



HAL
open science

Contraintes hydriques et thermiques associées aux changements climatiques : réponses physiologiques et comportementales chez deux serpents vivipares

Mathias Dezetter

► To cite this version:

Mathias Dezetter. Contraintes hydriques et thermiques associées aux changements climatiques : réponses physiologiques et comportementales chez deux serpents vivipares. Biodiversité et Ecologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS213 . tel-03828207

HAL Id: tel-03828207

<https://theses.hal.science/tel-03828207>

Submitted on 25 Oct 2022

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

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

Sorbonne Université

Ecole Doctorale 227 : Sciences de la Nature et de l'Homme : Evolution et Ecologie

Centre d'Études Biologiques de Chizé – Equipe ECOPHY

Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris - Equipe VPA

Contraintes hydriques et thermiques associées aux changements climatiques : réponses physiologiques et comportementales chez deux serpents vivipares



Par **Mathias Dezetter**

Thèse de doctorat en **Ecologie**



Dirigée par **Olivier Lourdais** et **Jean-François Le Galliard**

Présentée et soutenue publiquement le 10 mars 2022

Devant un jury composé de :

Christel LE FRANCOIS	MCF	Rapportrice
Hervé COLINET	CR	Rapporteur
Dale DENARDO	Pr	Examineur
Karine SALIN	CR	Examinatrice
Julien GASPARINI	Pr	Examineur
Jean-François LE GALLIARD	DR	Co-directeur de thèse
Olivier LOURDAIS	CR	Co-directeur de thèse

A mes grands-parents, Suzel et Francis Fay, Jenny et Gilbert Dezetter,

Préface

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement *Olivier Lourdais* et *Jean-François Le Galliard* pour la qualité de leur encadrement, leur investissement et leur soutien tout au long de ma thèse, merci de m'avoir fait confiance, j'ai énormément appris à vos côtés. C'est une chance d'avoir bénéficié de votre soutien et d'avoir été formé à la recherche avec vous.

Merci *Olivier*, de m'avoir accueilli au CEBC pour la première fois en 2017, puis de m'avoir soutenu dans mes projets depuis, d'avoir pris le temps de me guider dans la recherche jusqu'à aujourd'hui. Plus de 4 ans d'encadrement rapproché durant lesquels ton investissement, ton écoute et ton coaching de tous les jours m'ont réellement permis de progresser dans mes méthodes, ont forgé mes idées scientifiques et ma manière de travailler. Merci d'avoir été présent dans les moments les plus intenses et difficiles et d'avoir activement participé à mes expérimentations quand j'en avais besoin, de m'avoir transmis tes méthodes pour gagner en autonomie et m'épanouir dans mes projets. Nos discussions science passionnées m'ont motivé tout au long de la thèse, et tes conseils au fil de l'eau m'ont aidé à prendre du recul et à cibler les priorités. Cette thèse c'est aussi plusieurs années pleines d'humour, de chansons expérimentales (*les vipères chenapans*), de partage musical (du rap français au blues mandingue !), de bons moments de terrain et d'échange autour de passions partagées ! Je t'en suis vraiment reconnaissant. Merci *Jean-François* d'avoir su être aussi présent et impliqué malgré la distance et le contexte sanitaire qui n'a pas facilité la tâche d'un encadrement depuis Paris ! Ta disponibilité et ton investissement m'ont vraiment aidé à surmonter les épreuves de la thèse, à progresser et à développer mes idées, à aller plus loin. Merci pour cet encadrement rapproché, ces relectures détaillées de mes articles comme de mes scripts, pour tes explications claires et pédagogiques sur les statistiques. Merci de m'avoir accueilli à Paris et à Foljuif et pour les bons moments partagés ensemble !

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté de relire ce manuscrit et d'assister à ma soutenance de thèse : *Christel Le François*, *Hervé Colinet*, *Karine Salin*, *Julien Gasparini* et *Dale DeNardo*. Thank you very much *Dale* for accepting to participate in my PhD defense committee, I really appreciate it!

Merci *Andréaz Dupoué*, depuis le début de mon travail à Chizé, tes travaux ont inspiré mes recherches et tes conseils m'ont aidé à construire mes projets et à m'organiser ! Merci pour ton soutien, pour les dosages que tu as géré avec une efficacité impressionnante et pour ton implication sur les systèmes de respirométrie. Ta disponibilité et ta bienveillance m'ont vraiment aidé, collaborer avec toi sur mon premier papier a été un plaisir. Je garde aussi un très bon souvenir de la découverte du terrain lézard ! Merci *Michaël Guillon* pour nos discussions science et pour ton aide précieuse sur le terrain et la découverte de sites

incroyables. Merci *David Rozen-Rechels* pour ta disponibilité et tes conseils, nos quelques échanges m'ont aidé à anticiper et mener à bien cette fin de thèse. Merci également *Gaëtan Guiller* pour ton implication indispensable pour les captures et pour m'avoir formé et aider à anticiper mes manips vipéreaux, ton soutien a été crucial pour ma thèse. Merci aussi *Donatien François* pour ton aide aux captures sur ton secteur de prédilection.

Merci *Rémi Ksas* et *l'équipe de VenomWorld*, c'est grâce à notre partenariat et à ton soutien technique que j'ai pu mener à bien cette thèse en expérimental, tes idées et nos discussions passionnantes ont façonné certains de mes projets. Merci *Laurie Berthomieu* et à *l'équipe de Zoodyssée* d'avoir assuré le suivi vétérinaire de nos vipères et pour avoir mis à disposition vos élevages de rongeurs.

Merci aux étudiantes qui ont effectué leur stage avec moi et dont la contribution à mes expérimentations a été essentielle. Merci *Annelise Roustaing* et *Romane Schaeffer* pour votre aide en 2019 ! Merci beaucoup *Aésane Meric* pour ton soutien en 2020 pour la réalisation de l'expérience la plus ambitieuse et chargée de ma thèse, je n'y serai pas arrivé sans toi (*les codes couleurs auront quand même été une épreuve difficile de ton stage*) ! Merci aussi *Lauriane Bégué* pour ton aide pendant quelques semaines de 2020 !

Merci à toute *l'équipe ECOPHY du CEBC* pour leur soutien ! Merci *Bruno Michaud* pour ton investissement, ton aide et ta bonne humeur ! Merci *Robin Viton* et *Elsa Daniaud* pour votre appui logistique. Merci *Frédéric Angelier* et *François Brischoux* pour votre investissement dans mon comité de thèse et pour nos collaborations. Obrigado *Rodrigo Gavira* pour ton aide, thanks *George Bruschi* for your advices! Merci aussi *Olivier Chastel* pour les bons moments passés au labo et les discussions tortues en soirée ! Merci beaucoup à *l'équipe de biochimie du CEBC*, *Frédéric Angelier*, *Charline Parenteau*, *Cécile Ribout*, *Marie Pallud* et *Emmanuelle Grimaud* pour tous les dosages réalisés, pour m'avoir accueilli et formé.

Je remercie aussi *l'équipe VPA de l'iEES Paris*. Le contexte sanitaire et la charge de travail expérimental de ma thèse ne m'ont pas permis d'être très présent et actif, mais je vous remercie de m'avoir toujours intégré dans vos échanges (Merci *Tom Van Dooren* !). Merci *Chloé Chabaud* de m'avoir aidé à suivre à distance la vie de l'iEES. Merci *Sandrine Meylan* pour ta disponibilité et ton soutien, tes conseils et relectures et pour nos quelques échanges qui m'ont motivé ! Merci *Mathieu Leroux-coyau* pour avoir réalisé mes dosages et m'y avoir formé.

Merci à mon comité de suivi de thèse pour votre investissement et vos conseils : *David Laloi*, *Sandrine Meylan*, *Frédéric Angelier* et *François Brischoux*.

Merci aux multiples personnes avec qui j'ai pu collaborer pendant cette thèse : Merci *Alexandre Boissinot* pour m'avoir permis de communiquer sur mes travaux, *Gilles Bentz* pour tes retours et nos échanges ! Merci *Fernando Martínez-Freiría* et *Inês Freitas* pour ce projet passionnant en 2021. Merci à tous ceux avec qui j'ai travaillé sur différents projets annexes,

Arnaud Geysseles, Théo Doiteau, Sophie Morin, Justine Vidal, Cassandre Treyvaud, Nicolas Proust, Stéphane Lecq.

Merci à toute *l'équipe administrative du CEBC* pour votre aide, et à *l'équipe administrative de l'iEES* qui a su me guider et gérer tous mes dossiers à distance. Merci *Camille Vignes* et *Julien Gasparini* pour votre réactivité et votre disponibilité. Merci *Marlène Gruet* pour m'avoir débloqué dans mes commandes, gestion des fournisseurs et autres multiples démarches. Merci à toute *l'équipe de l'atelier du CEBC* pour leur soutien. Un grand merci au *restaurant du CEBC*, *Christophe Coiffet*, *Arnaud Violet* et *Morgane* pour vos plats délicieux et la bonne ambiance que créez au labo, et que vous avez réussi à maintenir malgré la pandémie.

Merci au personnel d'entretien du CEBC pour leur gentillesse, notamment à *Mina Darry* pour m'avoir fait pratiquer mon darija et à *Barbarito Lugones Sanchez* pour sa bonne humeur et ses concerts de salsa cubaine !

Pour finir, je remercie tous ceux qui sur mon chemin professionnel et scolaire ont su me guider, me former et me motiver à poursuivre cette voie. Merci *Serge Barbier* pour m'avoir mis sur les rails de la biologie avec passion et rigueur (« *les faits, rien que les faits, seulement les faits* »). Merci *Adrien Pinot* pour m'avoir guidé vers Chizé depuis Clermont Ferrand, et pour m'avoir accompagné dans mes projets avec l'Observatoire des Reptiles d'Auvergne.

Une thèse au CEBC, c'est aussi beaucoup de rencontres et d'amitiés.

