). Cependant, les processus naturels de colonisation sont graduels et permettent aux organismes d'ajuster leur physiologie et leur comportement au moyen de la plasticité phénotypique (Munday et al., 2017), de la sélection naturelle (Aubret and Shine, 2009) et de la sélection spatiale (Phillips and Perkins, 2019) conduisant éventuellement, si les conditions le favorisent, à une adaptation locale (Bouverot, 1985; Rezende et al., 2005; Beall, 2006; Hammond et al., 2006; Powell and Hopkins, 2010; Storz et al., 2010; Mueller et al., 2015).

Globalement, les résultats de ces travaux de thèse confirment que la température d'incubation est le facteur clé du développement embryonnaire chez les reptiles non-aviens (Deeming and Ferguson, 1991; Deeming, 2004; Booth, 2006; Goodman, 2008; Warner, 2014). Ils ont démontré que les variations de températures modifient de manière importante les réponses à l'hypoxie d'altitude du développement embryonnaires et des phénotypes juvéniles. En effet, nos résultats ont montré que, dans un premier temps, la Couleuvre vipérine serait capable de se reproduire en condition d'hypoxie, un des éléments indispensable à l'établissement des populations (Grevstad, 1999; Yeh, 2004). Les embryons, à travers la plasticité développementale, seraient capables de se développer en condition d'hypoxie et pourraient maintenir des phénotypes leur permettant de conserver des performances similaires à celles des individus de l'espèce en basse altitude (Bodensteiner et al., 2020). Dans un second temps, si le changement climatique s'intensifie, l'augmentation des températures dans les milieux de haute altitude modifiera de manière importante les conditions de développement des embryons et devrait influencer la direction de l'évolution ultérieure des populations colonisatrices (Atkinson and Thorndyke, 2001; McNab, 2002; Hammond et al., 2006; Ghalambor et al., 2007). Nos résultats montrent que dans ce contexte, les réponses physiologiques plastiques des embryons de Couleuvre vipérine seraient limités (*i.e.* diminution du succès d'éclosion et taille corporelle réduite) mais favorisant à court terme les performances des juvéniles (*i.e.* diminution rapide des performances).

RÉFÉRENCES

A

- Ackerman RA. 1977. The respiratory gas exchange of sea turtle nests (*Chelonia*, *Caretta*). *Respir Physiol* 31:19–38.
- Ackerman RA, Dmi'el R, Ar A. 1985. Energy and Water Vapor Exchange by Parchment-Shelled Reptile Eggs. *Physiol Zool* 58:129–137.
- Ackerman RA, Lott DB. 2004. Thermal, hydric and respiratory climate of nests. *Reptil Incubation Environ Evol Behav*:15–43.
- Adolph SC. 1990. Influence of Behavioral Thermoregulation on Microhabitat Use by Two *Sceloporus* Lizards. *Ecology* 71:315–327.
- Alexander JM, Chalmandrier L, Lenoir J, Burgess TI, Essl F, Haider S, Kueffer C, McDougall K, Milbau A, Nuñez MA, Pauchard A, Rabitsch W, Rew LJ, Sanders NJ, Pellissier L. 2018. Lags in the response of mountain plant communities to climate change. *Glob Change Biol* 24:563–579.
- Alroy J. 1996. Constant extinction, constrained diversification, and uncoordinated stasis in North American mammals. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 127:285–311.
- Altland PD, Parker M. 1955. Effects of Hypoxia Upon the Box Turtle. *Am J Physiol-Leg Content* 180:421–427.
- Andrews RM, Mathies T, Warner DA. 2000. Effect of Incubation Temperature on Morphology, Growth, and Survival of Juvenile *Sceloporus undulatus*. *Herpetol Monogr* 14:420–431.
- Andrews RM, Schwarzkopf L. 2012. Thermal performance of squamate embryos with respect to climate, adult life history, and phylogeny. *Biol J Linn Soc* 106:851–864.
- Angilletta MJ. 2009. *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. OUP Oxford.
- Angilletta MJ, Dunham AE. 2003. The Temperature-Size Rule in Ectotherms: Simple Evolutionary Explanations May Not Be General. *Am Nat* 162:332–342.
- Angilletta MJ, Huey RB, Frazier MR. 2010. Thermodynamic Effects on Organismal Performance: Is Hotter Better? *Physiol Biochem Zool* 83:197–206.
- Angilletta MJ, Niewiarowski PH, Navas CA. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J Therm Biol* 27:249–268.
- Angilletta MJ, Sears MW, Pringle RM. 2009. Spatial dynamics of nesting behavior: Lizards shift microhabitats to construct nests with beneficial thermal properties. *Ecology* 90:2933–2939.
- Ar A, Tazawa H. 1999. Analysis of heart rate in developing bird embryos: effects of developmental mode and mass. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 124:491–500.
- Arneth A, Fatima D, Agus F., Elbehri, Aziz, Erb, Karl Heinz, Osman Elasha, B., Rahimi, Mohammad, Rounsevell, Mark, Spence, Adrian, Valentini, Riccardo, Debonne, Niels, Environmental Geography. 2019. Framing and Context. In: *Climate Change and Land*. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). p 1–98. Available from: <https://research.vu.nl/en/publications/9808224f-696a-4a7e-b6a8-a13c1924109f>

RÉFÉRENCES

- Arnold SJ, Wassersug RJ. 1978. Differential Predation on Metamorphic Anurans by Garter Snakes (Thamnophis): Social Behavior as a Possible Defense. *Ecology* 59:1014–1022.
- Atkinson D. 1994. Temperature and organism size: a biological law for ectotherms? *Temp Org Size Biol Law Ectotherms* 25:1–58.
- Atkinson D, Sibly RM. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol Evol* 12:235–239.
- Atkinson D, Thorndyke MC eds. 2001. *Environment and animal development: genes, life histories and plasticity*. Oxford: BIOS Scientific.
- Aubret F. 2004. Aquatic locomotion and behaviour in two disjunct populations of Western Australian tiger snakes, *Notechis ater occidentalis*. *Aust J Zool* 52:357–368.
- Aubret F. 2013a. Heart rates increase after hatching in two species of natricine snakes. *Sci Rep* 3:3384.
- Aubret F. 2013b. Role and evolution of adaptive plasticity during the colonization of novel environments. In: Valentino JB, Harrelson PC, editors. *Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms, Evolutionary Significance and Impact on Speciation*. Novinka. New York: p 1–34.
- Aubret F, Bignon F, Bouffet-Halle A, Blanvillain G, Kok PJR, Souchet J. 2017. Yolk removal generates hatching asynchrony in snake eggs. *Sci Rep* 7:3041.
- Aubret F, Bignon F, Kok PJR, Blanvillain G. 2016a. Only child syndrome in snakes: Eggs incubated alone produce asocial individuals. *Sci Rep* 6:35752.
- Aubret F, Blanvillain G, Bignon F, Kok PJR. 2016b. Heartbeat, embryo communication and hatching synchrony in snake eggs. *Sci Rep* 6:23519.
- Aubret F, Bonnet X, Maumelat S. 2005. Tail loss, body condition and swimming performances in tiger snakes, *Notechis ater occidentalis*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 303A:894–903.
- Aubret F, Shine R. 2009. Genetic Assimilation and the Postcolonization Erosion of Phenotypic Plasticity in Island Tiger Snakes. *Curr Biol* 19:1932–1936.
- Aubret F, Shine R. 2010. Thermal plasticity in young snakes: how will climate change affect the thermoregulatory tactics of ectotherms? *J Exp Biol* 213:242–248.
- Aubret F, Tort M, Blanvillain G. 2013. A non-invasive method of measuring heart rates in small reptiles and amphibians. *Herpetol Rev* 44:421–423.
- Aubret F, Tort M, Sarraude T. 2015. Evolution of alternative foraging tactics driven by water temperature and physiological constraints in an amphibious snake. *Biol J Linn Soc* 115:411–422.

B

- Badeck F-W, Bondeau A, Böttcher K, Doktor D, Lucht W, Schaber J, Sitch S. 2004. Responses of spring phenology to climate change. *New Phytol* 162:295–309.
- Baguette M, Benton TG, Bullock JM. 2012. *Dispersal Ecology and Evolution*. Oxford University Press.
- Baker PJ, Costanzo JP, Lee RE. 2007. Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. *J Comp Physiol B* 177:875–883.
- Bambach RK. 2006. Phanerozoic Biodiversity Mass Extinctions. *Annu Rev Earth Planet Sci* 34:127–155.

RÉFÉRENCES

- Bani L, Luppi M, Rocchia E, Dondina O, Orioli V. 2019. Winners and losers: How the elevational range of breeding birds on Alps has varied over the past four decades due to climate and habitat changes. *Ecol Evol* 9:1289–1305.
- Barber JR, Crooks KR, Fristrup KM. 2010. The costs of chronic noise exposure for terrestrial organisms. *Trends Ecol Evol* 25:180–189.
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersey B, Ferrer EA. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471:51–57.
- Bartholomew GA. 1982. Physiological control of body temperature. In: Gans C, Pough FH, editors. *Biology of the Reptilia*. Vol. 12. . p 167–211.
- Bartlett D, Birchard GF. 1983. Effects of hypoxia on lung volume in the garter snake. *Respir Physiol* 53:63–70.
- Bashiri F. 2014. Light Pollution and Its Effect on the Environment. *Int J Fundam Phys Sci IJFPS* 4:8–12.
- Bässler C, Hothorn T, Brandl R, Müller J. 2013. Insects Overshoot the Expected Upslope Shift Caused by Climate Warming. *PLOS ONE* 8:e65842.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2014. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *ArXiv14065823 Stat [Internet]*. Available from: <http://arxiv.org/abs/1406.5823>
- Bea A. 1985. Anfíbios y reptiles. In: Alvarez J, Bea A, Faus J-M, Castien E, Mendiola I, editors. *Araba, Bizkaia eta Gipuzkoako Kontinentalen Atlas-Atlas de los Vertebrados Continentales de Alava Vizcaya y Guipuzcoa*. Viceconsejería de Medio Ambiente. Gobierno Vasco, Victoria. p 55–99.
- Beall CM. 2006. Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Integr Comp Biol* 46:18–24.
- Beall CM, Decker MJ, Brittenham GM, Kushner I, Gebremedhin A, Strohl KP. 2002. An Ethiopian pattern of human adaptation to high-altitude hypoxia. *Proc Natl Acad Sci* 99:17215–17218.
- Beaman JE, White CR, Seebacher F. 2016. Evolution of Plasticity: Mechanistic Link between Development and Reversible Acclimation. *Trends Ecol Evol* 31:237–249.
- Beitinger TL, Fitzpatrick LC. 1979. Physiological and Ecological Correlates of Preferred Temperature in Fish. *Integr Comp Biol* 19:319–329.
- Bennett AF. 1972. The effect of activity on oxygen consumption, oxygen debt, and heart rate in the lizards *Varanus gouldii* and *Sauromalus hispidus*. *J Comp Physiol* 79:259–280.
- Bennett AF. 1980. The thermal dependence of lizard behaviour. *Anim Behav* 28:752–762.
- Bennett S, Duarte CM, Marbà N, Wernberg T. 2019. Integrating within-species variation in thermal physiology into climate change ecology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 374:20180550.
- Bertrand R, Lenoir J, Piedallu C, Riofrío-Dillon G, de Ruffray P, Vidal C, Pierrat J-C, Gégout J-C. 2011. Changes in plant community composition lag behind climate warming in lowland forests. *Nature* 479:517–520.
- Bertrand R, Riofrío-Dillon G, Lenoir J, Drapier J, de Ruffray P, Gégout J-C, Loreau M. 2016. Ecological constraints increase the climatic debt in forests. *Nat Commun* 7:12643.
- Bestion E, Clobert J, Cote J. 2015b. Dispersal response to climate change: scaling down to intraspecific variation. *Ecol Lett* 18:1226–1233.
- Bestion E, Jacob S, Zinger L, Di Gesu L, Richard M, White J, Cote J. 2017. Climate warming reduces gut microbiota diversity in a vertebrate ectotherm. *Nat Ecol Evol* 1:1–3.

RÉFÉRENCES

- Bestion E, Teyssier A, Richard M, Clobert J, Cote J. 2015a. Live Fast, Die Young: Experimental Evidence of Population Extinction Risk due to Climate Change. *PLOS Biol* 13:e1002281.
- Beyer EC, Spotila JR. 1994. Seasonal variation in metabolic rates and maintenance costs of the eastern fence lizard, *Sceloporus undulatus*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 109:1039–1047.
- Bickler PE, Buck LT. 2007. Hypoxia Tolerance in Reptiles, Amphibians, and Fishes: Life with Variable Oxygen Availability. *Annu Rev Physiol* 69:145–170.
- Black CP, Snyder GK. 1980. Oxygen Transport in the Avian Egg at High Altitude. *Integr Comp Biol* 20:461–468.
- Bliss-Ketchum LL, de Rivera CE, Turner BC, Weisbaum DM. 2016. The effect of artificial light on wildlife use of a passage structure. *Biol Conserv* 199:25–28.
- Blouin-Demers G, Weatherhead PJ, Row JR. 2004. Phenotypic consequences of nest-site selection in black rat snakes (*Elaphe obsoleta*). *Can J Zool* 82:449–456.
- Bodensteiner BL, Agudelo-Cantero GA, Arietta AZA, Gunderson AR, Muñoz MM, Refsnider JM, Gangloff EJ. 2020. Thermal adaptation revisited: How conserved are thermal traits of reptiles and amphibians? *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol* [Internet] n/a. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.2414>
- Bodmer RE, Eisenberg JF, Redford KH. 1997. Hunting and the Likelihood of Extinction of Amazonian Mammals. *Conserv Biol* 11:460–466.
- Boissinot A, Braconnier H, Braconnier J, Braconnier H, Braconnier N, Morin-Pinaud S, Grillet P. 2014. Terres de bocage : concilier nature et agriculture. Ouest-France.
- Boissinot A, Grillet P, Morin-Pinaud S, Besnard A, Lourdais O. 2013. Influence de la structure du bocage sur les amphibiens et les reptiles : Une approche multi-échelles. *Faune Sauvage*:41–47.
- Booth DT. 2006. Influence of Incubation Temperature on Hatchling Phenotype in Reptiles. *Physiol Biochem Zool* 79:274–281.
- Bouazza A, Slimani T, Mouden HE, Blouin-Demers G, Lourdais O. 2016. Thermal constraints and the influence of reproduction on thermoregulation in a high-altitude gecko (*Quedenfeldtia trachyblepharus*). *J Zool* 300:36–44.
- Bouverot P. 1985. Circulatory Adaptations. In: Bouverot P, editor. *Adaptation to Altitude-Hypoxia in Vertebrates. Zoophysiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 61–93. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-82316-9_4
- Bouverot P. 2012. *Adaptation to Altitude-Hypoxia in Vertebrates*. Springer Science and Business Media.
- Boyer DR. 1963. Hypoxia: Effects on Heart Rate and Respiration in the Snapping Turtle. *Science* 140:813–814.
- Boyer DR. 1966. Comparative Effects of Hypoxia on Respiratory and Cardiac Function in Reptiles. *Physiol Zool* 39:307–316.
- Bradbury IR, Campana SE, Bentzen P, Snelgrove PVR. 2004. Synchronized hatch and its ecological significance in rainbow smelt *Osmerus mordax* in St. Mary's Bay, Newfoundland. *Limnol Oceanogr* 49:2310–2315.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM. 2010. Light, Time, and the Physiology of Biotic Response to Rapid Climate Change in Animals. *Annu Rev Physiol* 72:147–166.
- Braña F, Ji X. 2000. Influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance, and early growth of hatchling wall lizards (*Podarcis muralis*). *J Exp Zool* 286:422–433.

RÉFÉRENCES

- Brans KI, Meester LD. 2018. City life on fast lanes: Urbanization induces an evolutionary shift towards a faster lifestyle in the water flea *Daphnia*. *Funct Ecol* 32:2225–2240.
- Brattstrom BH. 1979. Amphibian Temperature Regulation Studies in the Field and Laboratory. *Integr Comp Biol* 19:345–356.
- Brei M, Pérez-Barahona A, Strobl E. 2016. Pollution environnementale et biodiversité la pollution lumineuse et les tortues marines du Caraïbe. Available from: tortuesmarinesguadeloupe.org
- Brichard GF. 2004. Effects of incubation temperature. In: Deeming DC, editor. *Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour*. Nottingham University Press. Nottingham. p 103–123. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053115521>
- Brischoux F, Bonnet X, Legagneux P. 2009. Are sea snakes pertinent bio-indicators for coral reefs? a comparison between species and sites. *Mar Biol* 156:1985–1992.
- Brown D. 2019. Tracker: Video Analysis and Modeling Tool [Software]. Version 5.1.3. Open Source Physics.
- Brown GP, Shine R. 2004. Maternal Nest-Site Choice and Offspring Fitness in a Tropical Snake (*tropidonophis Mairii*, Colubridae). *Ecology* 85:1627–1634.
- Bull JJ. 1980. Sex Determination in Reptiles. *Q Rev Biol* 55:3–21.
- Burger J, Zappalorti RT. 1986. Nest Site Selection by Pine Snakes, *Pituophis melanoleucus*, in the New Jersey Pine Barrens. *Copeia* 1986:116.
- Burggren WW, Warburton SJ. 1994. Patterns of form and function in developing hearts: contributions from non-mammalian vertebrates. *Cardioscience* 5:183–191.
- Buse A, Dury SJ, Woodburn RJW, Perrins CM, Good JEG. 1999. Effects of elevated temperature on multi-species interactions: the case of Pedunculate Oak, Winter Moth and Tits. *Funct Ecol* 13:74–82.
- Butler PJ, Green JA, Boyd IL, Speakman JR. 2004. Measuring metabolic rate in the field: the pros and cons of the doubly labelled water and heart rate methods. *Funct Ecol* 18:168–183.

C

- Canto T, Aranda MA, Fereres A. 2009. Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Glob Change Biol* 15:1884–1894.
- Cardillo M, Mace GM, Gittleman JL, Jones KE, Bielby J, Purvis A. 2008. The predictability of extinction: biological and external correlates of decline in mammals. *Proc R Soc B Biol Sci* 275:1441–1448.
- Casas F, Mougeot F, Viñuela J, Bretagnolle V. 2009. Effects of hunting on the behaviour and spatial distribution of farmland birds: importance of hunting-free refuges in agricultural areas. *Anim Conserv* 12:346–354.
- Cattiaux J, Chauvin F, Douville H, Ribes A. 2018. Événements météorologiques extrêmes et changement climatique. *Encycl Environ*:1–11.
- Charmantier A, McCleery RH, Cole LR, Perrins C, Kruuk LEB, Sheldon BC. 2008. Adaptive Phenotypic Plasticity in Response to Climate Change in a Wild Bird Population. *Science* 320:800–803.
- Chen I-C, Hill JK, Ohlemüller R, Roy DB, Thomas CD. 2011. Rapid Range Shifts of Species Associated with High Levels of Climate Warming. *Science* 333:1024–1026.

RÉFÉRENCES

- Chmielewski F-M, Rötzer T. 2001. Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agric For Meteorol* 108:101–112.
- Chown SL, Hoffmann AA, Kristensen TN, Angilletta MJ, Stenseth NChr, Pertoldi C. 2010. Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Clim Res* 43:3–15.
- Christian KA, Lawrence WT. 1991. Microclimatic Conditions in Nests of the Cuban Iguana (*Cyclura nubila*). *Biotropica* 23:287–293.
- Christian KA, Tracy CR, Tracy CR. 2006. Evaluating Thermoregulation in Reptiles: An Appropriate Null Model. *Am Nat* 168:421–430.
- Clark TD, Butler PJ, Frappell PB. 2006. Factors influencing the prediction of metabolic rate in a reptile. *Funct Ecol* 20:105–113.
- Clavero M, Brotons L, Pons P, Sol D. 2009. Prominent role of invasive species in avian biodiversity loss. *Biol Conserv* 142:2043–2049.
- Clobert J, Galliard J-FL, Cote J, Meylan S, Massot M. 2009. Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations. *Ecol Lett* 12:197–209.
- Clobert J, Sinervo B, Chaine A, Ernande B, Danchin EGJ, Sorci G. 2010. La plasticité phénotypique. In: F. Thomas TL and MR, editor. *Biologie évolutive*. De Boeck. p 453–490. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00516462>
- Clusella Trullas S, van Wyk JH, Spotila JR. 2007. Thermal melanism in ectotherms. *J Therm Biol* 32:235–245.
- Colbert PL, Spencer R-J, Janzen FJ. 2010. Mechanism and cost of synchronous hatching. *Funct Ecol* 24:112–121.
- Cooper CM. 1993. Biological Effects of Agriculturally Derived Surface Water Pollutants on Aquatic Systems—A Review. *J Environ Qual* 22:402–408.
- Cordero GA, Andersson BA, Souchet J, Micheli G, Noble DWA, Gangloff EJ, Uller T, Aubret F. 2017. Physiological plasticity in lizard embryos exposed to high-altitude hypoxia. *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol* 327:423–432.
- Cordero GA, Karnatz ML, Svendsen JC, Gangloff EJ. 2017b. Effects of low-oxygen conditions on embryo growth in the painted turtle, *Chrysemys picta*. *Integr Zool* 12:148–156.
- Cordero GA, Telemeco RS, Gangloff EJ. 2018. Reptile embryos are not capable of behavioral thermoregulation in the egg. *Evol Dev* 20:40–47.
- Costello MJ, Wilson S, Houlding B. 2012. Predicting Total Global Species Richness Using Rates of Species Description and Estimates of Taxonomic Effort. *Syst Biol* 61:871–871.
- Cotton PA. 2003. Avian migration phenology and global climate change. *Proc Natl Acad Sci* 100:12219–12222.
- Crick HQP. 2004. The impact of climate change on birds. *Ibis* 146:48–56.
- Crick HQP, Dudley C, Glue DE, Thomson DL. 1997. UK birds are laying eggs earlier. *Nature* 388:526–526.
- Crossley DA, Altimiras J. 2005. Cardiovascular development in embryos of the American alligator *Alligator mississippiensis*: effects of chronic and acute hypoxia. *J Exp Biol* 208:31–39.
- Crossley DA, Burggren WW. 2009. Development of cardiac form and function in ectothermic sauropsids. *J Morphol* 270:1400–1412.

RÉFÉRENCES

- Crossley DA, Ling R, Nelson D, Gillium T, Conner J, Hapgood J, Elsey RM, Eme J. 2017. Metabolic responses to chronic hypoxic incubation in embryonic American alligators (*Alligator mississippiensis*) Part A Molecular and integrative physiology. Available from: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5538931>
- Cunningham B, Hurwitz AP. 1936. Water Absorption by Reptile Eggs during Incubation. *Am Nat* 70:590–595.
- Cunningham GD, While GM, Wapstra E. 2017. Climate and sex ratio variation in a viviparous lizard. *Biol Lett* 13:20170218.

D

- Dahlhoff EP, Dahlhoff VC, Grainger CA, Zavala NA, Otepola-Bello D, Sargent BA, Roberts KT, Heidl SJ, Smiley JT, Rank NE. 2019. Getting chased up the mountain: High elevation may limit performance and fitness characters in a montane insect. *Funct Ecol* 33:809–818.
- Danks HV. 2004. Seasonal Adaptations in Arctic Insects. *Integr Comp Biol* 44:85–94.
- Daufresne M, Lengfellner K, Sommer U. 2009. Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proc Natl Acad Sci* 106:12788–12793.
- De Frenne P, Rodriguez-Sanchez F, Coomes DA, Baeten L, Verstraeten G, Vellend M, Bernhardt-Romermann M, Brown CD, Brunet J, Cornelis J, Decocq GM, Dierschke H, Eriksson O, Gilliam FS, Hedl R, Heinken T, Hermy M, Hommel P, Jenkins MA, Kelly DL, Kirby KJ, Mitchell FJG, Naaf T, Newman M, Peterken G, Petrik P, Schultz J, Sonnier G, Van Calster H, Waller DM, Walther G-R, White PS, Woods KD, Wulf M, Graae BJ, Verheyen K. 2013. Microclimate moderates plant responses to macroclimate warming. *Proc Natl Acad Sci* 110:18561–18565.
- De Massary J-C, Bour R, Cheylan M, Crochet P-A, Dewynter M, Geniez P, Ineich I, Ohler A, Vidal N, Lescure J. 2019. Nouvelle liste taxonomique de l'herpétofaune de la France métropolitaine. *Bull Société Herpétologique Fr*:37–56.
- Deeming DC. 2004. Post-hatching phenotypic effects of incubation in reptiles. In: Deeming DC, editor. *Reptilian incubation: behaviour and environment*. Nottingham: Nottingham University Press. p 229–252. Available from: <http://eprints.lincoln.ac.uk/12997/>
- Deeming DC, Ferguson MWJ. 1991. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. In: Deeming DC, Ferguson MWJ, editors. *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press. p 147–171.
- Deeming DC, Thompson MB. 1991. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. In: Deeming DC, Ferguson MWJ, editors. *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press. p 277–284.
- Delm MM. 1990. Vigilance for predators: detection and dilution effects. *Behav Ecol Sociobiol* 26:337–342.
- Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, Sheldon KS, Ghalambor CK, Haak DC, Martin PR. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc Natl Acad Sci* 105:6668–6672.
- Devictor V, van Swaay C, Brereton T, Brotons L, Chamberlain D, Heliölä J, Herrando S, Julliard R, Kuussaari M, Lindström Å, Reif J, Roy DB, Schweiger O, Settele J, Stefanescu C, Van Strien A,