Tout d'abord merci à tous ceux avec qui j'ai vécu à mon arrivée à Chizé en Master2, pour tous ces liens forts et toutes ces amitiés, *Nathan perdrix, Marine chevreuil, Thomas, Marie, Lolo, Théo, Mathias, J.E., Igor, Auxence, Laurie, Cécilia, Julie, Bengui, Stefano, Simona, Jojo, Emma, Camillita, Fabinou Fabrice, Charles, Jazelito, Sydney...*

Merci à tous mes colloqs avec qui j'ai vécu de très belles années. Merci pour cette superbe première année *Marion* et *J.E.*, une super coloc avec *Sueño* rythmée par les danses impromptues et les crapauds. Merci à toute la *Oncherie* ou la bande de la rue Maurice Ferroux d'après le voisinage, et plus particulièrement à *Sydney, Nolwenn, Zazouille, Pipou, Malo, Hermance, Ariane* (coloc à mi-temps mais quand même !). Tous ces moments partagés ont énormément de valeur, du jardin à la cave (et sa barrière). Merci aussi à toute la basse court, *Mango 2, Pasmyrtille, Popito & Billycroquette, Sueño* et *Léopoldine, Salam & Alaikoum*, le pigeon, la 60ème de poules, canards, oies, cloportes et cochons d'indes qui nous ont occupé (et parfois nourris) pendant 3 ans. Merci *Madeleine* et *Henri* pour les beaux moments du quotidien avec les animaux.

Merci à tous les amis de Chizé et du coin ! *Martin, Amélie, Christophe, Fabinou, Marie*, pour nos sorties asperges, ail des ours, aspérules, macération multiples du coquelicot à la trousspinette.. ! *Agathe Jaffard* et les pingouins, *Marion, J.E., Thomas, Léa, Adrien, Tatiana,*

Pauline, Antonin, William (et tes multiples homonymes), *Jade, Emilie, Marie, Valentin, Manrico, Cécile, Gopal, Manu, Théo, Olympe, Anaïs, Flofito...* Merci pour tous ces beaux moments. Merci *Fred* et *Christine* de LaPC de nous accueillir si souvent, pour les superbes découvertes culinaires et toutes les belles soirées passées ensemble. Merci à *David* du Bora Bora pour ce lieu génial et improbable. Gracias *Barbarito* por aprovechar la vida con nosotros, merci à *toute l'équipe d'Escal'a Kuba* pour les concerts et pour être venu jouer à la maison.

Merci à tous mes amis que je n'ai pas vu beaucoup ces trois dernières années. A tous ceux qui ont pu me rendre visite et découvrir la vie Chizéenne, *Agnès* et *Nathan, Alice, Nonoz* et *Julien, Elie, le bagage en soute de Zaza, Guillaume, Martin, Benoit, Julien D. ..!* A tous ceux que j'ai réussi à croiser malgré les difficultés de la thèse, *Francis* et *Fafa, Victor, Margot, Madou, Zoé* (et bientôt en Côte d'Ivoire j'espère)...A tous les pinos de la reinette, au PCE de l'ambiance et amis de VAS. Merci à *Vincent G.* que je ne vois plus assez, à tous les amis de Bamako dont j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau après toutes ces années.

Et puis pour ces années d'amitié, et toutes celles à venir, merci *Marion*. Des souvenirs irracontables et improbables, et un miracle qu'on en soit arrivé là, vraiment merci. De nos conversations à la cuisine de busard jusqu'à aujourd'hui, je ne sais pas trop ce qu'il s'est passé. Merci *Matthias* pour ton amitié et tous les moments partagés et à venir, je ne sais pas si tu auras ta dread tout de suite, mais au moins tu as un remerciement avec ton « vrai » prénom. Moltes gràcies *Jazelito*, la carbonera. Merci pour cette amitié et pour avoir été là.

Merci à toute l'équipe et aux collaborateurs de *Nature Conserv'Action* : *Clément, Cindy, Vincent, Virginie, Mathieu* et *Justine*, pour tous nos projets collectifs et tous ceux qui arrivent. Gracias a todas y todos en *AMPA*, a los *comuneros*, los *biologos* de Lima (*Diego, Christine, Lucia*, y todos los demas !). Merci *Abdou* pour nos projets de vulgarisation et de communication au Maroc !

Gracias tambien a todas y todos mis amigas y amigos del Peru, a *Dayan, Julio, Colo, Diego* y todos los demas. Pronto nos volveremos a ver.

La rencontre la plus incroyable, improbable et marquante de mon passage à Chizé... Merci *Sydney Hope*, M'bifé.

Merci à *toute ma famille* qui m'a toujours soutenu dans mes passions et dans mes choix. Merci à *mes parents* pour leur amour et leur soutien. Des scarabées de Ouagadougou aux vipères bretonnes, c'est bien vous qui m'avez transmis cette fascination pour la nature. Merci à mes sœurs, *Fantine, Elodie* et *Virginie* pour qui vous êtes. Merci à *mes grands-parents* de m'avoir soutenu et d'avoir suivi mon chemin avec intérêt.

Préambule

Mes travaux de recherche au cours de cette thèse s'inscrivent dans le projet scientifique de l'ANR AQUATHERM - " Rôles de la régulation hydrique et thermique dans les réponses écologiques au changement climatique " – regroupant les laboratoires du CEBC, du CEREEP-Ecotron, de l'iEES Paris et du SETE. Ma thèse est effectuée en cotutelle entre l'iEES Paris et le CEBC où j'ai mené la totalité de mes expérimentations sous la responsabilité d'Olivier Lourdaï. Mon contrat doctoral est financé par Sorbonne Université suite à l'obtention du concours de l'Ecole Doctorale 227 - " Sciences de la nature et de l'Homme : évolution et écologie " – qui est coaccréditée par le MNHN et SU.

Mes projets de recherche bénéficient des financements des projets ANR AQUATHERM mais aussi de l'ANR JCJC ECTOCLIM, de la région Nouvelle Aquitaine (projet AQUASTRESS) et du programme Sentinelles du Climat porté par l'association Cistude Nature.

J'ai également bénéficié de partenariats avec VenomWorld (centre de production de venin) et Zoodyssée (parc animalier) pour le maintien des animaux en captivité et les soins associés.

Contexte COVID – Crise sanitaire

La situation de crise sanitaire COVID a fortement perturbé le planning d'expérimentations de ma thèse en impactant lourdement la récolte des données. L'expérience la plus ambitieuse de mon projet doctoral impliquait la capture de serpents sur le terrain au printemps 2020, ce que la période de confinement a annulé. J'ai remplacé dans l'urgence ce projet par une autre expérimentation plus tardive, avec des effectifs réduits (terrain décalé dans des conditions climatiques non favorables), dans des conditions dégradées et sans le soutien logistique habituel (difficultés d'accueillir des stagiaires, difficulté de s'approvisionner auprès des fournisseurs etc.). Ce contexte a également limité les opportunités pour communiquer sur mes recherches au sein de congrès scientifiques et plus généralement la planification de mes différentes activités de laboratoire.

Je remercie Sorbonne Université de m'avoir accordé un soutien remarquable en m'accordant une prolongation de 4 mois pour compenser le retard associé à ces difficultés.

Publications scientifiques

Ce manuscrit est basé sur la liste de publications suivante. Les articles sont identifiés dans le manuscrit sous la forme « **Article 1** » en gras. Les résultats des analyses de la dernière expérimentation réalisée sont également présentés de manière synthétique en français (**Expérimentation 5**) faute de temps pour rédiger un premier manuscrit complet.

Article 1 – **Dezetter, M.**, Dupoué, A., Le Galliard, J. F., & Lourdais, O. (2021). Additive effects of developmental acclimation and physiological syndromes on lifetime metabolic and water loss rates of a dry-skinned ectotherm. *Functional Ecology*. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13951>

Article 2 – **Dezetter, M.**, Le Galliard, J.F., Leroux-Coyau, M., Brischoux, F., Angelier, F., & Lourdais, O. Two stressors are worse than one: combined heatwave and drought affect hydration state and glucocorticoid levels in a temperate ectotherm. *Under review in Journal of Experimental Biology*.

Article 3 – **Dezetter, M.**, Le Galliard, J.F., & Lourdais, O. « Give me shelter »: microclimate selection mitigates the physiological costs of drought in a terrestrial ectotherm. *In preparation for Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.

Article 4 – **Dezetter, M.**, Le Galliard, J. F., Guiller, G., Guillon, M., Leroux-Coyau, M., Meylan, S., Brischoux, F., Angelier, F, & Lourdais, O. (2021). Water deprivation compromises maternal physiology and reproductive success in a cold and wet adapted snake *Vipera berus*. *Conservation physiology*, 9(1), coab071, <https://doi.org/10.1093/conphys/coab071>

Expérimentation 5 – Effets des contraintes hydriques pré et postnatales sur la morphologie et la croissance de nouveau-nés *Vipera berus*.

Communications scientifiques et vulgarisation



"Mathias Dezetter: Physiological responses to increasing temperature combine energy and water balance in a long-lived snake"; Publication d'un article sur le site de vulgarisation scientifique du journal *Functional Ecology*, 13 décembre 2021, en lien avec l'[Article 1](https://functionalecologists.com/2021/12/13/mathias-dezetter-physiological-responses-to-increasing-temperature-combine-energy-and-water-balance-in-a-long-lived-snake/) : <https://functionalecologists.com/2021/12/13/mathias-dezetter-physiological-responses-to-increasing-temperature-combine-energy-and-water-balance-in-a-long-lived-snake/>

" Comprendre les effets combinés des canicules et sécheresses sur les vipères : une nécessité pour orienter les mesures de conservation de ces espèces en France. " **Dezetter, M., Le Galliard, J.F., & Lourdais, O. - 12ème rencontres nationales sur la conservation des amphibiens et des reptiles – Société Herpétologique de France – Festival International du Film Ornithologique de Ménigoute – 29 octobre 2021.**

" Importance des paysages de bocage pour les reptiles et amphibiens " **Dezetter, M., Lourdais, O., Boissinot, A., Guiller, G., Gauffre, B., Besnard, A., Morin, S. – Fête du bio, Chizé – 7 septembre 2019**

" Biodiversité de la mare et mesures de gestions associées " **Dezetter, M. – Fête de la science CEBC – 5 et 6 octobre 2018 – stand interactif pendant 2 jours (500 scolaires et grand public)**

Formation doctorale

Formation expérimentation faune sauvage : Formation à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage non-hébergée à des fins scientifiques. Niveau Concepteur. Dispensée par le Muséum National d'Histoire Naturelle. Formation théorique au MNHN, formation pratique au CEBC sur chéloniens.

Formation par tutorat à la contention de vipères et à la réalisation de prises de sang par cardiocentèse, formation pratique au CEBC par Olivier Lourdais.