RÉFÉRENCES

- Van Turnhout C, Vermouzek Z, WallisDeVries M, Wynhoff I, Jiguet F. 2012. Differences in the climatic debts of birds and butterflies at a continental scale. *Nat Clim Change* 2:121–124.
- Didham RK, Tylianakis JM, Hutchison MA, Ewers RM, Gemmell NJ. 2005. Are invasive species the drivers of ecological change? *Trends Ecol Evol* 20:470–474.
- Diffenbaugh NS, Singh D, Mankin JS, Horton DE, Swain DL, Touma D, Charland A, Liu Y, Haugen M, Tsiang M, Rajaratnam B. 2017. Quantifying the influence of global warming on unprecedented extreme climate events. *Proc Natl Acad Sci* 114:4881–4886.
- Dillon ME, Wang G, Huey RB. 2010. Global metabolic impacts of recent climate warming. *Nature* 467:704–706.
- Dirnböck T, Essl F, Rabitsch W. 2011. Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. *Glob Change Biol* 17:990–996.
- Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B. 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science* 345:401–406.
- Dmi'el R. 1970. Growth and metabolism in snake embryos. *Development* 23:761–772.
- Doherty TS, Glen AS, Nimmo DG, Ritchie EG, Dickman CR. 2016. Invasive predators and global biodiversity loss. *Proc Natl Acad Sci* 113:11261–11265.
- Donelson JM, Salinas S, Munday PL, Shama LNS. 2018. Transgenerational plasticity and climate change experiments: Where do we go from here? *Glob Change Biol* 24:13–34.
- Doody JS, Guarino E, Georges A, Corey B, Murray G, Ewert M. 2006. Nest site choice compensates for climate effects on sex ratios in a lizard with environmental sex determination. *Ecol Evol* 20:307–330.
- Dorcas ME, Hopkins WA, Roe JH. 2004. Effects of Body Mass and Temperature on Standard Metabolic Rate in the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Copeia* 2004:145–151.
- Douglas RM, Farahani R, Morcillo P, Kanaan A, Xu T, Haddad GG. 2005. Hypoxia induces major effects on cell cycle kinetics and protein expression in *Drosophila melanogaster* embryos. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 288:R511–R521.
- Du W, Ji X, Shine R. 2013. Phenotypic Plasticity in Embryonic Development of Reptiles : Recent Research and Research Opportunities in China.
- Du WG, Ji X. 2008. The Effects of Incubation Temperature On Hatching Success, Embryonic Use of Energy and Hatchling Morphology in the Stripe-tailed Ratsnake *Elaphe taeniura*. *Asiat Herpetol Res* 11:7.
- Du W-G, Radder RS, Sun B, Shine R. 2009. Determinants of incubation period: do reptilian embryos hatch after a fixed total number of heart beats? *J Exp Biol* 212:1302–1306.
- Du W-G, Thompson MB, Shine R. 2010a. Facultative cardiac responses to regional hypoxia in lizard embryos. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156:491–494.
- Du W-G, Ye H, Zhao B, Pizzatto L, Ji X, Shine R. 2011. Patterns of Interspecific Variation in the Heart Rates of Embryonic Reptiles. *PLOS ONE* 6:e29027.
- Du W-G, Ye H, Zhao B, Warner DA, Shine R. 2010b. Thermal Acclimation of Heart Rates in Reptilian Embryos. *PLOS ONE* 5:e15308.
- Du W-G, Zhao B, Shine R. 2010c. Embryos in the Fast Lane: High-Temperature Heart Rates of Turtles Decline After Hatching. *PLOS ONE* 5:e9557.

RÉFÉRENCES

- Dunlap KD. 2006. Ontogeny and Scaling of Hematocrit and Blood Viscosity in Western Fence Lizards, *Sceloporus Occidentalis*. *Copeia* 2006:535–538.
- Dupoué A, Brischoux F, Lourdais O. 2017. Climate and foraging mode explain interspecific variation in snake metabolic rates. *Proc R Soc B Biol Sci* 284:20172108.
- Dupré RK, Romero AM, Wood SC. 1988. Thermoregulation and Metabolism in Hypoxic Animals. In: Gonzalez NC, Fedde MR, editors. *Oxygen Transfer from Atmosphere to Tissues*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US. p 347–351.
- Dupré RK, Wood SC. 1988. Behavioral temperature regulation by aquatic ectotherms during hypoxia. *Can J Zool* 66:2649–2652.
- Dutton PH, Squires D. 2008. Reconciling Biodiversity with Fishing: A Holistic Strategy for Pacific Sea Turtle Recovery. *Ocean Dev Int Law* 39:200–222.
- Dutton RH, Fitzpatrick LC, Hughes JL. 1975. Energetics of the Rusty Lizard *Sceloporus Olivaceus*. *Ecology* 56:1378–1387.

E

- Edwards M, Richardson AJ. 2004. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. *Nature* 430:881–884.
- Eme J, Rhen T, Tate KB, Gruchalla K, Kohl ZF, Slay CE, Crossley DA. 2013. Plasticity of cardiovascular function in snapping turtle embryos (*Chelydra serpentina*): chronic hypoxia alters autonomic regulation and gene expression. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 304:R966–R979.
- Erzurum SC, Ghosh S, Janocha AJ, Xu W, Bauer S, Bryan NS, Tejero J, Hemann C, Hille R, Stuehr DJ, Feelisch M, Beall CM. 2007. Higher blood flow and circulating NO products offset high-altitude hypoxia among Tibetans. *Proc Natl Acad Sci* 104:17593–17598.
- Escalona T, Valenzuela N, Adams DC. 2009. Nesting Ecology in the Freshwater Turtle *Podocnemis unifilis*: Spatiotemporal Patterns and Inferred Explanations. *Funct Ecol* 23:826–835.

F

- Fadrique B, Báez S, Duque Á, Malizia A, Blundo C, Carilla J, Osinaga-Acosta O, Malizia L, Silman M, Farfán-Ríos W, Malhi Y, Young KR, C FC, Homeier J, Peralvo M, Pinto E, Jadan O, Aguirre N, Aguirre Z, Feeley KJ. 2018. Widespread but heterogeneous responses of Andean forests to climate change. *Nature* 564:207–212.
- Faraci FM. 1991. Adaptations to Hypoxia in Birds: How to Fly High. *Annu Rev Physiol* 53:59–70.
- Ferguson MWJ. 1985. The reproductive biology and embryology of crocodilians. In: Gans C, Billett F, Maderson PFA, editors. *Biology of the Reptilia*. Vol. 14 (Development B). New York: John Wiley and Sons. p 329–491.
- Ferguson MWJ, Joanen T. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in Alligator mississippiensis. *Nature* 296:850–853.
- Flewelling S, Parker SL. 2015. Effects of temperature and oxygen on growth and differentiation of embryos of the ground skink, *Scincella lateralis*. *J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol* 323:445–455.
- Forsman A. 2015. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity* 115:276–284.

RÉFÉRENCES

Frazier MR, Huey RB, Berrigan D. 2006. Thermodynamics Constrains the Evolution of Insect Population Growth Rates: "Warmer Is Better." *Am Nat* 168:512–520.

Freeman BG, Scholer MN, Ruiz-Gutierrez V, Fitzpatrick JW. 2018. Climate change causes upslope shifts and mountaintop extirpations in a tropical bird community. *Proc Natl Acad Sci* 115:11982–11987.

G

Gabriel W. 2005. How stress selects for reversible phenotypic plasticity. *J Evol Biol* 18:873–883.

Gahm, K, AZA Arietta, D Skelly. 2020. Temperature-mediated tradeoff between development and performance in larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Journal of Experimental Zoology-A*, In press.

Galli GLJ, Crossley J, Eley RM, Dzialowski EM, Shiels HA, Crossley DA. 2016. Developmental plasticity of mitochondrial function in American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 311:R1164–R1172.

Gangloff EJ, Holden KG, Telemeco RS, Baumgard LH, Bronikowski AM. 2016. Hormonal and metabolic responses to upper temperature extremes in divergent life-history ecotypes of a garter snake. *J Exp Biol* 219:2944–2954.

Gangloff EJ, Sorlin M, Cordero GA, Souchet J, Aubret F. 2019. Lizards at the Peak: Physiological Plasticity Does Not Maintain Performance in Lizards Transplanted to High Altitude. *Physiol Biochem Zool* 92:189–200.

Gangloff EJ, Sparkman AM, Bronikowski AM. 2018. Among-individual heterogeneity in maternal behaviour and physiology affects reproductive allocation and offspring life-history traits in the garter snake *Thamnophis elegans*. *Oikos* 127:705–718.

Gangloff EJ, Telemeco RS. 2018. High Temperature, Oxygen, and Performance: Insights from Reptiles and Amphibians. *Integr Comp Biol* 58:9–24.

Gardner JL, Peters A, Kearney MR, Joseph L, Heinsohn R. 2011. Declining body size: a third universal response to warming? *Trends Ecol Evol* 26:285–291.

Gardner WN. 1996. The pathophysiology of hyperventilation disorders. *Chest* 109:516–535.

Gatten RE. 1987. Cardiovascular and Other Physiological Correlates of Hibernation in Aquatic and Terrestrial Turtles. *Integr Comp Biol* 27:59–68.

Geniez P, Cheylan M. 2012. *Les Amphibiens et Reptiles du Languedoc-Roussillon et régions limitrophes*. Muséum national d'Histoire naturelle. Paris.

Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct Ecol* 21:394–407.

Gibert J-M. 2020. La plasticité phénotypique : une brève introduction. *Biol Aujourd'hui* 214:25–31.

Gienapp P, Teplitsky C, Alho JS, Mills JA, Merilä J. 2008. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Mol Ecol* 17:167–178.

Gillooly JF, Charnov EL, West GB, Savage VM, Brown JH. 2002. Effects of size and temperature on developmental time. *Nature* 417:70–73.

Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS, Spencer HG. 2008. Predictive adaptive responses in perspective. *Trends Endocrinol Metab* 19:109–110.

RÉFÉRENCES

- Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG. 2005. Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol* 20:527–533.
- Golan H, Huleihel M. 2006. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci* 9:338–349.
- Gómez A, Lunt DH. 2007. Refugia within Refugia: Patterns of Phylogeographic Concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss S, Ferrand N, editors. *Phylogeography of Southern European Refugia: Evolutionary perspectives on the origins and conservation of European biodiversity*. Dordrecht: Springer Netherlands. p 155–188. Available from: https://doi.org/10.1007/1-4020-4904-8_5
- González-Morales JC, Quintana E, Díaz-Albiter H, Guevara-Fiore P, Fajardo V. 2015. Is erythrocyte size a strategy to avoid hypoxia in Wiegmann's Torquate Lizards (*Sceloporus torquatus*)? Field evidence. *Can J Zool* 93:377–382.
- Goodman RM. 2008. Latent effects of egg incubation temperature on growth in the lizard *Anolis carolinensis*. *J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol* 309A:525–533.
- Gosá A, Bergerandi A. 1994. Atlas de distribución de los Anfibios y Reptiles de Navarra. *Munibe Cienc Nat Nat Zientziak*:109–189.
- Graham JB. 1974. Aquatic respiration in the sea snake *Pelamis platurus*. *Respir Physiol* 21:1–7.
- Gratz RK. 1979. Ventilatory response of the diamondback water snake, *Natrix rhombifera* to hypoxia, hypercapnia and increased oxygen demand. *J Comp Physiol* 129:105–110.
- Greenwald OE. 1971. The Effect of Body Temperature on Oxygen Consumption and Heart Rate in the Sonora Gopher Snake, *Pituophis catenifer affinis* Hallowell. *Copeia* 1971:98–106.
- Grevstad FS. 1999. Factors Influencing the Chance of Population Establishment: Implications for Release Strategies in Biocontrol. *Ecol Appl* 9:1439–1447.
- Grice AC. 2006. The impacts of invasive plant species on the biodiversity of Australian rangelands. *Rangel J* 28:27–35.
- Griffith B, Scott JM, Carpenter JW, Reed C. 1989. Translocation as a Species Conservation Tool: Status and Strategy. *Science* 245:477–480.
- Guicking D, Joger U, Wink M. 2008. Molecular phylogeography of the viperine snake *Natrix maura* (Serpentes: Colubridae): Evidence for strong intraspecific differentiation. *Org Divers Evol* 8:130–145.