Formation intégrité scientifique dans les métiers de la recherche. Université de Bordeaux MOOC.

Modules techniques et professionnels. Membre du CA de l'association Nature Conserv'Action. Réalisations d'expositions photographiques de vulgarisation scientifique ; Participation à des événements de communication (Festival International du Film Ornithologique de Ménagoutte ; Congrès Mondial de la Nature UICN Marseille 2021) ; Coréalisation de documentaires de vulgarisation scientifique ; Organisation d'une mission de terrain de 1 mois (Octobre 2019) – inventaires participatifs de reptiles et amphibiens au sein de concessions de conservation gérées par des communautés locales en Amazonie Péruvienne.

Encadrement d'étudiants

Au cours de ma thèse, j'ai assuré l'encadrement de trois étudiantes qui ont activement contribué à la réalisation de mes expérimentations.

Etudiants			Contributions
Annelise Roustaing	Master 1	Université de Brest	Article 4
Romane Schaeffer	Master 1	Sorbonne Université	Article 4
Aésane Meric	Master 1	Université de Perpignan	Expérimentation 5

J'ai également participé activement au co-encadrement d'étudiants dans le cadre de projets annexes à ma thèse (voir section "collaborations et projets annexes").

Etudiants			Encadrement
Nicolas Proust	Master 2	Université de Poitiers	Olivier Lourdais
Cassandra Treyvaud	Master 1	Université Paris-Saclay	Olivier Lourdais
Théo Doiteau	Master 2	Université d'Angers	Olivier Lourdais ; Sophie Morin
Arnaud Geysels	Master 1	Université Catholique de Louvain	Olivier Lourdais ; Inês Freitas

Enseignement

Soutien ponctuel au **TP** organisé par Coraline Bichet pour une promotion d'étudiants **L3 Biologie – Université La Rochelle - 25 mars 2021** – Présentation de mes travaux de thèse et formation pratique aux méthodes de suivi de lézards (*Podarcis muralis*) en nature sur le site du CEBC.

Collaborations et projets annexes

Effets des contraintes thermiques et hydriques pendant la reproduction du lézard vivipare *Zootoca vivipara*

Appui aux projets de Georges Bruschi, Rodrigo Gavira, supervisé par Olivier Lourdais et Jean-François Le Galliard, ANR AQUATHERM. Soutien à l'acquisition de données et au suivi des animaux en élevage.

Réponses aux contraintes hydriques pendant la reproduction chez *Vipera aspis*, *Vipera latastei* et leur hybride

Collaboration scientifique et conception du design expérimental, acquisition de données et réalisation de protocoles. Collaboration avec Inês Freitas et Arnaud Geysseles, projet supervisé par Olivier Lourdais et Fernando Martínez-Freiría.

Adaptations physiologiques et comportementales aux contraintes hydriques chez 3 espèces de rainette (*Hyla sp*)

Collaboration avec Nicolas Proust, Michaël Guillon et Olivier Lourdais, projet AQUASTRESS. Collaboration scientifique et soutien technique aux captures sur le terrain et à l'acquisition de données expérimentales.

Influence de la structure des haies et des conditions microclimatiques sur les reptiles

Collaboration scientifique et soutien technique à la réalisation du terrain sur le camp militaire d'Avon. Collaboration avec Théo Doiteau, Sophie Morin, Aurélien Besnard et Olivier Lourdais, projet AQUASTRESS.

Déterminants des patrons de colorations aposématiques chez la vipère aspic : étude du lien avec la thermorégulation le long d'un gradient altitudinal

Réalisation d'une expérience annexe en collaboration avec Fernando Martínez-Freiría, collaborations sur le traitement de données avec Cassandre Treyvaud et Michaël Guillon. Projet supervisé par Olivier Lourdais.

Participation active à la Structure chargée du Bien Être Animal du CEBC

Participations aux réunions, raffinement du bien-être animal, organisation logistique au bénéfice de l'unité de recherche et établissement utilisateur. En collaboration avec Olivier Lourdais, Bruno Michaud (Responsable SCBEA) et Laurie Berthomieu (vétérinaire référent).

Sommaire

Préface	3
Sommaire	14
Introduction	17
1. Un climat qui change	19
1.1 Temporalité des changements climatiques	19
1.2 Du macro au microclimat	21
1.3 Des changements combinés et des stressseurs multiples	23
2. L'organisme face au climat : apport de l'écophysiologie	23
2.1 Les réponses physiologiques : maintenir l'homéostasie	25
2.2 Les réponses comportementales : s'ajuster rapidement	27
2.3 Contraintes reproductrices et compromis d'allocation des ressources	28
3. Les ectothermes face aux changements climatiques	30
3.1 Ecologie thermique	30
3.2 Thermo-hydrorégulation et contraintes hydriques	34
3.3 Les contraintes thermiques et hydriques de la reproduction	38
4. Hypothèses et objectifs de la thèse	40
Matériels & Méthodes	43
1. Modèles d'études	45
1.1 Les vipères péliades et aspic, deux ectothermes terrestres vivipares	45
1.2 Maintien en captivité permanente ou transitoire	51
2. Manipuler les conditions climatiques	52
2.1 Contrôler les cycles thermiques et hydriques grâce aux enceintes climatiques	52
2.2 Manipuler les conditions sur le long terme	54
2.3 Simuler des évènements extrêmes	54
3. Manipuler les conditions microclimatiques	55
3.1 Contrôler le microclimat thermique	55
3.2 Contrôler le microclimat hydrique	55
4. Comprendre les réponses physiologiques	56
4.1 Quantifier le métabolisme et les pertes hydriques	56
4.2 Les paramètres sanguins et hormonaux	59
4.3 La morphologie et l'état des réserves	61
5. Comprendre les réponses comportementales	62
5.1 Utilisation des microclimats	62
5.2 Comportement de boisson	63
6. Comprendre les effets sur la reproduction	64
6.1 Suivi de la reproduction et du développement embryonnaire	64
6.2 Suivi du développement postnatal	65
7. Synthèse des expérimentations	67
7.1 Paramètres manipulés et des données récoltées.....	68
7.2 Plans expérimentaux par projets	69

Résultats	71
Chapitre I - Effets à long-terme des conditions thermiques et co-variations entre régulation thermique et hydrique	73
I.1 Résumé du chapitre	75
I.2 Article 1	79
Chapitre II - Effets à court terme des contraintes thermiques et hydriques sur l'organisme	103
II.1 Résumé du chapitre	105
II.2 Article 2	109
II.3 Article 3	131
Chapitre III - Effets des contraintes hydriques pendant la reproduction ..	153
III.1 Résumé du chapitre	155
III.2 Article 4	159
III.3 Expérimentation 5	183
Discussion et perspectives	193
Synthèse des apports de la thèse	195
1. Influence des contraintes abiotiques sur la physiologie	197
a) Réponses à long-terme et co-variation entre les traits	197
b) Effets combinés des conditions thermiques et hydriques	199
c) Mécanismes proximaux impliqués	200
2. Le rôle du comportement face aux contraintes hydriques	204
a) Le comportement comme intégrateur de l'état d'hydratation	204
b) Atténuation comportementale des coûts physiologiques	207
c) L'hétérogénéité microclimatique: implications pour la conservation	211
3. Sensibilité hydrique de la reproduction	213
a) Effets sur la physiologie maternelle et les compromis d'allocation	213
b) Effets sur le développement pré et postnatal	215
Conclusion	218
Bibliographie	219

Introduction



Vipère péliade gestante dans un paysage de landes pendant une période de sécheresse

© Mathias Dezetter, Olivier Lourdais

1. Un climat qui change

Le changement climatique d'origine anthropique menace d'accélérer et d'aggraver le déclin massif de la biodiversité déjà en cours à cause de la dégradation des habitats, de la surexploitation ou de la présence d'espèces envahissantes (Dirzo et al., 2014; Urban, 2015). Comprendre les mécanismes à l'origine de la vulnérabilité climatique des espèces constitue un enjeu majeur en écologie évolutive (Chapman et al., 2014; Pacifici et al., 2015). Des avancées récentes dans l'étude du climat permettent aux études écologiques de considérer la complexité des scénarios de changement climatique à la fois dans leur temporalité, leur échelle spatiale et la multiplicité des stressors impliqués.

1.1 Temporalité des changements climatiques

Depuis le milieu du 20^{ième} siècle, le changement climatique s'accélère, les températures moyennes augmentent et la dernière décennie (2010-2020) est la plus chaude jamais enregistrée dans le passé récent (IPCC, 2021). Le changement climatique ne se réduit pas à la seule augmentation des températures moyennes, mais conduit également à l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des événements climatiques extrêmes telles que les canicules, sécheresses, ouragans ou inondations (Bador et al., 2017; Cook et al., 2014; Rahmstorf & Coumou, 2011; Stillman, 2019). Le changement climatique induit donc à la fois des variations des conditions moyennes sur le long terme (i.e. patron global d'augmentation moyenne des températures) et des changements des variations à court-terme (i.e. exposition à des températures extrêmes sur des pas de temps court de l'ordre de la journée ou de la semaine, **Figure 1**). Le changement climatique induit également des modifications des cycles thermiques journaliers. Ainsi, l'augmentation des températures est plus marquée au cours des périodes nocturnes (Davy et al., 2017; Speights et al., 2017), et le réchauffement du climat expose les organismes à des modifications de la variance journalière des températures (Bozinovic et al., 2011; Colinet et al., 2015).

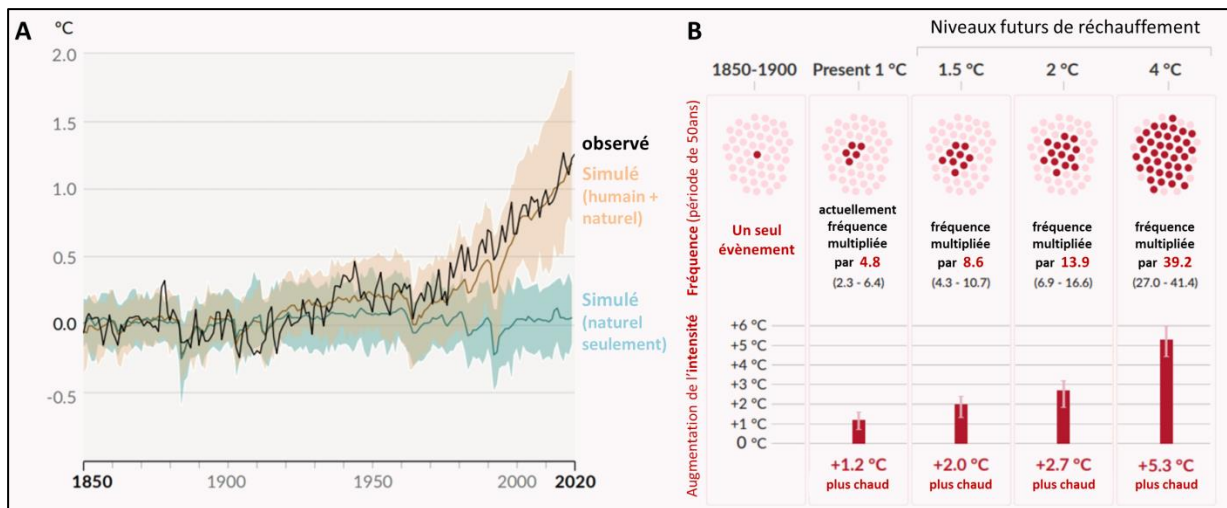


Figure 1 : (A) Evolution de la température moyenne globale au cours du temps et (B) augmentation de la fréquence et de l'intensité des événements extrêmes thermiques en fonction des scénarios de changement climatique ; modifié d'après IPCC, 2021.

Alors que l'étude des réponses écologiques au changement climatique s'est principalement concentrée sur les effets des variations à long-terme de la température (Chapman et al., 2014; Jones et al., 2016), les récents progrès de la modélisation des événements extrêmes (Chen et al., 2018; Perkins-Kirkpatrick & Gibson, 2017) et une meilleure compréhension des liens entre climat et vulnérabilité des organismes permettent d'étudier plus précisément les réponses des organismes à des variations climatiques à court-terme (Ummenhofer & Meehl, 2017). Un nombre croissant d'études considèrent désormais les effets des événements extrêmes sur les réponses écologiques et évolutives au changement climatique (Buckley & Huey, 2016; Kingsolver et al., 2021; Kingsolver & Buckley, 2017; Maxwell et al., 2019). Elles indiquent des effets négatifs majeurs de ces variations climatiques sur la biodiversité (Figure 2 ; Harris et al., 2018; Maxwell et al., 2019), conduisant à des événements de mortalité massive, au déclin de certaines populations voir à des modifications profondes des écosystèmes (DuBose et al., 2019; Pruvot et al., 2019).

Déterminer la vulnérabilité climatique des espèces et prédire les réponses écologiques et évolutives au changement climatique nécessite donc d'anticiper à la fois les effets des variations à long-terme (augmentation des températures moyennes) et ceux à court-terme, notamment la variabilité journalière et les événements extrêmes (Boucek et al., 2017; Fussler & Klein, 2006; Pacifici et al., 2015; Sanz-Lazaro, 2019).

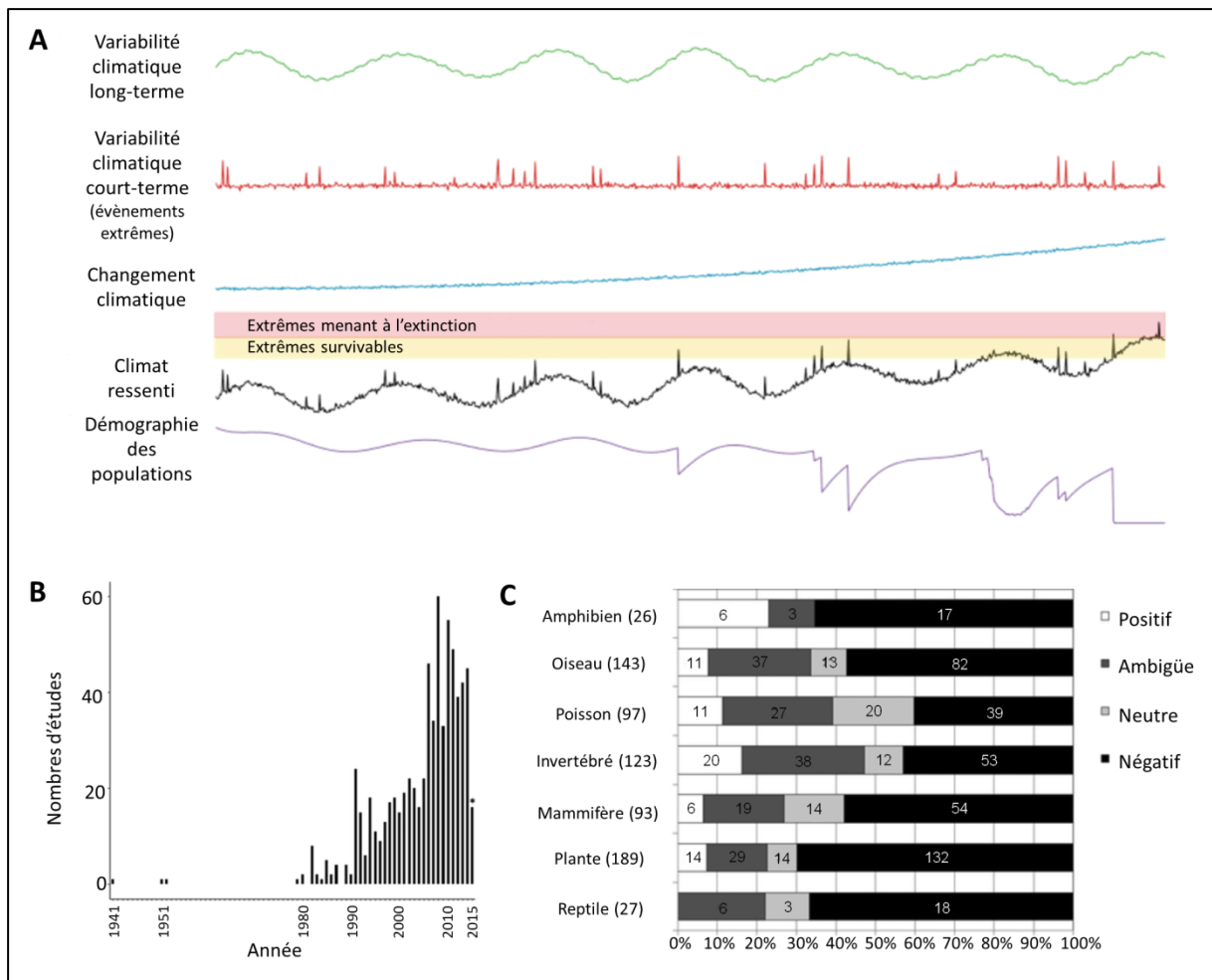


Figure 2 : (A) Cadre conceptuel sur la temporalité des changements climatiques ; modifié d'après Harris et al., 2018. Les effets du climat sur une population dépendent à la fois du changement climatique moyen et de l'occurrence d'évènements extrêmes délétères. (B) Nombre d'études écologiques testant des réponses aux évènements climatiques extrêmes au cours du temps (1941-2015), et (C) nature des effets observés sur la démographie dans ces études par groupe taxonomique ; modifié d'après Maxwell et al., 2019

1.2 Du macro au microclimat

L'étude du changement climatique s'est historiquement appuyée sur des modélisations à l'échelle « globale » (GCM pour Global Climate Models) mais tend désormais à prédire les changements à plus fine échelle à l'aide de modèles régionaux (RCM pour Regional Climate Models) dont la fiabilité progresse très rapidement (Hazeleger et al., 2015; Rummukainen, 2010; Xie et al., 2015). Les études des réponses écologiques au changement climatique utilisent généralement ces modèles pour prédire les réponses des organismes (Chown & Gaston, 2016; Potter et al., 2013; Sunday et al., 2014).

Cependant, il existe un décalage entre le climat prédit par ces modèles à large échelle régionale, et le climat à fine échelle auquel sont réellement exposés les organismes (Potter et al., 2013a). Au cours de leur cycle de vie, les organismes sont exposés à des microclimats qui dépendent de la structure des paysages, des habitats et micro-habitats (Pincebourde et al., 2016a; Sears et al., 2016, 2011). Ainsi, la structure et la complexité des microclimats (**Figure 3**), et la capacité des organismes à ajuster leur comportement pour s’y déplacer jouent un rôle déterminant dans la réponse des organismes au changement climatique (Pincebourde et al., 2016; Pincebourde & Woods, 2020; Woods et al., 2015). En considérant ces paramètres de microclimats à une échelle adaptée aux organismes (Maclean, 2020; Pincebourde & Woods, 2020), il est possible de modéliser de manière plus précise et fiable les effets des changements climatiques sur les organismes (Kearney et al., 2014; Lembrechts et al., 2019; Riddell et al., 2021; Suggitt et al., 2018).