H

- Habib L, Bayne EM, Boutin S. 2007. Chronic industrial noise affects pairing success and age structure of ovenbirds *Seiurus aurocapilla*. *J Appl Ecol* 44:176–184.
- Haddad NM, Brudvig LA, Clobert J, Davies KF, Gonzalez A, Holt RD, Lovejoy TE, Sexton JO, Austin MP, Collins CD, Cook WM, Damschen EI, Ewers RM, Foster BL, Jenkins CN, King AJ, Laurance WF, Levey DJ, Margules CR, Melbourne BA, Nicholls AO, Orrock JL, Song D-X, Townshend JR. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci Adv* 1:e1500052.
- Hailey A, Davies MC. 1986a. Diet and foraging behaviour of *Natrix maura*. *Herpetol J* 1:53–61.
- Hailey A, Davies PMC. 1986b. Effects of size, sex, temperature and condition on activity metabolism and defence behaviour of the viperine snake, *Natrix maura*. *J Zool* 208:541–558.

RÉFÉRENCES

- Hailey A, Davies PMC. 1987. Maturity, mating and age-specific reproductive effort of the snake *Natrix maura*. *J Zool* 211:573–587.
- Hall JM, Warner DA. 2020. Thermal sensitivity of lizard embryos indicates a mismatch between oxygen supply and demand at near-lethal temperatures. *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol* [Internet] n/a. Available from: <https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.2359>
- Hall RJ. 1980. Effects of Environmental Contaminants on Reptiles, a Review. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, Kappel CV, Micheli F, D'Agrosa C, Bruno JF, Casey KS, Ebert C, Fox HE, Fujita R, Heinemann D, Lenihan HS, Madin EMP, Perry MT, Selig ER, Spalding M, Steneck R, Watson R. 2008. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science* 319:948–952.
- Hammond KA, Cardullo RA, Ghalambor CK. 2006. The role of developmental plasticity in comparative physiology: mechanism and process. In: *Comparative Developmental Physiology: Contributions, Tools, and Trends. The role of developmental plasticity in comparative physiology: mechanism and process.* Oxford University Press.
- Harrison JF, Shingleton AW, Callier V. 2015. Stunted by Developing in Hypoxia: Linking Comparative and Model Organism Studies. *Physiol Biochem Zool* 88:455–470.
- Hedrick MS, Duffield DA, Cornell LH. 1986. Blood viscosity and optimal hematocrit in a deep-diving mammal, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Can J Zool* 64:2081–2085.
- Heinrich B. 1974. Thermoregulation in Endothermic Insects. *Science* 185:747–756.
- Herman JK, Smatresk NJ. 1999. Cardiorespiratory response to progressive hypoxia and hypercapnia in the turtle *Trachemys scripta*. *J Exp Biol* 202:3205–3213.
- Hertz PE, Huey RB, Stevenson RD. 1993. Evaluating Temperature Regulation by Field-Active Ectotherms: The Fallacy of the Inappropriate Question. *Am Nat* 142:796–818.
- Hessen DO, Daufresne M, Leinaas HP. 2013. Temperature-size relations from the cellular-genomic perspective. *Biol Rev* 88:476–489.
- Hewitt GM. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* 68:87–112.
- Hickling R, Roy DB, Hill JK, Fox R, Thomas CD. 2006. The distributions of a wide range of taxonomic groups are expanding polewards. *Glob Change Biol* 12:450–455.
- Hoback WW, Stanley DW. 2001. Insects in hypoxia. *J Insect Physiol* 47:533–542.
- Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci* 93:9493–9498.
- Hoffmann AA, Sgrò CM. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470:479–485.
- Hölker F, Wolter C, Perkin EK, Tockner K. 2010. Light pollution as a biodiversity threat. *Trends Ecol Evol* 25:681–682.
- Hopkins WA, Roe JH, Philippi T, Congdon JD. 2004. Standard and digestive metabolism in the banded water snake, *Nerodia fasciata fasciata*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 137:141–149.
- Horne CR, Hirst AG, Atkinson D. 2015. Temperature-size responses match latitudinal-size clines in arthropods, revealing critical differences between aquatic and terrestrial species. *Ecol Lett* 18:327–335.

RÉFÉRENCES

- Huang S-P, Chiou C-R, Lin T-E, Tu M-C, Lin C-C, Porter WP. 2013. Future advantages in energetics, activity time, and habitats predicted in a high-altitude pit viper with climate warming. *Funct Ecol* 27:446–458.
- Huey RB. 1977. Egg Retention in Some High-Altitude Anolis Lizards. *Copeia* 1977:373–375.
- Huey RB. 1982. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In: *Biology of the Reptilia*. Academic Press. p 25–74.
- Huey RB, Kearney MR, Krockenberger A, Holtum JAM, Jess M, Williams SE. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 367:1665–1679.
- Huey RB, Kingsolver JG. 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends Ecol Evol* 4:131–135.
- Huey RB, Stevenson RD. 1979. Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches. *Integr Comp Biol* 19:357–366.
- Hulbert AC, Mitchell TS, Hall JM, Guiffre CM, Douglas DC, Warner DA. 2017. The effects of incubation temperature and experimental design on heart rates of lizard embryos. *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol* 327:466–476.

I

- IPPC. 2018. Summary for Policymakers — Global Warming of 1.5 °C. In: Masson-Delmotte, V, Zhai, P, Pörtner, HO, Roberts, D, Skea, J, Shukla, PR, Pirani, A, Moufouma-Okia W, Péan, C, Pidcock, R, Connors, S, Matthews, JBR, Chen, Y, Zhou, X, Gomis, MI, Lonnoy, E, Maycock, T, Tignor, M, Waterfield T, editors. *An IPCC Special Report 578 on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related 579 global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global 580 response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to 581 eradicate poverty*. Geneva, Switzerland: World Meteorological Organization. p 132.
- Isaac LA, Gregory PT. 2007. Aquatic versus terrestrial locomotion: comparative performance of two ecologically contrasting species of European natricine snakes. *J Zool* 273:56–62.
- Iungman JL, Piña CI. 2013. Hypoxia and temperature: Does hypoxia affect caiman embryo differentiation rate or rate of growth only? *J Therm Biol* 38:407–418.

J

- Jablonski D. 1994. Extinctions in the fossil record. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 344:11–17.
- Jackson DC. 1973. Ventilatory response to hypoxia in turtles at various temperatures. *Respir Physiol* 18:178–187.
- Jackson DC. 2007. Temperature and hypoxia in ectothermic tetrapods. *J Therm Biol* 32:125–133.
- Jacob JS, McDonald HS. 1976. Diving bradycardia in four species of North American aquatic snakes. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 53:69–72.
- Jacobsen D. 2020. The dilemma of altitudinal shifts: caught between high temperature and low oxygen. *Front Ecol Environ* 18:211–218.
- Janzen FJ, Paukstis GL. 1991. Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution, and Experimental Design. *Q Rev Biol* 66:149–179.

RÉFÉRENCES

- Jayne BC, Bennett AF. 1990. Selection on Locomotor Performance Capacity in a Natural Population of Garter Snakes. *Evolution* 44:1204–1229.
- Jenouvrier S, Desprez M, Fay R, Barbraud C, Weimerskirch H, Delord K, Caswell H. 2018. Climate change and functional traits affect population dynamics of a long-lived seabird. *J Anim Ecol* 87:906–920.
- Jeppesen E, Meerhoff M, Holmgren K, González-Bergonzoni I, Teixeira-de Mello F, Declerck SAJ, De Meester L, Søndergaard M, Lauridsen TL, Bjerring R, Conde-Porcuna JM, Mazzeo N, Iglesias C, Reizenstein M, Malmquist HJ, Liu Z, Balayla D, Lazzaro X. 2010. Impacts of climate warming on lake fish community structure and potential effects on ecosystem function. *Hydrobiologia* 646:73–90.
- Ji X, Sun P-Y, Fu S-Y, zhang H-S. 1999. Utilization of energy and material in eggs and post-hatching yolk in an oviparous snake, *Elaphe taeniura*. *Asiat Herpetol Res* 8:53–59.
- Jochmans-Lemoine A, Joseph V. 2018. Case Study: Developmental Physiology at High Altitude. In: Burggren W, Dubansky B, editors. *Development and Environment*. Cham: Springer International Publishing. p 435–457. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75935-7_18
- Johansen K. 1959. Heart activity during experimental diving of snakes. *Am J Physiol-Leg Content* 197:604–606.
- Jong (de) PW, Brakefield PM. 1998. Climate and change in clines for melanism in the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265:39–43.
- Jump AS, Marchant R, Peñuelas J. 2009. Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends Plant Sci* 14:51–58.

K

- Kam Y-C. 1993. Physiological effects of hypoxia on metabolism and growth of turtle embryos. *Respir Physiol* 92:127–138.
- Kareiva P, Watts S, McDonald R, Boucher T. 2007. Domesticated Nature: Shaping Landscapes and Ecosystems for Human Welfare. *Science* 316:1866–1869.
- Keane A, Brooke M de L, MCGowan PJK. 2005. Correlates of extinction risk and hunting pressure in gamebirds (Galliformes). *Biol Conserv* 126:216–233.
- Kearney M, Shine R, Porter WP. 2009. The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *Proc Natl Acad Sci* 106:3835–3840.
- Kelly DJ, Poole RK, Hughes NJ. 2001. Microaerobic Physiology: Aerobic Respiration, Anaerobic Respiration, and Carbon Dioxide Metabolism. *Helicobacter Pylori*:113–124.
- Kenward MG, Roger JH. 1997. Small Sample Inference for Fixed Effects from Restricted Maximum Likelihood. *Biometrics* 53:983–997.
- Khodae M, Grothe HL, Seyfert JH, VanBaak K. 2016. Athletes at High Altitude: Sports Health [Internet]. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1941738116630948>
- Kingsolver JG, Hoekstra HE, Hoekstra JM, Berrigan D, Vignieri SN, Hill CE, Hoang A, Gibert P, Beerli P. 2001. The Strength of Phenotypic Selection in Natural Populations. *Am Nat* 157:245–261.
- Kissner KJ, Weatherhead PJ. 2005. Phenotypic effects on survival of neonatal northern watersnakes *Nerodia sipedon*. *J Anim Ecol* 74:259–265.

RÉFÉRENCES

- Kitagawa T, Nakata H, Kimura S, Tsuji S. 2001. Thermoconservation mechanisms inferred from peritoneal cavity temperature in free-swimming Pacific bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis*. *Mar Ecol Prog Ser* 220:253–263.
- Kouyoumdjian L, Gangloff EJ, Souchet J, Cordero GA, Dupoué A, Aubret F. 2019. Transplanting gravid lizards to high elevation alters maternal and embryonic oxygen physiology, but not reproductive success or hatchling phenotype. *J Exp Biol* 222:jeb206839.
- Krivoruchko A, Storey KB. 2015. Turtle anoxia tolerance: Biochemistry and gene regulation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 1850:1188–1196.

L

- Lack DL. 1968. Ecological adaptations for breeding in birds. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300591006>
- Lagerspetz KYH, Vainio LA. 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biol Rev* 81:237–258.
- Lague SL, Chua B, Farrell AP, Wang Y, Milsom WK. 2016. Altitude matters: differences in cardiovascular and respiratory responses to hypoxia in bar-headed geese reared at high and low altitudes. *J Exp Biol* 219:1974–1984.
- Lailvaux SP. 2007. Interactive effects of sex and temperature on locomotion in reptiles. *Integr Comp Biol* 47:189–199.
- Laughlin KF. 1978. The Effects of Restricted Gas Exchange on Embryonic Heart Rate. In: Piiper J, editor. *Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic*. Proceedings in Life Sciences. Springer Berlin Heidelberg. p 298–303.
- Lavergne S, Molofsky J. 2007. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3883.
- Le Chevalier H, Marí-Mena N, Carro B, Prunier JG, Bossu C, Darnet E, Souchet J, Guillaume O, Calvez O, Bertrand R, Barthe L, Pottier G, Martínez-Sylvestre A, Verdaguer-Foz I, Mossoll-Torres M, Trochet A, Aubret F. 2019. Isolation and characterization of fourteen polymorphic microsatellite markers in the viperine snake *Natrix maura*. *Ecol Evol* 9:11227–11231.
- Le Galliard JF, Marquis O, Massot M. 2010. Cohort variation, climate effects and population dynamics in a short-lived lizard. *J Anim Ecol* 79:1296–1307.
- Le Roy A, Loughland I, Seebacher F. 2017. Differential effects of developmental thermal plasticity across three generations of guppies (*Poecilia reticulata*): canalization and anticipatory matching. *Sci Rep* 7:1–12.
- Lebourgeois F, Mérian P, Courdier F, Ladier J, Dreyfus P. 2012. Instability of climate signal in tree-ring width in Mediterranean mountains: a multi-species analysis. *Trees* 26:715–729.
- Lecq S. 2013. Importance de la structure des haies, des lisières, et de la disponibilité en abris sur la biodiversité, implications en termes de gestion. Available from: <http://www.theses.fr/2013POIT2331>
- Lee W-S, Mangel M, Peres-Neto* P. 2016. Environmental integration: patterns of correlation between environmental factors, early life decisions, and their long-term consequences. *Evol Ecol Res* 17:1–19.
- Lefeuvre J-C. 1992. Biodiversité et territoires agricoles. *Économie Rurale* 208:79–84.
- Lengagne T. 2008. Traffic noise affects communication behaviour in a breeding anuran, *Hyla arborea*. *Biol Conserv* 141:2023–2031.