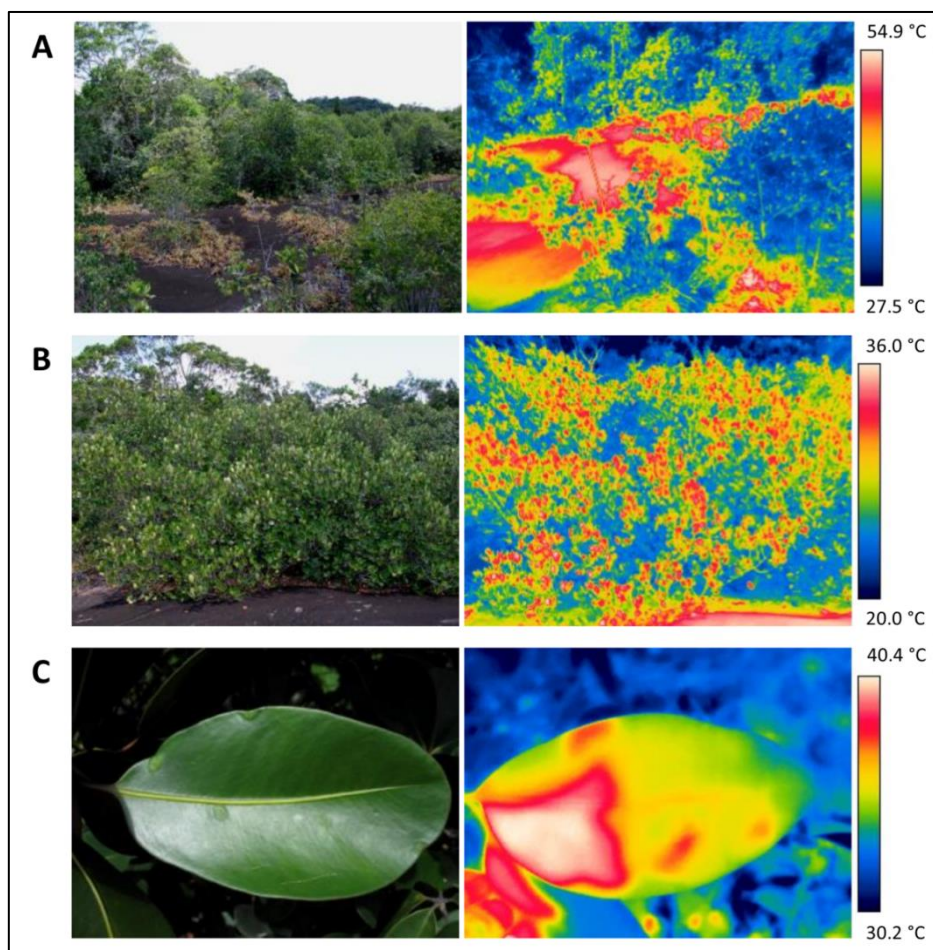


Figure 3 : Variabilité spatiale des microclimats thermiques (température de surface) à l’échelle de l’habitat depuis le paysage jusqu’à la feuille. Ces variations ont des impacts majeurs sur la biologie des insectes ectothermes qui vivent sur le feuillage des plantes. (A) Paysage d’inselberg en Guyane Française ; (B) Massif de *Clusia sp* ; (C) Feuille de *Clusia sp*. Modifié d’après Pincebourde 2019.

1.3 Des changements combinés et des stressseurs multiples

La plupart des recherches étudiant les effets du changement climatique sur les organismes se sont focalisées sur les conséquences biologiques et écologiques de la température. Or, le changement climatique induit également des variations multiples, par exemple des précipitations (Cook et al., 2014; Dai, 2011) ou des propriétés physiques et chimiques du milieu (Poloczanska et al., 2016). Ces facteurs multiples du changement climatique peuvent interagir avec d'autres stressseurs d'origine anthropique comme la perte d'habitats, les contaminations chimiques ou la présence d'espèces invasives (Choi et al., 2019; Mainka & Howard, 2010; Nikinmaa, 2013). Il est notamment clair que les changements des températures et des précipitations co-varient (Hao et al., 2019; Liu et al., 2009) et induisent des contraintes conjointes, en particulier lors des épisodes de canicules et de sécheresses combinées (Trenberth et al., 2014; Ummenhofer & Meehl, 2017). Les pertes d'habitats liés aux changements d'usage des terres peuvent également modifier la structure des habitats et des microclimats, influençant les réponses des organismes à ces événements extrêmes (Choi et al., 2019; Gorissen et al., 2017; Mollinari et al., 2019; Seabrook et al., 2011). Comprendre les réponses des organismes aux changements climatiques nécessite donc de considérer les effets de stressseurs combinés, en utilisant une approche « multi-stress » (Gunderson et al., 2016; Hewitt et al., 2016).

2. L'organisme face au climat : apport de l'écophysiologie

En biologie, l'écophysiologie s'intéresse, à l'échelle de l'individu, à déterminer les mécanismes proximaux (neurosensoriels, physiologiques, comportementaux) des réponses des organismes aux conditions environnementales, et à leurs implications en terme de valeur sélective (performances, survie et reproduction). Cette discipline à la frontière entre écologie et physiologie est pertinente pour prédire la vulnérabilité climatique des espèces (**Figure 4**), car les réponses à l'échelle individuelle déterminent en grande partie l'exposition, la sensibilité et les capacités d'adaptation des espèces au changement climatique (Williams et al., 2008).

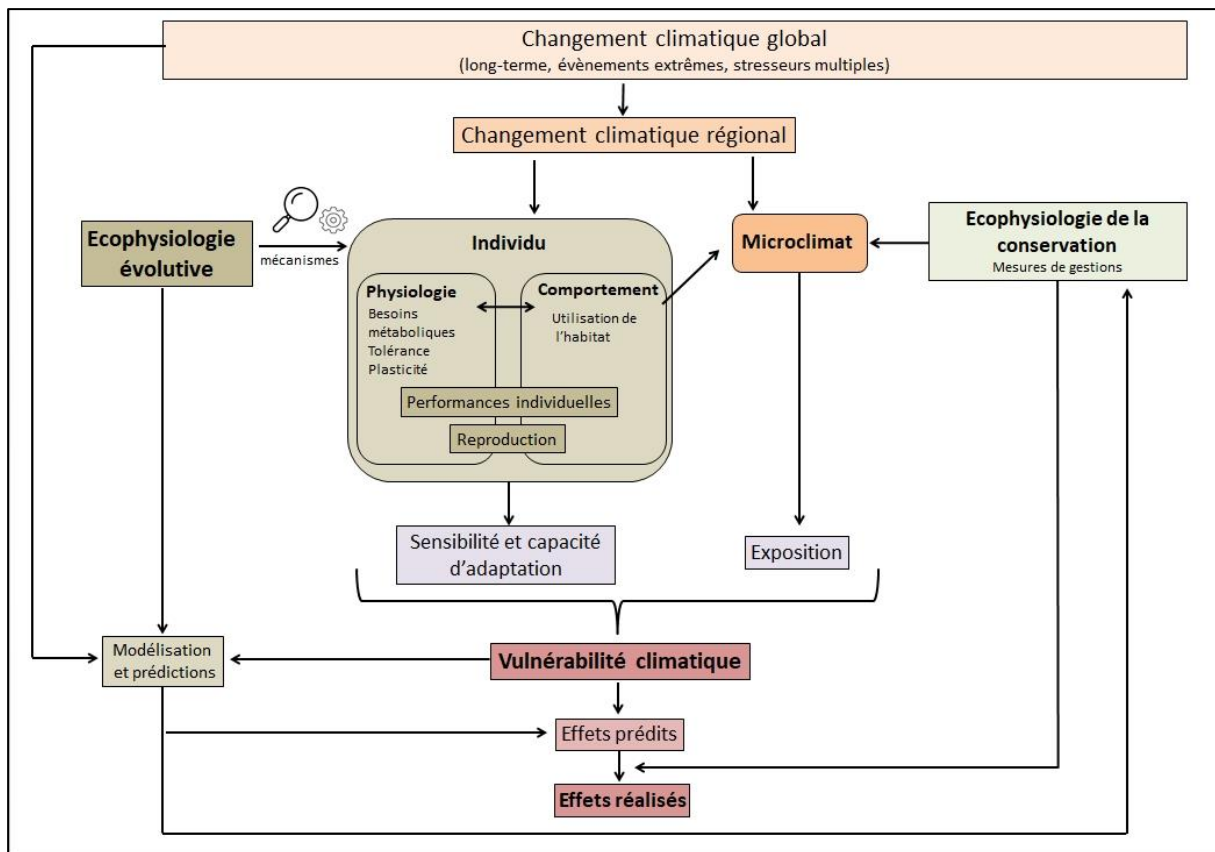


Figure 4 : Apport de l'écophysiologie pour déterminer la vulnérabilité climatique. Cadre conceptuel inspiré de Williams et al., 2008.

Le maintien de l'homéostasie, l'ensemble des paramètres physiologiques essentiels à la vie, est notamment déterminant pour les performances individuelles et la valeur sélective (McEwen & Wingfield, 2010). Ces paramètres évoluent au cours du cycle de vie, en fonction des contraintes et besoins spécifiques associés à chaque stade de vie (e.g. pendant la reproduction). L'allostase se réfère aux ajustements physiologiques et comportementaux qui permettent le maintien de ces paramètres en réponses aux changements environnementaux prévisibles et imprévisibles (McEwen & Wingfield, 2010; Wingfield, 2013; Wingfield et al., 2011).

En réponses aux changements environnementaux, le phénotype d'un individu peut être « plastique » et changer au cours de la vie, indépendamment de changements du génotype. La plasticité phénotypique (e.g. morphologie, physiologie, comportement) est classiquement scindée en deux catégories :

- La plasticité développementale, lorsque le phénotype est induit de manière généralement irréversible par l'environnement au cours du développement (vie embryonnaire et juvénile) (Careau et al., 2014a; Sultan, 2017; West-Eberhard, 2003) ;

- La flexibilité phénotypique, lorsque le phénotype s'ajuste réversiblement à des changements environnementaux sur de courtes échelles de temps (Piersma & Drent, 2003; Piersma & Gils, 2011).

Ces deux mécanismes interagissent et partagent des mécanismes proximaux communs (Beaman et al., 2016; Brakefield et al., 2007). A l'échelle de l'organisme, les réponses aux variations environnementales s'opèrent sur différents pas de temps en fonction qu'elles soient génétiques, de plasticité physiologique ou comportementale (**Figure 5**).

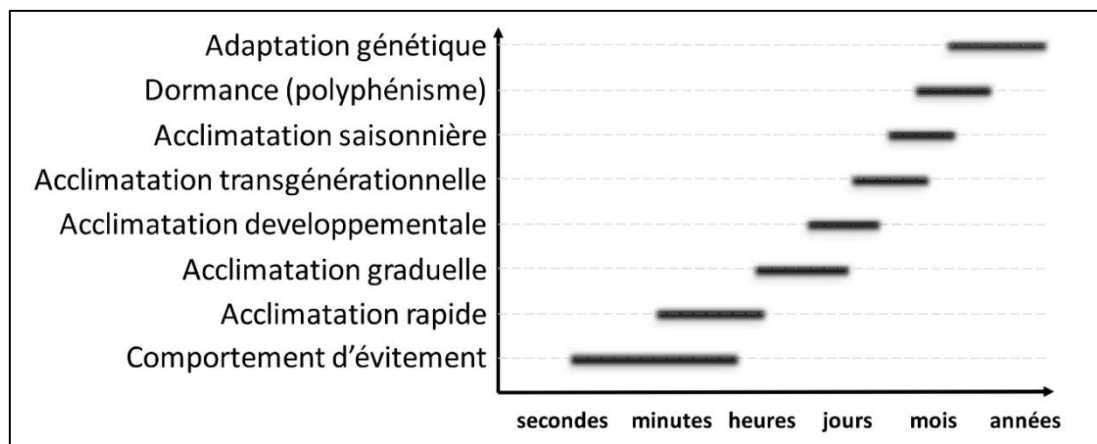


Figure 5 : Représentation des pas de temps de différentes réponses possibles aux contraintes climatiques chez des insectes. Des comportements d'évitement peuvent s'exprimer très rapidement (quelques secondes ou minutes), suivies par des réponses d'acclimatation physiologiques (réponse plastique de traits physiologiques en réponse à la variation environnementale) qui s'opèrent sur différents pas de temps, suivies par l'adaptation génétique. D'après Colinet HDR (2019)

2.1 Les réponses physiologiques : maintenir l'homéostasie

A l'échelle de l'individu, la gamme de tolérance physiologique face aux conditions environnementales est déterminante pour la survie des organismes et le maintien des performances individuelles face au changement climatique (Bozinovic & Pörtner, 2015; Khaliq et al., 2017, 2014; McKechnie & Wolf, 2019).

L'exposition à un stressueur climatique peut en effet compromettre le maintien de l'homéostasie, et conduire à des dommages cellulaires, du stress oxydatif et *in fine* à des effets négatifs sur la survie, les performances individuelles et la reproduction (Costantini, 2008; Monaghan et al., 2014; Sokolova, 2013). Les effets des stressueurs sur la valeur sélective peuvent suivre des dynamiques linéaires, par effet de seuil ou par hormèse (**Figure 6**, voir Costantini et al., 2010).

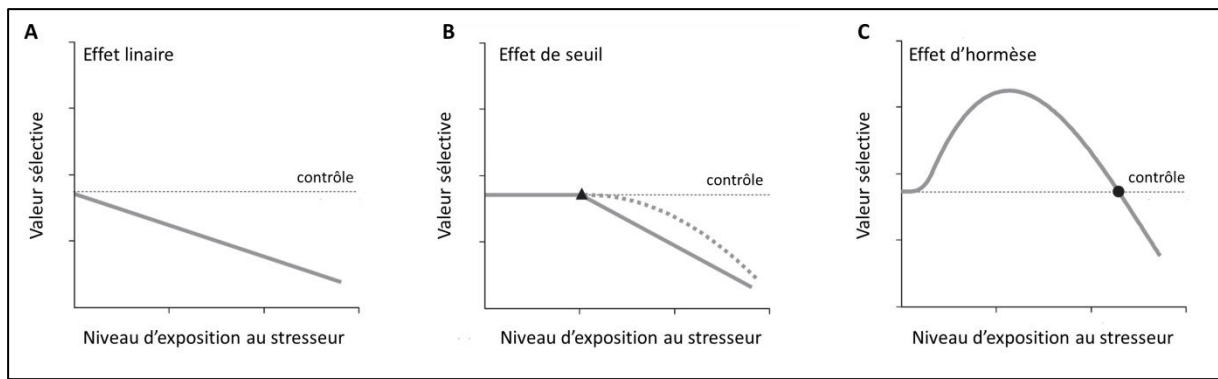


Figure 6 : Effets de l'exposition à un stressueur sur la valeur sélective. **(A)** Effet linéaire ; **(B)** Effet de seuil : aucun effet jusqu'au niveau de seuil (triangle) puis effet linéaire ou non-linéaire (e.g. effets de températures supérieures aux tolérances thermiques d'un organisme (*CT_{max}*) ; Kingsolver et al., 2013); **(C)** Effet d'hormèse avec effets positifs à de faibles degrés d'exposition et effets négatifs à de forts niveaux d'expositions (e.g. effets positifs d'une vague de chaleur modérée sur *Drosophila*, mais effets négatifs d'une vague de chaleur extrême ; voir Sørensen et al., 2008). Modifié d'après Costantini et al., 2010.

En réponse au changement climatique, la plasticité physiologique peut permettre aux organismes de maintenir leur état physiologique dans leur gamme de tolérance (Fenollosa & Munné-Bosch, 2019; Fuller et al., 2010; Seebacher et al., 2015). Par exemple, la capacité des endothermes à ajuster les mécanismes de dissipation de la chaleur en réponses à des évènements thermiques extrêmes est cruciale pour leur survie dans un environnement fluctuant, comme pendant des canicules (Khaliq et al., 2014; McKechnie & Wolf, 2019). Ces processus impliquent des ajustements physiologiques flexibles à l'échelle de l'organisme et des tissus (métabolisme, système vasculaire ; Dawson, 1982; Robertshaw, 2006) et à l'échelle cellulaire (variations du transcriptome et protéome ; Mahat et al., 2016; Richter et al., 2010). De la même manière, des plantes exposées à des stressueurs climatiques (e.g. température, eau, CO₂) peuvent ajuster leur physiologie (ouverture des stomates, compositions des membranes cellulaires, défenses anti-oxydantes) en réponses à des signaux environnementaux (Fenollosa & Munné-Bosch, 2019). Cette capacité des organismes à « acclimater » leurs traits physiologiques aux variations climatiques est considérée comme déterminante face au changement climatique (Mayfield et al., 2013; Seebacher et al., 2015b; Somero, 2010).

Chez les animaux, les hormones jouent un rôle clef dans la médiation des réponses physiologiques aux variations climatiques en orchestrant la régulation des balances énergétiques ou hydriques et donc le maintien de l'homéostasie (Bruijn & Romero, 2018; McCormick & Bradshaw, 2006). C'est par exemple le cas des glucocorticoïdes chez les vertébrés (Bruijn & Romero, 2018; Wingfield et al., 2011). En effet, ces hormones

représentent un intermédiaire entre les variations environnementales et les ajustements physiologiques, leur sécrétion pendant des épisodes « stressants » influence les stratégies d'allocation de ressource et de dépenses énergétiques et assure une meilleure survie immédiate de l'organisme (DuRant et al., 2013; Wingfield, 2013; Wingfield & Sapolsky, 2003). Leur sur-sécrétion à long-terme peut cependant générer des changements chroniques aux effets négatifs sur les performances (Costantini et al., 2011). Ces médiateurs physiologiques peuvent également induire des réponses comportementales et modifier les stratégies d'histoire de vie à des moments clés du cycle de reproduction (Angelier & Wingfield, 2013; Kitaysky et al., 2001; Wingfield et al., 2011).

2.2 Les réponses comportementales : s'ajuster rapidement

Les organismes peuvent également limiter leur exposition aux variations climatiques via des ajustements comportementaux, et ainsi éviter les effets négatifs des stressseurs (Beever et al., 2017; Wong & Candolin, 2015).

A grande échelle spatiale, ils peuvent par exemple migrer ou disperser vers des habitats au climat plus favorable (Hickling et al., 2005; Saino et al., 2007; Wingfield et al., 2017). A plus petite échelle spatiale, les organismes peuvent éviter des conditions climatiques extrêmes en utilisant des microclimats plus frais et plus humides (Fuller et al., 2021), par exemple en réduisant leur activité et en utilisant des micro-habitats tels que des zones d'ombres (Mole et al., 2016; Pattinson & Smit, 2017) ou des terriers (Bulova, 2002; Tsunoda et al., 2018). Des changements dans les patrons temporels d'activité peuvent également limiter l'exposition aux stressseurs climatiques, un changement vers une activité nocturne par exemple peut limiter l'exposition aux pics de température journaliers chez un lézard (Levy et al., 2019). En réduisant l'exposition des organismes aux variations environnementales, les ajustements rapides du comportement sont par ailleurs susceptibles de limiter l'évolution des traits physiologiques et de leur plasticité, ce processus étant conceptualisé comme « l'effet Bogert » (Huey et al., 2015; Marais & Chown, 2008; Muñoz, 2021).

Déterminer la capacité des organismes à se déplacer et à utiliser les microclimats pour limiter leur exposition aux stressseurs climatiques est donc essentiel pour comprendre les réponses des organismes au changement climatique (Lembrechts et al., 2019; Pincebourde et al., 2016a; Potter et al., 2013b; Woods et al., 2015). Pour ce faire, il est également nécessaire de

déterminer dans quelle mesure ces ajustements comportementaux peuvent tamponner les effets du changement climatique et interagir avec les modifications physiologiques multidimensionnelles de l'organisme (Basson & Clusella-Trullas, 2015; Buchholz et al., 2019; Huey & Tewksbury, 2009; Kearney et al., 2009; Scheffers et al., 2014).

2.3 Contraintes reproductrices et compromis d'allocation des ressources

La reproduction est une phase clef du cycle de vie des organismes, déterminante pour la valeur sélective notamment par ses exigences énergétiques. Le développement embryonnaire et le début de la vie juvénile sont également des phases particulièrement sensibles aux conditions environnementales que ce soit chez les espèces vivipares, via des effets maternels, que chez les espèces ovipares (Sultan, 2017; West-Eberhard, 2003).

En fonction de leurs traits d'histoire de vie et face aux ressources variables et parfois limitantes dans l'environnement, les parents font face à des compromis d'allocation des ressources entre différentes fonctions physiologiques (e.g. croissance, maintenance, reproduction) propres et les besoins de leurs enfants (Ricklefs & Wikelski, 2002; Stearns, 1989; Zera & Harshman, 2003). La reproduction engendre ainsi des coûts (e.g. dépenses énergétiques, réduction de la survie, ré-allocation du temps vers des soins parentaux) à l'origine d'un compromis entre la reproduction en cours et les reproductions futures, la survie et longévité de l'individu (Stearns, 1989). Des compromis d'allocation des ressources intergénérationnels entre les parents et leur descendance existent également (Stearns, 1989). Le compromis entre le nombre de descendants et la qualité de leur phénotype par exemple, reflète des conflits physiologiques en lien avec l'effort reproducteur et les coûts parentaux associés (Ratikainen et al., 2018; Walker et al., 2007). Lorsque les ressources sont limitantes et face à des stressseurs climatiques, ces compromis peuvent conduire à une exacerbation des conflits parents-descendants (**Figure 7**) où l'allocation des ressources vers un des pôles induit un coût disproportionné sur la survie ou la reproduction des individus (Kölliker et al., 2015; Kölliker & Richner, 2001; Trivers, 1974). Ces conflits peuvent donc générer des pressions de sélection sur les modes de reproduction, l'effort reproducteur ou la fécondité optimale (Crespi & Semeniuk, 2004; Furness et al., 2015). Les conditions climatiques influencent ces conflits et les pressions de sélection associées, ce qui conduit à une sensibilité de la reproduction aux variations climatiques différente en fonction des modes de reproduction et traits d'histoire de vie associés (Coe & Rotenberry, 2003; Furness et al., 2015; Hope et al., 2021).