RÉFÉRENCES

- Lenoir J, Bertrand R, Comte L, Bourgeaud L, Hattab T, Murienne J, Grenouillet G. 2020. Species better track climate warming in the oceans than on land. *Nat Ecol Evol*:1–16.
- Lenoir J, Gégout JC, Marquet PA, Ruffray P de, Brisse H. 2008. A Significant Upward Shift in Plant Species Optimum Elevation During the 20th Century. *Science* 320:1768–1771.
- Lenth RV. 2016. Least-Squares Means: The R Package lsmmeans. *J Stat Softw* 69:1–33.
- León-Velarde F, Monge C. 2004. Avian embryos in hypoxic environments. *Respir Physiol Neurobiol* 141:331–343.
- Levy O, Buckley LB, Keitt TH, Smith CD, Boateng KO, Kumar DS, Angilletta MJ. 2015. Resolving the life cycle alters expected impacts of climate change. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20150837.
- Li J-T, Gao Y-D, Xie L, Deng C, Shi P, Guan M-L, Huang S, Ren J-L, Wu D-D, Ding L, Huang Z-Y, Nie H, Humphreys DP, Hillis DM, Wang W-Z, Zhang Y-P. 2018. Comparative genomic investigation of high-elevation adaptation in ectothermic snakes. *Proc Natl Acad Sci* 115:8406–8411.
- Li T, Zhao B, Zhou Y-K, Hu R, Du W-G. 2014. Thermoregulatory Behavior Is Widespread in the Embryos of Reptiles and Birds. *Am Nat* 183:445–451.
- Li W, Liang S, Wang H, Xin Y, Lu S, Tang X, Chen Q. 2016. The Effects of Chronic Hypoxia on Thermoregulation and Metabolism in *Phrynocephalus vlangalii*. *Asian Herpetol Res* 7:103–111.
- Li X, Wu P, Ma L, Huebner C, Sun B, Li S. 2020. Embryonic and post-embryonic responses to high-elevation hypoxia in a low-elevation lizard. *Integr Zool* [Internet]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1749-4877.12441>
- Liang L, Sun B-J, Ma L, Du W-G. 2015. Oxygen-dependent heat tolerance and developmental plasticity in turtle embryos. *J Comp Physiol B* 185:257–263.
- Licht P. 1966. Thermal adaptation in the enzymes of lizards in relation to preferred body temperatures. In: Prosser CL, editor. *Molecular Mechanisms of Temperature Adaptation*. American Association for the Advancement of Science. Washington, DC. p 131–146.
- Lierz M, Gooss O, Hafez HM. 2006. Noninvasive Heart Rate Measurement Using a Digital Egg Monitor in Chicken and Turkey Embryos. *J Avian Med Surg* 20:141–146.
- Lighton JRB. 2018. *Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists*. Oxford University Press.
- Llorente GA, Montori A, Santos X, Carretero MA. 1995. *Atlas de distribució dels amfibis i rèptils de Catalunya i Andorra*. El Brau Edicions. Figueres.
- Loarie SR, Duffy PB, Hamilton H, Asner GP, Field CB, Ackerly DD. 2009. The velocity of climate change. *Nature* 462:1052–1055.
- Loisel A, Isla A, Daufresne M. 2019. Variation of thermal plasticity in growth and reproduction patterns: Importance of ancestral and developmental temperatures. *J Therm Biol* 84:460–468.
- 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.
- Lu S, Xin Y, Tang X, Yue F, Wang H, Bai Y, Niu Y, Chen Q. 2015. Differences in Hematological Traits between High- and Low-Altitude Lizards (Genus *Phrynocephalus*). *PLOS ONE* 10:e0125751.
- Lue KY, Tu MC, Shang G. 1999. *A field guide to the amphibians and reptiles of Taiwan*. Taipei Soc Wildl Nat.
- Luiselli L, Filippi E, Lena ED. 2007. Ecological Relationships between Sympatric *Vipera Aspis* and *Vipera Ursinii* in High-Altitude Habitats of Central Italy. *J Herpetol* 41:378–384.

RÉFÉRENCES

Lutz PL, Dunbar-Cooper A. 1984. The Nest Environment of the American Crocodile (*Crocodylus acutus*). *Copeia* 1984:153–161.

M

MacPhee RDE, Sues H-D. 1999. *Extinctions in Near Time*. Springer Science and Business Media.

Manolis SC, Webb GJ, Britton AR. 2002. Crocodylians and other reptiles: bioindicators of pollution. Available from: http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:34001788

Marquet PA, Ortíz JC, Bozinović F, Jaksíć FM. 1989. Ecological aspects of thermoregulation at high altitudes: the case of andean *Liolaemus* lizards in northern Chile. *Oecologia* 81:16–20.

Marsili L, Casini S, Mori G, Ancora S, Bianchi N, D'Agostino A, Ferraro M, Fossi MC. 2009. The Italian wall lizard (*Podarcis sicula*) as a bioindicator of oil field activity. *Sci Total Environ* 407:3597–3604.

Martinez-Rica JP, Reiné-Viñales A. 1988. Altitudinal distribution of amphibians and reptiles in the Spanish Pyrenees. *Pirineos*:57–82.

Marzluff JM. 2001. Worldwide urbanization and its effects on birds. In: Marzluff JM, Bowman R, Donnelly R, editors. *Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World*. Boston, MA: Springer US. p 19–47. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9_2

May RM. 2010. Ecological science and tomorrow's world. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:41–47.

Mayer M, Shine R, Brown GP. 2016. Bigger babies are bolder: effects of body size on personality of hatchling snakes. *Behaviour* 153:313–323.

McCarty JP. 2001. Ecological Consequences of Recent Climate Change. *Conserv Biol* 15:320–331.

McClelland GTW, Altwegg R, Aarde RJ van, Ferreira S, Burger AE, Chown SL. 2018. Climate change leads to increasing population density and impacts of a key island invader. *Ecol Appl* 28:212–224.

McGlashan JK, Loudon FK, Thompson MB, Spencer R-J. 2015. Hatching behavior of eastern long-necked turtles (*Chelodina longicollis*): The influence of asynchronous environments on embryonic heart rate and phenotype. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 188:58–64.

McGlashan JK, Spencer R-J, Old JM. 2012. Embryonic communication in the nest: metabolic responses of reptilian embryos to developmental rates of siblings. *Proc R Soc B Biol Sci* 279:1709–1715.

McKechnie AE, Wolf BO. 2010. Climate change increases the likelihood of catastrophic avian mortality events during extreme heat waves. *Biol Lett* 6:253–256.

McManus M, Horvath SM, Bolduan N, Miller JC. 1974. Metabolic and cardiorespiratory responses to long-term work under hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 36:177–182.

McNab BK. 2002. *The Physiological Ecology of Vertebrates: A View from Energetics*. Cornell University Press.

Megía-Palma R, Jiménez-Robles O, Hernández-Agüero JA, De la Riva I. 2020. Plasticity of haemoglobin concentration and thermoregulation in a mountain lizard. *J Therm Biol* 92:102656.

Meillère A, Brischoux F, Angelier F. 2015. Impact of chronic noise exposure on antipredator behavior: an experiment in breeding house sparrows. *Behav Ecol* 26:569–577.

RÉFÉRENCES

- Merilä J. 2012. Evolution in response to climate change: In pursuit of the missing evidence. *BioEssays* 34:811–818.
- Millet GP, Debevec T. 2020. CrossTalk proposal: Barometric pressure, independent of , is the forgotten parameter in altitude physiology and mountain medicine. *J Physiol* 598:893–896.
- Mitchell D, Snelling EP, Hetem RS, Maloney SK, Strauss WM, Fuller A. 2018a. Revisiting concepts of thermal physiology: Predicting responses of mammals to climate change. *J Anim Ecol* 87:956–973.
- Mitchell TS, Janzen FJ, Warner DA. 2018b. Quantifying the effects of embryonic phenotypic plasticity on adult phenotypes in reptiles: A review of current knowledge and major gaps. *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol* 329:203–214.
- Mokhov II, Eliseev AV. 2012. Modeling of global climate variations in the 20th–23rd centuries with new RCP scenarios of anthropogenic forcing. *Dokl Earth Sci* 443:532–536.
- Molina-Montenegro MA, Peñuelas J, Munné-Bosch S, Sardans J. 2012. Higher plasticity in ecophysiological traits enhances the performance and invasion success of *Taraxacum officinale* (dandelion) in alpine environments. *Biol Invasions* 14:21–33.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front Ecol Environ* 6:485–492.
- Monge C, Leon-Velarde F. 1991. Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev* 71:1135–1172.
- Mueller CA, Eme J, Burggren WW, Roghair RD, Rundle SD. 2015. Challenges and opportunities in developmental integrative physiology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 184:113–124.
- Mullin SJ, Seigel RA. 2011. *Snakes: Ecology and Conservation*. Cornell University Press.
- Munday PL, Donelson JM, Domingos JA. 2017. Potential for adaptation to climate change in a coral reef fish. *Glob Change Biol* 23:307–317.
- Muñoz A-R, Márquez AL, Real R. 2015. An approach to consider behavioral plasticity as a source of uncertainty when forecasting species' response to climate change. *Ecol Evol* 5:2359–2373.
- Murphy GEP, Romanuk TN. 2014. A meta-analysis of declines in local species richness from human disturbances. *Ecol Evol* 4:91–103.

N

- Nagy KA. 2005. Field metabolic rate and body size. *J Exp Biol* 208:1621–1625.
- Nahmani J, Capowiez Y, Lavelle P. 2005. Effects of metal pollution on soil macroinvertebrate burrow systems. *Biol Fertil Soils* 42:31–39.
- Nelson NJ, Thompson MB, Pledger S, Keall SN, Daugherty CH. 2004. Egg mass determines hatchling size, and incubation temperature influences post-hatching growth, of tuatara *Sphenodon punctatus*. *J Zool* 263:77–87.
- Newlin ME, Ballinger RE. 1976. Blood Hemoglobin Concentration in Four Species of Lizards. *Copeia* 1976:392–394.
- Newman JR. 1979. Effects of industrial air pollution on wildlife. *Biol Conserv* 15:181–190.

RÉFÉRENCES

- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M. 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci* 15:684–692.
- Nishide Y, Tanaka S. 2016. Desert locust, *Schistocerca gregaria*, eggs hatch in synchrony in a mass but not when separated. *Behav Ecol Sociobiol* 70:1507–1515.
- Noble DWA, Stenhouse V, Schwanz LE. 2018. Developmental temperatures and phenotypic plasticity in reptiles: a systematic review and meta-analysis. *Biol Rev* 93:72–97.
- Noble RC. 1991. Comparative composition and utilisation of yolk lipid by embryonic birds and reptiles. In: Deeming DC, Ferguson MWJ, editors. *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press.
- Nogués-Bravo D, Araújo MB, Lasanta T, López-Moreno JI. 2008. Climate Change in Mediterranean Mountains during the 21st Century. *AMBIO J Hum Environ* 37:280–285.

O

- Ohlberger J. 2013. Climate warming and ectotherm body size – from individual physiology to community ecology. *Funct Ecol* 27:991–1001.
- Ortega Z, Mencía A, Pérez-Mellado V. 2016. Behavioral buffering of global warming in a cold-adapted lizard. *Ecol Evol* 6:4582–4590.
- Osmond MM, Barbour MA, Bernhardt JR, Pennell MW, Sunday JM, O'Connor MI. 2017. Warming-Induced Changes to Body Size Stabilize Consumer-Resource Dynamics. *Am Nat* 189:718–725.
- Owerkowicz T, Eley RM, Hicks JW. 2009. Atmospheric oxygen level affects growth trajectory, cardiopulmonary allometry and metabolic rate in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Exp Biol* 212:1237–1247.
- Ozgul A, Childs DZ, Oli MK, Armitage KB, Blumstein DT, Olson LE, Tuljapurkar S, Coulson T. 2010. Coupled dynamics of body mass and population growth in response to environmental change. *Nature* 466:482–485.

P

- Pachauri RK, Allen MR, Barros VR, Broome J, Cramer W, Christ R, Church JA, Clarke L, Dahe Q, Dasgupta P, Dubash NK, Edenhofer O, Elgizouli I, Field CB, Forster P, Friedlingstein P, Fuglestvedt J, Gomez-Echeverri L, Hallegatte S, Hegerl G, Howden M, Jiang K, Jimenez Cisneros B, Kattsov V, Lee H, Mach KJ, Marotzke J, Mastrandrea MD, Meyer L, Minx J, Mulugetta Y, O'Brien K, Oppenheimer M, Pereira JJ, Pichs-Madruga R, Plattner G-K, Pörtner H-O, Power SB, Preston B, Ravindranath NH, Reisinger A, Riahi K, Rusticucci M, Scholes R, Seyboth K, Sokona Y, Stavins R, Stocker TF, Tschakert P, van Vuuren D, van Ypersele J-P. 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (Pachauri RK, Meyer L, editors.). Geneva, Switzerland: IPCC. Available from: <https://epic.awi.de/id/eprint/37530/>
- Pacifici M, Foden WB, Visconti P, Watson JEM, Butchart SHM, Kovacs KM, Scheffers BR, Hole DG, Martin TG, Akçakaya HR, Corlett RT, Huntley B, Bickford D, Carr JA, Hoffmann AA, Midgley GF, Pearce-Kelly P, Pearson RG, Williams SE, Willis SG, Young B, Rondinini C. 2015. Assessing species vulnerability to climate change. *Nat Clim Change* 5:215–224.

RÉFÉRENCES

- Pacifici M, Visconti P, Rondinini C. 2018. A framework for the identification of hotspots of climate change risk for mammals. *Glob Change Biol* 24:1626–1636.
- Packard GC, Packard MJ. 1988. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. In: Gans C, editor. *Biology of the Reptilia*. Vol. 16. New York: Alan R. Liss. p 523–605.
- Packard GC, Packard MJ, Miller K, Boardman TJ. 1988. Effects of temperature and moisture during incubation on carcass composition of hatchling snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *J Comp Physiol B* 158:117–125.
- Palmer TN, Räisänen J. 2002. Quantifying the risk of extreme seasonal precipitation events in a changing climate. *Nature* 415:512–514.
- Parker SL, Dimkovikj VH. 2019. Effects of regional hypoxia and incubation temperature on growth, differentiation, heart mass, and oxygen consumption in embryos of the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 227:51–59.
- Parmesan C. 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:637–669.
- Parmesan C, Ryrholm N, Stefanescu C, Hill JK, Thomas CD, Descimon H, Huntley B, Kaila L, Kullberg J, Tammaru T, Tennent WJ, Thomas JA, Warren M. 1999. Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature* 399:579–583.
- Parmesan C, Yohe G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421:37–42.
- Pauchard A, Milbau A, Albiñán A, Alexander J, Burgess T, Daehler C, Englund G, Essl F, Evengård B, Greenwood GB, Haider S, Lenoir J, McDougall K, Muths E, Nuñez MA, Olofsson J, Pellissier L, Rabitsch W, Rew LJ, Robertson M, Sanders N, Kueffer C. 2016. Non-native and native organisms moving into high elevation and high latitude ecosystems in an era of climate change: new challenges for ecology and conservation. *Biol Invasions* 18:345–353.
- Peacock AJ. 1998. Oxygen at high altitude. *BMJ* 317:1063–1066.
- Peck LS, Chapelle G. 2003. Reduced oxygen at high altitude limits maximum size. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:S166–S167.
- Pecl GT, Araújo MB, Bell JD, Blanchard J, Bonebrake TC, Chen I-C, Clark TD, Colwell RK, Danielsen F, Evengård B, Falconi L, Ferrier S, Frusher S, Garcia RA, Griffis RB, Hobday AJ, Janion-Scheepers C, Jarzyna MA, Jennings S, Lenoir J, Linnetved HI, Martin VY, McCormack PC, McDonald J, Mitchell NJ, Mustonen T, Pandolfi JM, Pettoirelli N, Popova E, Robinson SA, Scheffers BR, Shaw JD, Sorte CJB, Strugnelli JM, Sunday JM, Tuanmu M-N, Vergés A, Villanueva C, Wernberg T, Wapstra E, Williams SE. 2017. Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being. *Science* [Internet] 355. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/355/6332/eaai9214>
- Peet-Paré CA, Blouin-Demers G. 2012. Female Eastern Hog-nosed Snakes (*Heterodon platirhinos*) choose nest sites that produce offspring with phenotypes likely to improve fitness. *Can J Zool* 90:1215–1220.
- Pellerin F, Cote J, Bestion E, Aguilée R. 2019. Matching habitat choice promotes species persistence under climate change. *Oikos* 128:221–234.
- Pen I, Uller T, Feldmeyer B, Harts A, While GM, Wapstra E. 2010. Climate-driven population divergence in sex-determining systems. *Nature* 468:436–438.
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD. 2005. Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes. *Science* 308:1912–1915.

RÉFÉRENCES

- Phillips BL, Perkins TA. 2019. Spatial sorting as the spatial analogue of natural selection. *Theor Ecol* 12:155–163.
- Piersma T, Drent J. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol Evol* 18:228–233.
- Pievani T. 2014. The sixth mass extinction: Anthropocene and the human impact on biodiversity. *Rendiconti Lincei* 25:85–93.
- Pigliucci M. 1998. Developmental phenotypic plasticity: Where internal programming meets the external environment. *Curr Opin Plant Biol* 1:87–91.
- Pigliucci M. 2001. *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. JHU Press.
- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* 209:2362–2367.
- Pike DA, Webb JK, Shine R. 2010. Nesting in a thermally challenging environment: nest-site selection in a rock-dwelling gecko, *Oedura lesueurii* (Reptilia: Gekkonidae). *Biol J Linn Soc* 99:250–259.
- Pimm SL, Russell GJ, Gittleman JL, Brooks TM. 1995. The Future of Biodiversity. *Science* 269:347–350.
- Plasman M, McCue ABMD, Vega-Pérez AHD de la. 2020. Resting metabolic rates increase with elevation in a mountain-dwelling lizard. *Integr Zool* [Internet]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1749-4877.12434>
- Porteus C, Hedrick MS, Hicks JW, Wang T, Milsom WK. 2011. Time domains of the hypoxic ventilatory response in ectothermic vertebrates. *J Comp Physiol B* 181:311–333.
- Pörtner HO. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132:739–761.
- Pörtner H-O, Bock C, Mark FC. 2017. Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *J Exp Biol* 220:2685–2696.
- Pörtner HO, Knust R. 2007. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. *Science* 315:95–97.
- Pottier G. 2012. Plan National d'Actions en faveur des Lézards des Pyrénées. In: Ministère de l'Écologie, editor. *Plans Nationaux d'Action pour les espèces menacées en France. Nature Midi-Pyrénées. Bagnères de Bigorre*.
- Pottier G. 2016. *Les Reptiles des Pyrénées*. Muséum national d'Histoire naturelle. Paris.
- Pottier G, Paumier J-M, Tessier M, Barascud Y, Talhoët S, Liozon R, D'Andurain P, Vacher J-P, Barthe L, Heaulmé V, Esslinger M, Arthur C-P, Calvet A, Maurel C, Redon H. 2008. *Atlas de répartition des reptiles et amphibiens de Midi-Pyrénées*. Nature Midi-Pyrénées. Toulouse.
- Pough FH. 1973. Heart rate, breathing and voluntary diving of the elephant trunk snake, *Acrochordus Javanicus*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 44:183–189.
- Pough FH. 1980. The Advantages of Ectothermy for Tetrapods. *Am Nat* 115:92–112.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161–167.
- Powell FL, Hopkins SR. 2010. Vertebrate life at high altitude. In: Nilsson GE, editor. *Respiratory Physiology of Vertebrates: Life With and Without Oxygen*. Cambridge University Press. p 265–299.

RÉFÉRENCES

- Prange HD, Ackerman RA. 1974. Oxygen Consumption and Mechanisms of Gas Exchange of Green Turtle (*Chelonia mydas*) Eggs and Hatchlings. *Copeia* 1974:758–763.
- Pruett JE, Addis EA, Warner DA. 2019. The influence of maternal nesting behaviour on offspring survival: evidence from correlational and cross-fostering studies. *Anim Behav* 153:15–24.

Q - R

- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing [Software]. Version 3.4.3. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- R Development Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing [Software]. Version 3.6.1. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rahn H, Carey C, Balmas K, Bhatia B, Paganelli C. 1977. Reduction of pore area of the avian eggshell as an adaptation to altitude. *Proc Natl Acad Sci* 74:3095–3098.
- Ramirez J-M, Folkow LP, Blix AS. 2007. Hypoxia Tolerance in Mammals and Birds: From the Wilderness to the Clinic. *Annu Rev Physiol* 69:113–143.
- Raup DM. 1991. A kill curve for Phanerozoic marine species. *Paleobiology* 17:37–48.
- Raup DM, Sepkoski JJ. 1982. Mass Extinctions in the Marine Fossil Record. *Science* 215:1501–1503.
- Refsnider JM, Clifton IT, Vazquez TK. 2019. Developmental plasticity of thermal ecology traits in reptiles: Trends, potential benefits, and research needs. *J Therm Biol* 84:74–82.
- Refsnider JM, Daugherty CH, Keall SN, Nelson NJ. 2010. Nest-site choice and fidelity in tuatara on Stephens Island, New Zealand. *J Zool* 280:396–402.
- Rezende EL, Gomes FR, Ghalambor CK, Russell GA, Chappell MA. 2005. An evolutionary frame of work to study physiological adaptation to high altitudes. *Rev Chil Hist Nat [Internet]* 78. Available from: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=369944274016>
- Rich C, Longcore T. 2013. *Ecological Consequences of Artificial Night Lighting*. Island Press.
- Richalet J-P. 2020. CrossTalk opposing view: Barometric pressure, independent of P_{O_2} , is not the forgotten parameter in altitude physiology and mountain medicine. *J Physiol* 598:897–899.
- Richardson AD, Keenan TF, Migliavacca M, Ryu Y, Sonnentag O, Toomey M. 2013. Climate change, phenology, and phenological control of vegetation feedbacks to the climate system. *Agric For Meteorol* 169:156–173.
- Ripple WJ, Newsome TM, Kerley GIH. 2016. Does trophy hunting support biodiversity? A response to Di Minin et al. *Trends Ecol Evol* 31:495–496.
- Roberts SP, Harrison JF. 1999. Mechanisms of thermal stability during flight in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 202:1523–1533.
- Romero-Muñoz A, Benítez-López A, Zurell D, Baumann M, Camino M, Decarre J, Castillo H, Giordano AJ, Gómez-Valencia B, Levers C, Noss AJ, Quiroga V, Thompson JJ, Torres R, Velilla M, Weiler A, Kuemmerle T. 2020. Increasing synergistic effects of habitat destruction and hunting on mammals over three decades in the Gran Chaco. *Ecography* 43:954–966.
- Roy DB, Sparks TH. 2000. Phenology of British butterflies and climate change. *Glob Change Biol* 6:407–416.