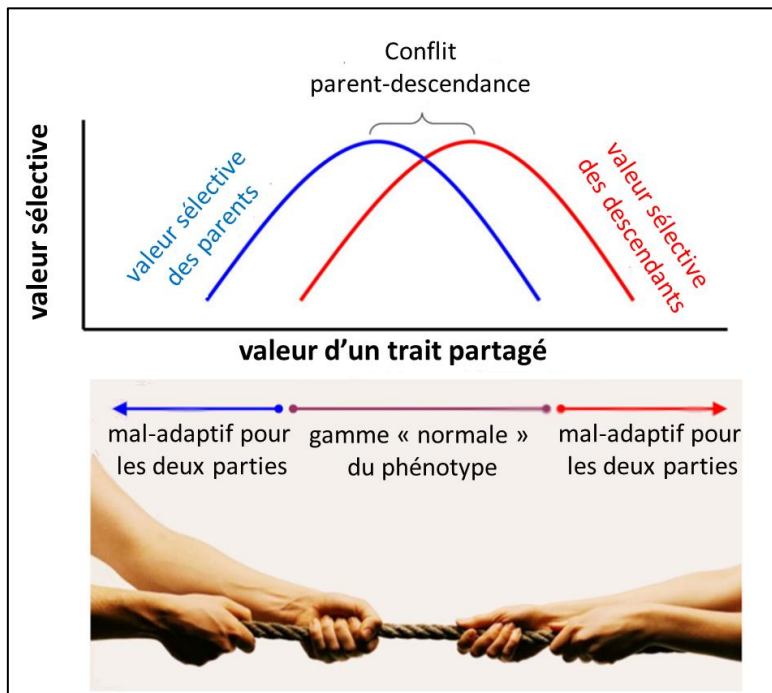


Figure 7 : Représentation schématique du concept de conflit parent-descendance. Les parents et la descendance présente des optimums de valeur sélective différents pour un trait partagé (e.g. taille ou masse des nouveau-nés à la naissance). Quand ces deux optimums sont à l'équilibre, le phénotype est dans une gamme « normale », tandis qu'une perturbation de cet équilibre (e.g. en réponse à un stresser ou une ressource limitante) conduit à des répercussions négatives sur la valeur sélective des individus. Modifié d'après Furness et al., 2015

Face à des événements climatiques extrêmes, les organismes peuvent moduler l'allocation des ressources pendant la reproduction, ils peuvent ainsi prioriser la survie et le développement des descendants au coût de leur survie et de leurs performances (Wingfield & Sapolsky, 2003), ou au contraire prioriser les reproductions futures au détriment de l'évènement reproducteur en cours (Martin & Mouton, 2020). Ces stratégies de reproduction sont déterminantes pour la capacité des populations à persister face au changement climatique : l'exposition à des stressers climatiques peut conduire à des échecs de reproduction et des effets négatifs sur la survie des parents et mener au déclin de populations (Amorim et al., 2015; Cruz-McDonnell & Wolf, 2016; McCowan & Griffith, 2021). L'environnement auquel les embryons et les nouveau-nés sont exposés peut également conduire à des influences parentales via des effets transgénérationnels sur le phénotype de la descendance ; le caractère adaptatif de ces effets semble contexte-dépendant (Perez & Lehner, 2019; Sánchez-Tójar et al., 2020; Schwanz et al., 2020; Uller, 2008).

3. Les ectothermes face aux changements climatiques

L'essentiel de la biodiversité animale est constitué d'espèces ectothermes (Wilson 1992). Alors que les endothermes maintiennent une température corporelle stable par des dépenses énergétiques basales élevées, les ectothermes sont caractérisées par une température corporelle dépendante des conditions microclimatiques qui entoure l'organisme et donc fluctuante, principalement en fonction des comportements de thermorégulation (Angilletta, 2009; Clarke & Pörtner, 2010). Ces organismes présentent de faibles dépenses énergétiques basales (i.e. métabolisme au repos ; 10 à 20 fois plus faible qu'un endotherme de masse équivalent ; Nagy, 2005; Pough, 1980) et utilisent des moyens essentiellement comportementaux mais aussi des ajustements de coloration ou physiologiques pour réguler leur température corporelle (Angilletta, 2009).

Du fait de leurs stratégies d'histoire de vie et de leur physiologie directement dépendante des conditions microclimatiques, les espèces ectothermes sont particulièrement sensibles au changement climatique (Rohr & Palmer, 2013; Vasseur et al., 2014).

3.1 Ecologie thermique

La température corporelle est un paramètre déterminant pour les performances et la valeur sélective, car elle influence directement la cinétique des réactions enzymatiques à la base du fonctionnement cellulaire (Hochachka & Somero, 2002; Kingsolver, 2015). Chez un organisme ectotherme, cette relation avec la température (**Figure 8**) se traduit au niveau des performances physiologiques par une accélération des performances puis un net recul, l'existence d'une valeur maximale pour une température optimale et des limites critiques (CTmin et CTmax) au-delà desquelles l'organisme subit un stress thermique et des dommages (Angilletta, 2009; Schulte et al., 2011; Singh et al., 2020). Un effet majeur de la température sur la physiologie des ectothermes est la dépendance thermique du métabolisme basal (Angilletta, 2009; Fangue et al., 2009; Holden et al., 2021; Schulte et al., 2011). Le métabolisme basal est un trait qui détermine les patrons d'utilisation de l'énergie à l'échelle de l'individu, il est ainsi lié aux traits d'histoire de vie et aux performances individuelles (Addo-Bediako et al., 2002; Clarke, 2006; Seebacher et al., 2015a). La norme de réaction métabolique présente une augmentation exponentielle caractéristique (**Figure 8**) avec la température (Schulte et al., 2011).

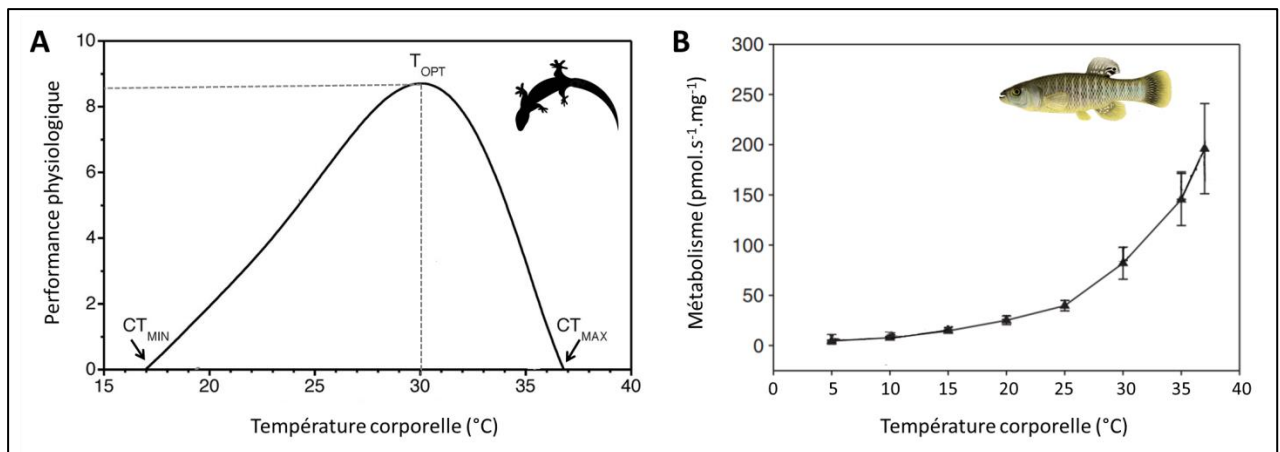


Figure 8 : (A) Représentation théorique des relations entre les performances physiologiques et la température corporelle (°C) chez les ectothermes ; modifié de Singh et al., 2020 (B) Norme de réaction exponentielle entre le métabolisme et la température corporelle, exemple chez *Fundulus heteroclitus*. Cette norme représente la partie croissante à gauche de la figure (A) ; modifié d'après Fangue et al., 2009.

La thermorégulation correspond à l'ensemble des mécanismes physiologiques et comportementaux à travers lesquels les organismes maintiennent leur température corporelle dans leur gamme de tolérance (CT min à CT max) et optimisent ainsi leurs performances physiologiques (T_{opt}). Chez les ectothermes, ces ajustements de thermorégulation sont principalement comportementaux (Angilletta, 2009). Les individus se déplacent ainsi dans leur habitat pour sélectionner des microclimats leur permettant d'atteindre leur température corporelle préférée (T_{pref}) et ajustent leurs postures (e.g. héliothermie ou thigmothermie) pour modifier les échanges thermiques avec l'environnement (par radiation, conduction ou convection) (Angilletta, 2009; Kearney et al., 2009; Koussoroplis et al., 2017; Woods et al., 2015). Un gradient de stratégies de thermorégulation existe (**Figure 9**), de la thermorégulation active parfaite (température corporelle optimale maintenue indépendamment de la température environnante) au thermoconformisme strict (température corporelle complètement dépendante de la température environnante). Ces stratégies dépendent aussi de comportements individuels variés et impliquent des compromis face aux multiples coûts de la thermorégulation, que ce soit des coûts liés à l'allocation de temps à la thermorégulation par rapport à d'autres comportements, ou des coûts induits par l'exposition aux prédateurs ou l'augmentation de la compétition intra-spécifique pendant la thermorégulation (Gvoždík, 2011; Kerr & Bull, 2006; Webb & Whiting, 2005). De nombreuses études ont démontré le potentiel de la thermorégulation comportementale à permettre un évitement rapide des températures extrêmes liées au changement climatique, et donc du stress thermique associée

(Hall et al., 2016; Huey & Tewksbury, 2009; Kearney et al., 2009; Moore et al., 2018; Pincebourde et al., 2016b; Woods et al., 2015).