S

- Santos M. 2007. Evolution of total net fitness in thermal lines: *Drosophila subobscura* likes it 'warm.' *J Evol Biol* 20:2361–2370.
- Santos RG, Pinheiro HT, Martins AS, Riul P, Bruno SC, Janzen FJ, Ioannou CC. 2016. The anti-predator role of within-nest emergence synchrony in sea turtle hatchlings. *Proc R Soc B Biol Sci* 283:20160697.
- Santos X. 2015. *Culebra viperina - Natrix maura*. In: Salvador A, Marco A, editors. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- Santos X, González-Solis J, Llorente GA. 2000. Variation in the diet of the viperine snake *Natrix maura* in relation to prey availability. *Ecography* 23:185–192.
- Sarre SD, Georges A, Quinn A. 2004. The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26:639–645.
- Sartori MR, Abe AS, Crossley DA, Taylor EW. 2017. Rates of oxygen uptake increase independently of changes in heart rate in late stages of development and at hatching in the green iguana, *Iguana iguana*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 205:28–34.
- Sartori MR, Taylor EW, Abe AS, Crossley DA. 2015. An appraisal of the use of an infrared digital monitoring system for long-term measurement of heart rate in reptilian embryos. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 188:17–21.
- Scheffers BR, Meester LD, Bridge TCL, Hoffmann AA, Pandolfi JM, Corlett RT, Butchart SHM, Pearce-Kelly P, Kovacs KM, Dudgeon D, Pacifici M, Rondinini C, Foden WB, Martin TG, Mora C, Bickford D, Watson JEM. 2016. The broad footprint of climate change from genes to biomes to people. *Science* [Internet] 354. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/354/6313/aaf7671>
- Schluter D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. OUP Oxford.
- Schwarzkopf L, Shine R. 1991. Thermal biology of reproduction in viviparous skinks, *Eulamprus tympanum*: why do gravid females bask more? *Oecologia* 88:562–569.
- Scott GR. 2011. Elevated performance: the unique physiology of birds that fly at high altitudes. *J Exp Biol* 214:2455–2462.
- Scott GR, Milsom WK. 2006. Flying high: A theoretical analysis of the factors limiting exercise performance in birds at altitude. *Respir Physiol Neurobiol* 154:284–301.
- Scribner SJ, Weatherhead PJ. 1995. Locomotion and antipredator behaviour in three species of semi-aquatic snakes. *Can J Zool* 73:321–329.
- Seebacher F, Guderley H, Elsey RM, Trosclair PL. 2003. Seasonal acclimatisation of muscle metabolic enzymes in a reptile (*Alligator mississippiensis*). *J Exp Biol* 206:1193–1200.
- Seebacher F, White CR, Franklin CE. 2015. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nat Clim Change* 5:61–66.
- Sheridan JA, Bickford D. 2011. Shrinking body size as an ecological response to climate change. *Nat Clim Change* 1:401–406.
- Shine R. 1999. Egg-laying reptiles in cold climates: determinants and consequences of nest temperatures in montane lizards. *J Evol Biol* 12:918–926.
- Shine R. 2004. Adaptive consequences of developmental plasticity. In: Deeming DC, editor. *Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour*. Nottingham University Press.

RÉFÉRENCES

- Nottingham. p 187–210. Available from:
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053115521>
- Shine R, Du W-G. 2018. How frequent and important is behavioral thermoregulation by embryonic reptiles? *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol* 329:215–221.
- Shine R, Elphick MJ, Harlow PS. 1997. The Influence of Natural Incubation Environments on the Phenotypic Traits of Hatchling Lizards. *Ecology* 78:2559–2568.
- Shine R, Harlow P. 1993. Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia* 96:122–127.
- Shine R, Shetty S. 2001. Moving in two worlds: aquatic and terrestrial locomotion in sea snakes (*Laticauda colubrina*, Laticaudidae). *J Evol Biol* 14:338–346.
- Sih A, Moore RD. 1993. Delayed Hatching of Salamander Eggs in Response to Enhanced Larval Predation Risk. *Am Nat* 142:947–960.
- Sinervo B, Bertrand R, Darnet E, Le Chevalier H, Trochet A, Dupoué A, Souchet J, Calvez O, Perrin C, Martin Garcia R, Barthe L, Pottier G, Martinez-Silvestre A, Verdaguer-Foz I, Mossoll-Torres M, Guillaume O, Gangloff EJ, Blaimont P, Heulin B, Miles DB, D'Amico F, Clobert J, Aubret F. in prep. Ecophysiological Species Distribution Models for Pyrenean Ectotherms under Climate Change.
- Sinervo B, Méndez-de-la-Cruz F, Miles DB, Heulin B, Bastiaans E, Cruz MV-S, Lara-Resendiz R, Martínez-Méndez N, Calderón-Espinosa ML, Meza-Lázaro RN, Gadsden H, Avila LJ, Morando M, Riva IJD Ia, Sepulveda PV, Rocha CFD, Ibargüengoytia N, Puntriano CA, Massot M, Lepetz V, Oksanen TA, Chapple DG, Bauer AM, Branch WR, Clobert J, Sites JW. 2010. Erosion of Lizard Diversity by Climate Change and Altered Thermal Niches. *Science* 328:894–899.
- Sinervo B, Miles DB, Wu Y, Méndez-De La Cruz FR, Kirchhof S, Qi Y. 2018. Climate change, thermal niches, extinction risk and maternal-effect rescue of toad-headed lizards, *Phrynocephalus*, in thermal extremes of the Arabian Peninsula to the Qinghai—Tibetan Plateau. *Integr Zool* 13:450–470.
- Slabbekoorn H. 2013. Songs of the city: noise-dependent spectral plasticity in the acoustic phenotype of urban birds. *Anim Behav* 85:1089–1099.
- Smale DA, Wernberg T. 2013. Extreme climatic event drives range contraction of a habitat-forming species. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20122829.
- Smith C, Telemeco RS, Angilletta MJ, VandenBrooks JM. 2015. Oxygen supply limits the heat tolerance of lizard embryos. *Biol Lett* 11:20150113.
- Smith PN, Cobb GP, Godard-Coding C, Hoff D, McMurry ST, Rainwater TR, Reynolds KD. 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environ Pollut* 150:41–64.
- Somero GN. 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic “strategies.” *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139:321–333.
- Sorte CJB, Williams SL, Carlton JT. 2010. Marine range shifts and species introductions: comparative spread rates and community impacts. *Glob Ecol Biogeogr* 19:303–316.
- Souchet J, Gangloff EJ, Micheli G, Bossu C, Trochet A, Bertrand R, Clobert J, Calvez O, Martinez-Silvestre A, Darnet E, Chevalier HL, Guillaume O, Mossoll-Torres M, Barthe L, Pottier G, Philippe H, Aubret F. 2020. High-elevation hypoxia impacts perinatal physiology and performance in a potential montane colonizer. *Integr Zool* 0:1–14.
- Spencer R-J, Janzen FJ. 2011. Hatching Behavior in Turtles. *Integr Comp Biol* 51:100–110.

RÉFÉRENCES

- Spencer R-J, Thompson MB, Banks PB. 2001. Hatch or wait? A dilemma in reptilian incubation. *Oikos* 93:401–406.
- Stearns SC. 1989. The Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity. *BioScience* 39:436–445.
- Steinbauer MJ, Grytnes J-A, Jurasinski G, Kulonen A, Lenoir J, Pauli H, Rixen C, Winkler M, Bardy-Durchhalter M, Barni E, Bjorkman AD, Breiner FT, Burg S, Czortek P, Dawes MA, Delimat A, Dullinger S, Erschbamer B, Felde VA, Fernández-Arberas O, Fossheim KF, Gómez-García D, Georges D, Grindrud ET, Haider S, Haugum SV, Henriksen H, Herreros MJ, Jaroszewicz B, Jaroszynska F, Kanka R, Kapfer J, Klanderud K, Kühn I, Lamprecht A, Matteodo M, Cella UM, Normand S, Odland A, Olsen SL, Palacio S, Petey M, Piscová V, Sedlakova B, Steinbauer K, Stöckli V, Svenning J-C, Teppa G, Theurillat J-P, Vittoz P, Woodin SJ, Zimmermann NE, Wipf S. 2018. Accelerated increase in plant species richness on mountain summits is linked to warming. *Nature*:1.
- Stevenson RD, Peterson CR, Tsuji JS. 1985. The Thermal Dependence of Locomotion, Tongue Flicking, Digestion, and Oxygen Consumption in the Wandering Garter Snake. *Physiol Zool* 58:46–57.
- Stoleson SH, Beissinger SR. 1999. Egg viability as a constraint on hatching synchrony at high ambient temperatures. *J Anim Ecol* 68:951–962.
- Stone PA, Dobie JL, Henry RP. 1992. The Effect of Aquatic O₂ Levels on Diving and Ventilatory Behavior in Soft-Shell (Trionyx spiniferus), Stinkpot (Sternotherus odoratus), and Mud Turtles (Kinosternon subrubrum). *Physiol Zool* 65:331–345.
- Stork NE. 2010. Re-assessing current extinction rates. *Biodivers Conserv* 19:357–371.
- Storz JF. 2007. Hemoglobin Function and Physiological Adaptation to Hypoxia in High-Altitude Mammals. *J Mammal* 88:24–31.
- Storz JF. 2016. Hemoglobin–oxygen affinity in high-altitude vertebrates: is there evidence for an adaptive trend? *J Exp Biol* 219:3190–3203.
- Storz JF, Dubach JM, Harrison R. 2004. Natural selection drives altitudinal divergence at the albumin locus in deer mice, *peromyscus maniculatus*. *Evolution* 58:1342–1352.
- Storz JF, Scott GR, Cheviron ZA. 2010. Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol* 213:4125–4136.
- Stuart-Smith RD, Edgar GJ, Barrett NS, Kininmonth SJ, Bates AE. 2015. Thermal biases and vulnerability to warming in the world's marine fauna. *Nature* 528:88–92.
- Sun B-J, Li T, Gao J, Ma L, Du W-G. 2015. High incubation temperatures enhance mitochondrial energy metabolism in reptile embryos. *Sci Rep* 5:8861.
- Sun B-J, Wang T-T, Pike DA, Liang L, Du W-G. 2014. Embryonic oxygen enhances learning ability in hatchling lizards. *Front Zool* 11:21.
- Sunday JM, Bates AE, Dulvy NK. 2012. Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nat Clim Change* 2:686–690.

T

- Tanaka S. 2017. *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) embryos monitor neighboring eggs for hatching synchrony. *J Orthoptera Res* 26:103–115.
- Taylor B, Skelly D, Demarchis LK, Slade MD, Galusha D, Rabinowitz PM. 2005. Proximity to Pollution Sources and Risk of Amphibian Limb Malformation. *Environ Health Perspect* 113:1497–1501.

RÉFÉRENCES

- Taylor EN, Diele-Viegas LM, Gangloff EJ, Hall JM, Halpern B, Massey MD, Rödder D, Rollinson N, Spears S, Sun B, Telemeco RS. 2020. The thermal ecology and physiology of reptiles and amphibians: A user's guide. *J Exp Zool Part Ecol Integr Physiol* [Internet] n/a. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.2396>
- Tazawa H. 2005. Cardiac rhythms in avian embryos and hatchlings.
- Telemeco RS, Elphick MJ, Shine R. 2009. Nesting lizards (*Bassiana duperreyi*) compensate partly, but not completely, for climate change. *Ecology* 90:17–22.
- Telemeco RS, Gangloff EJ, Cordero GA, Mitchell TS, Bodensteiner BL, Holden KG, Mitchell SM, Polich RL, Janzen FJ. 2016. Reptile Embryos Lack the Opportunity to Thermoregulate by Moving within the Egg. *Am Nat* 188:E13–E27.
- Thackeray SJ, Sparks TH, Frederiksen M, Burthe S, Bacon PJ, Bell JR, Botham MS, Brereton TM, Bright PW, Carvalho L, Clutton-Brock T, Dawson A, Edwards M, Elliott JM, Harrington R, Johns D, Jones ID, Jones JT, Leech DI, Roy DB, Scott WA, Smith M, Smithers RJ, Winfield IJ, Wanless S. 2010. Trophic level asynchrony in rates of phenological change for marine, freshwater and terrestrial environments. *Glob Change Biol* 16:3304–3313.
- Thomas CD, Franco AMA, Hill JK. 2006. Range retractions and extinction in the face of climate warming. *Trends Ecol Evol* 21:415–416.
- Thompson SA, Thompson GG, Withers PC. 2008. Rehabilitation index for evaluating restoration of terrestrial ecosystems using the reptile assemblage as the bio-indicator. *Ecol Indic* 8:530–549.
- Trenberth KE, Dai A, van der Schrier G, Jones PD, Barichivich J, Briffa KR, Sheffield J. 2014. Global warming and changes in drought. *Nat Clim Change* 4:17–22.
- Treshow M, Anderson FK. 1989. Plant stress from air pollution. *Plant Stress Air Pollut* [Internet]. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19900736356>
- Trochet A, Dupoué A, Souchet J, Bertrand R, Deluen M, Murarasu S, Calvez O, Martinez-Silvestre A, Verdaguer-Foz I, Darnet E, Chevalier HL, Mossoll-Torres M, Guillaume O, Aubret F. 2018. Variation of preferred body temperatures along an altitudinal gradient: A multi-species study. *J Therm Biol* 77:38–44.
- Tzedakis PC. 2004. The Balkans as Prime Glacial Refugial Territory of European Temperate Trees. In: Griffiths HI, Kryštufek B, Reed JM, editors. *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Dordrecht: Springer Netherlands. p 49–68. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2854-0_4

U

- Urban MC. 2018. Escalator to extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:11871–11873.

V

- Vacher J-P, Geniez M. 2010. *Les Reptiles de France, Belgique, Luxembourg et Suisse*. Biotope.
- Vacher J-P, Santos X. 2010. *Natrix maura* (Linnaeus, 1758). In: Vacher J-P, Geniez M, editors. *Les Reptiles de France, Belgique, Luxembourg et Suisse*. Muséum national d'Histoire naturelle. Biotope. Paris. p 456–463.

RÉFÉRENCES

- Verberk WCEP, Overgaard J, Ern R, Bayley M, Wang T, Boardman L, Terblanche JS. 2016. Does oxygen limit thermal tolerance in arthropods? A critical review of current evidence. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 192:64–78.
- Vimmerstedt JC, Padilla Pérez DJ, Angilletta MJ, VandenBrooks JM. 2019. Oxygen supply limits the heat tolerance of avian embryos. *Biol Lett* 15:20190566.
- Vince M. 1969. Embryonic communication, respiration and the synchronization of hatching. *Avian Incubation Behav Environ Evol*:88–99.
- Vince MA, Chinn S. 1971. Effect of accelerated hatching on the initiation of standing and walking in the Japanese quail. *Anim Behav* 19:62–66.
- Vindenes Y, Edeline E, Ohlberger J, Langangen Ø, Winfield IJ, Stenseth NC, Vøllestad LA. 2014. Effects of Climate Change on Trait-Based Dynamics of a Top Predator in Freshwater Ecosystems. *Am Nat* 183:243–256.
- Vinegar A, Hillyard SD. 1972. The effects of altitude on oxygen-binding parameters of the blood of the iguanid lizards, *Sceloporus jarrovi* and *Sceloporus occidentalis*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 43:317–320.
- Visser ME, Both C, Lambrechts MM. 2004. Global Climate Change Leads to Mistimed Avian Reproduction. In: *Advances in Ecological Research*. Vol. 35. Birds and Climate Change. Academic Press. p 89–110. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065250404350051>
- Visser ME, Noordwijk AJ van, Tinbergen JM, Lessells CM. 1998. Warmer springs lead to mistimed reproduction in great tits (*Parus major*). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265:1867–1870.
- Vitt LJ. 1991. Ecology and life history of the scansorial arboreal lizard *Plica plica* (Iguanidae) in Amazonian Brazil. *Can J Zool* 69:504–511.
- Vitt LJ, Caldwell JP. 2013. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press.
- Vleck CM, Hoyt DF. 1991. Metabolism and energetics of reptilian and avian embryos. In: Deeming DC, Ferguson MWJ, editors. *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press. p 285–306.
- Vleck CM, Vleck D. 1996. Embryonic Energetics. In: Carey C, editor. *Avian Energetics and Nutritional Ecology*. Boston, MA: Springer US. p 417–454. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0425-8_12

W

- Walczyńska A, Franch-Gras L, Serra M. 2017. Empirical evidence for fast temperature-dependent body size evolution in rotifers. *Hydrobiologia* 796:191–200.
- Walczyńska A, Kiełbasa A, Sobczyk M. 2016. ‘Optimal thermal range’ in ectotherms: Defining criteria for tests of the temperature-size-rule. *J Therm Biol* 60:41–48.
- Walther G-R, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin J-M, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416:389–395.
- Wangensteen OD, Rahn H, Burton RR, Smith AH. 1974. Respiratory gas exchange of high altitude adapted chick embryos. *Respir Physiol* 21:61–70.
- Wapstra E. 2000. Maternal basking opportunity affects juvenile phenotype in a viviparous lizard. *Funct Ecol* 14:345–352.

RÉFÉRENCES

- Warkentin KM. 1995. Adaptive plasticity in hatching age: a response to predation risk trade-offs. *Proc Natl Acad Sci* 92:3507–3510.
- Warkentin KM. 2000. Wasp predation and wasp-induced hatching of red-eyed treefrog eggs. *Anim Behav* 60:503–510.
- Warner DA. 2014. Fitness Consequences of Maternal and Embryonic Responses to Environmental Variation: Using Reptiles as Models for Studies of Developmental Plasticity. *Integr Comp Biol* 54:757–773.
- Warner DA, Moody MA, Telemeco RS, Kolbe JJ. 2012. Egg environments have large effects on embryonic development, but have minimal consequences for hatchling phenotypes in an invasive lizard. *Biol J Linn Soc* 105:25–41.
- Watkins TB, Vraspir J. 2006. Both Incubation Temperature and Posthatching Temperature Affect Swimming Performance and Morphology of Wood Frog Tadpoles (*Rana sylvatica*). *Physiol Biochem Zool* 79:140–149.
- Wearing OH, Conner J, Nelson D, Crossley J, Crossley DA. 2017. Embryonic hypoxia programmes postprandial cardiovascular function in adult common snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *J Exp Biol* 220:2589–2597.
- Wearing OH, Eme J, Rhen T, Crossley DA. 2015. Phenotypic plasticity in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*): long-term physiological effects of chronic hypoxia during embryonic development. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 310:R176–R184.
- Weathers WW, McGrath JJ. 1972. Acclimation to simulated altitude in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 42:263–268.
- Weathers WW, White FN. 1972. Hematological Observations on Populations of the Lizard *Sceloporus occidentalis* from Sea Level and Altitude. *Herpetologica* 28:172–175.
- Wernberg T, Russell BD, Thomsen MS, Gurgel CFD, Bradshaw CJA, Poloczanska ES, Connell SD. 2011. Seaweed Communities in Retreat from Ocean Warming. *Curr Biol* 21:1828–1832.
- West-Eberhard MJ. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press.
- While GM, Williamson J, Prescott G, Horváthová T, Fresnillo B, Beeton NJ, Halliwell B, Michaelides S, Uller T. 2015. Adaptive responses to cool climate promotes persistence of a non-native lizard. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 282:20142638.
- Whitehead PJ. 1987. Respiration of *Crocodylus johnstoni* embryos. *Wildl Manag Crocodiles Alligators Surrey Beatty Syd*:473–497.
- Whitfield SM, Bell KE, Philippi T, Sasa M, Bolaños F, Chaves G, Savage JM, Donnelly MA. 2007. Amphibian and Reptile Declines over 35 Years at La Selva, Costa Rica. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8352–8356.
- Whitman DW, Agrawal AA. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important? *Phenotypic Plast Insects Mech Consequences*:1–63.
- Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer.
- Williamson SA, Evans RG, Robinson NJ, Reina RD. 2017. Hypoxia as a novel method for preventing movement-induced mortality during translocation of turtle eggs. *Biol Conserv* 216:86–92.
- Wilson EO. 1992. *The diversity of life*. Cambridge, Mass.: Belknap Press of Harvard University Press.
- Wilson RJ, Gutiérrez D, Gutiérrez J, Martínez D, Agudo R, Monserrat VJ. 2005. Changes to the elevational limits and extent of species ranges associated with climate change. *Ecol Lett* 8:1138–1146.

RÉFÉRENCES

- Winne CT, Willson JD, Andrews KM. 2006. Efficacy of marking snakes with disposable medical cautery units. *Herpetol Rev* 37:52–54.
- Winner WE, Atkinson CJ. 1986. Absorption of air pollution by plants, and consequences for growth. *Trends Ecol Evol* 1:15–18.
- Witherington BE, Martin RE. 2000. Understanding, Assessing, and Resolving Light-Pollution Problems on Sea Turtle Nesting Beaches.
- Woltereck R. 1909. Weitere experimentelle Untersuchungen über Artveränderung, speziell über das Wesen quantitativer Arrtunterschiede bei Daphniden. *Ver Tsch Zool Ges*:110–172.
- Wu Q, Dang W, Hu Y-C, Lu H-L. 2018. Altitude influences thermal ecology and thermal sensitivity of locomotor performance in a toad-headed lizard. *J Therm Biol* 71:136–141.

X - Y

- Yeh PJ. 2004. Rapid Evolution of a Sexually Selected Trait Following Population Establishment in a Novel Habitat. *Evolution* 58:166–174.
- Yeh PJ, Price TD. 2004. Adaptive Phenotypic Plasticity and the Successful Colonization of a Novel Environment. *Am Nat* 164:531–542.

Z

- Zellweger F, Frenne PD, Lenoir J, Vangansbeke P, Verheyen K, Bernhardt-Römermann M, Baeten L, Hédli R, Berki I, Brunet J, Calster HV, Chudomelová M, Decocq G, Dirnböck T, Durak T, Heinken T, Jaroszewicz B, Kopecký M, Máliš F, Macek M, Malicki M, Naaf T, Nagel TA, Ortmann-Ajkai A, Petřík P, Pielech R, Reczyńska K, Schmidt W, Standovár T, Świerkosz K, Teleki B, Vild O, Wulf M, Coomes D. 2020. Forest microclimate dynamics drive plant responses to warming. *Science* 368:772–775.
- Zhou S, Campbell TG, Stone EA, Mackay TFC, Anholt RRH. 2012. Phenotypic Plasticity of the *Drosophila* Transcriptome. *PLOS Genet* 8:e1002593.
- Zuk M, Bastiaans E, Langkilde T, Swanger E. 2014. The role of behaviour in the establishment of novel traits. *Anim Behav* 92:333–344.

Effets de l'hypoxie d'altitude sur le développement embryonnaire et les performances juvéniles chez la Couleuvre vipérine, *Natrix maura*, dans le contexte actuel du changement climatique.

Le changement climatique pourrait entraîner, d'ici 2100, une hausse de la température moyenne à la surface de la Terre de 1°C à 6.5°C par rapport à la température moyenne estimée entre 1986 et 2005. Cela est susceptible d'augmenter le risque d'extinction des espèces, de modifier leur aire de répartition, en impactant la phénologie de reproduction et de migration des organismes, entraînant un changement des schémas de biodiversité à l'échelle mondiale. Les ectothermes, dont l'ensemble des traits physiologiques et comportementaux sont dépendants des températures environnementales, vont d'autant plus être affectés par le changement climatique et devront migrer vers des zones thermiques plus favorables, comme les zones de haute altitude. Cependant, en altitude, la diminution de la pression partielle de l'air réduit la quantité d'oxygène disponible. Cette nouvelle contrainte environnementale, l'hypoxie d'altitude, pourrait limiter leurs chances de coloniser ces milieux. Cette thèse cherche à mettre en évidence les réponses physiologiques à l'hypoxie d'altitude chez la Couleuvre vipérine, *Natrix maura*, une colonisatrice historique qui subit une expansion de gamme vers le haut, et à définir sa capacité à utiliser les espaces montagnards comme refuge face au changement climatique. Les objectifs sont, d'abord mesurer les effets de l'hypoxie d'altitude et de l'interaction qu'elle peut avoir avec la température sur le développement par l'intermédiaire du suivi de l'activité métabolique embryonnaire et des taux de développement. Puis, d'observer la persistance potentielle de ces effets sur les performances et le métabolisme des juvéniles. Les résultats de ces travaux suggèrent que, chez la Couleuvre vipérine, les réponses physiologiques plastiques des embryons à l'hypoxie de haute-altitude pourraient faciliter l'expansion de l'aire de répartition altitudinale à travers le maintien des phénotypes corporels et des performances physiques des juvéniles.

Mots-clés : *Changement climatique, Hypoxie d'altitude, Développement embryonnaire, Taux métabolique, Plasticité phénotypique, Natrix maura.*

Effects of high-elevation hypoxia on embryonic development and juvenile performance in the Viperine snake, *Natrix maura*, under the current context of climate change.

By 2100, climate change could lead to an increase in the average temperature on the Earth's surface of 1°C to 6.5°C compared to the average temperature estimated between 1986 and 2005. This is likely to increase the risk of species extinction or change species ranges by impacting the reproductive phenology and the migration of organisms, leading to a change in biodiversity patterns on a global level. Ectotherms, whose set of physiological and behavioural traits are dependent on environmental temperatures, will be further affected by climate change and will have to migrate to more favourable thermal zones, such as to high altitude. However, at higher altitudes, the decrease in the partial pressure of the air reduces the availability of oxygen. This new environmental constraint, high-elevation hypoxia, could limit organisms' chances of colonizing these environments. This thesis seeks to highlight the physiological responses to high-elevation hypoxia in the Viperine snake, *Natrix maura*, a historical colonizer currently undergoing an upward range expansion, and to define its capacity to use mountain areas as a refuge in the context of climate change. The objectives are, in the first instance, to measure the effects of high-elevation hypoxia and the interaction it may have with temperature on development through monitoring embryonic metabolic activity and development rates. The second objective is to observe the potential persistence of these effects on the performance and metabolism of juveniles. The results of this work suggest that, in the Viperine Snake, the plastic physiological responses of embryos to high-elevation hypoxia could facilitate the expansion of the altitudinal range through the maintenance of body phenotypes and physical performance of juveniles.

Keywords: *Climate Change, High-altitude hypoxia, Embryonic development, Metabolic rate, Phenotypic plasticity Natrix maura.*