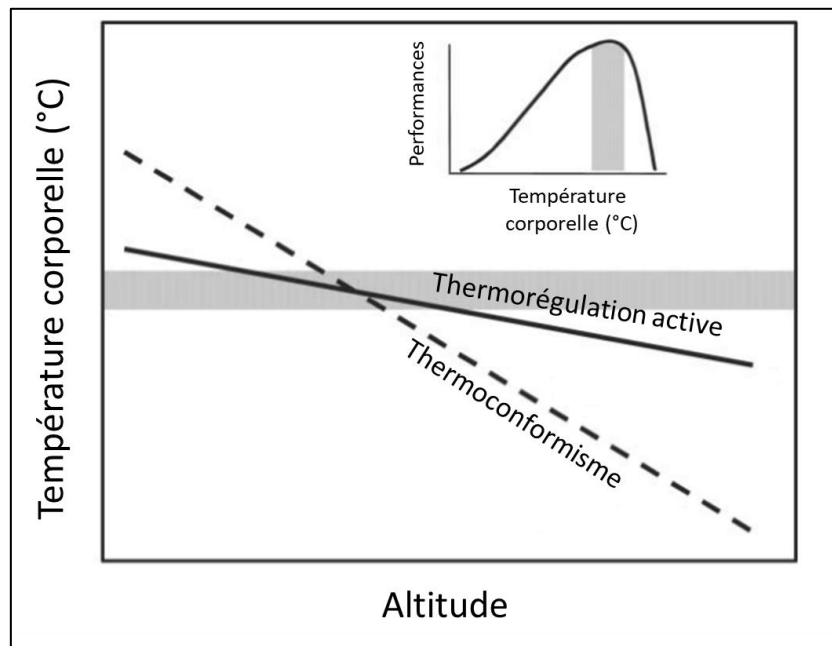


Figure 9 : Illustration théorique des modes de régulation comportementale en fonction d'un gradient environnemental (altitude). La section grise correspond à la gamme de température optimale (T_{opt}) pour les performances physiologiques. La droite entière la température corporelle d'un ectotherme avec une stratégie de thermorégulation active, la droite pointillée la température corporelle d'un ectotherme avec une stratégie de thermorégulation de thermoconformisme.

Lorsque l'évitement comportemental est restreint ou impossible (e.g. faibles capacités de déplacement ou homogénéité des microclimats disponibles), les individus sont directement exposés à la température environnante et leur température corporelle peut ainsi atteindre les limites de leur gamme de tolérance physiologique (**Figure 10**). Dans cette situation, différents ajustements physiologiques peuvent permettre aux organismes de tolérer, compenser ou limiter les effets du stress thermique (Colinet & Hoffmann, 2012; Gerken et al., 2015; Horowitz, 2001; Terblanche et al., 2006; Wang et al., 2009; Wilson & Franklin, 2002). Les organismes peuvent répondre aux variations des moyennes et de variabilité thermique (Bozinovic et al., 2013, 2011; Colinet et al., 2015; Drake et al., 2017; Noer et al., 2020) par des réponses d'acclimatation physiologique, notamment de leurs dépenses métaboliques basales (Auer et al., 2016; Berg et al., 2017; Pettersen et al., 2018; Sandblom et al., 2014; Tsuji, 1988; Xie et al., 2017). Par exemple, les taux métaboliques basaux peuvent être flexibles au cours des saisons en fonction des besoins et des ressources énergétiques dans l'environnement (Berg et al., 2017). Une réduction du métabolisme en réponse à des

températures saisonnières élevées peut notamment limiter les coûts de maintenance et le stress oxydatif (i.e. « compensation négative » ; Angilletta., 2009; Bruton et al., 2012; Costantini, 2008a; Norin et al., 2014). Ces réponses d'acclimatation sont généralement étudiées sur des pas de temps court, de l'ordre des semaines ou de quelques mois, et des incertitudes persistent sur la réversibilité de ces mécanismes et sur les influences de la plasticité développementales sur ces réponses d'acclimatation (Beaman et al., 2016; Ligon et al., 2012). Des études sur des pas de temps court ne permettent pas d'estimer les capacités d'acclimatation complètes qui sont encore peu connues (Kingsolver & Huey, 2008; Pörtner et al., 2017; Rohr et al., 2018).

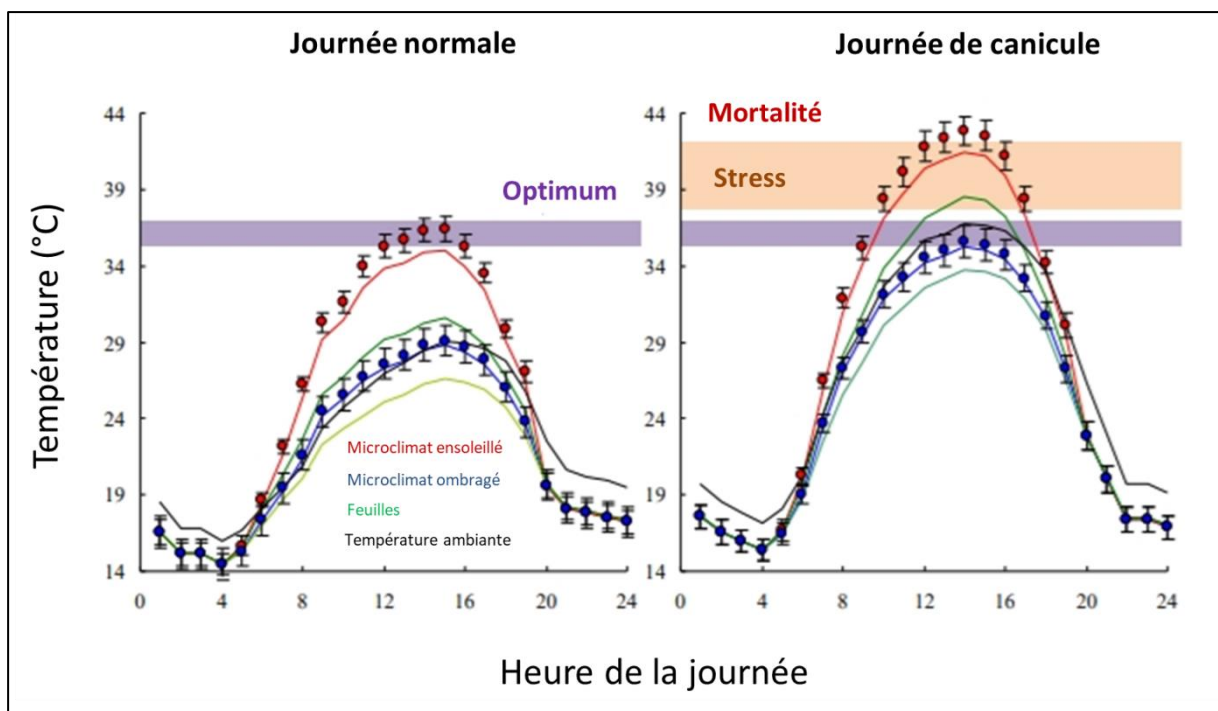


Figure 10 : Exemple de cycles thermiques journaliers dans différents micro-habitats (microclimat ensoleillé, microclimat ombragé, feuilles, température ambiante) au cours d'une journée normale ou d'une journée de canicule. Au cours d'une journée de canicule, certains microclimats peuvent exposer les ectothermes à des stress thermiques et mener à de la mortalité. Les effets de la température sur la physiologie dépendent donc à la fois des tolérances physiologiques, et des ajustements comportementaux liés à la sélection des microclimats ; modifié d'après Pincebourde HDR, 2019.

En réponse à des extrêmes thermiques, les organismes ectothermes peuvent aussi répondre sur des pas de temps plus court (heures ou journées) par des mécanismes à l'échelle cellulaire qui permettent de limiter les effets et les dommages liés au stress thermique : changement de transcriptome, synthèse de « protéines de choc thermique », défenses anti-oxydantes par exemple (Healy et al., 2010; Horowitz, 2001; Kingsolver et al., 2013; Kregel, 2002; Richter et al., 2010; P. M. Schulte et al., 2011). Ces réponses jouent aussi un rôle déterminant dans la

tolérance physiologique des ectothermes aux extrêmes thermiques en parallèle des changements comportementaux (Richter et al., 2010; P. M. Schulte et al., 2011).

Une bonne compréhension de ces réponses plastiques des ectothermes à la température permet de déterminer leur tolérance et leur capacité à s'acclimater aux variations climatiques, et à terme de persister assez longtemps pour que des processus évolutifs d'adaptation prennent place (Gunderson and Stillman, 2015; Morley et al., 2019; Seebacher et al., 2015b; Somero, 2010).

3.2 Thermo-hydrorégulation et contraintes hydriques

L'hydrorégulation en tant que telle, définie comme l'ensemble des processus de régulation physiologique et comportementale des flux hydriques entre l'organisme et son environnement, a été peu étudiée chez les ectothermes par rapport à la thermorégulation (Pirtle et al., 2019). Tout comme la température, l'eau est un paramètre essentiel au fonctionnement de l'organisme et pour les performances individuelles : c'est le solvant des réactions biochimiques à la base du fonctionnement cellulaire, et le fluide principal pour le transfert des nutriments et des hormones (Chaplin, 2006). Les ectothermes terrestres font face à des contraintes thermiques et hydriques combinées et des études récentes ont mis en évidence les mécanismes partagés et les compromis existant entre la régulation des balances thermiques et hydriques (Anderson et al., 2017; Riddell et al., 2019, 2018; Rozen-Rechels et al., 2020, 2019).

Le risque de déshydratation représente un coût de la thermorégulation : en utilisant des microclimats plus chauds, un thermorégulateur actif va également s'exposer à des conditions plus déshydratantes et potentiellement compromettre sa balance hydrique (Angilletta, 2009; Dupoué et al., 2015b; Ladyman & Bradshaw, 2003; Lourdais et al., 2017; Spotila, 1972). Cette augmentation des pertes hydriques peut conduire à une déshydratation qui compromet les performances individuelles et, chez certaines espèces, à un conflit entre le maintien de la température optimale et le maintien de la balance hydrique (Anderson & Andrade, 2017; Rozen-Rechels et al., 2019). Ainsi, l'état de déshydratation d'un individu peut influencer ses préférences thermiques (**Figure 11** ; Ladyman & Bradshaw, 2003; Pintor et al., 2016; Rozen-Rechels et al., 2020) et ses tolérances thermiques (Herrando-Pérez et al., 2020).

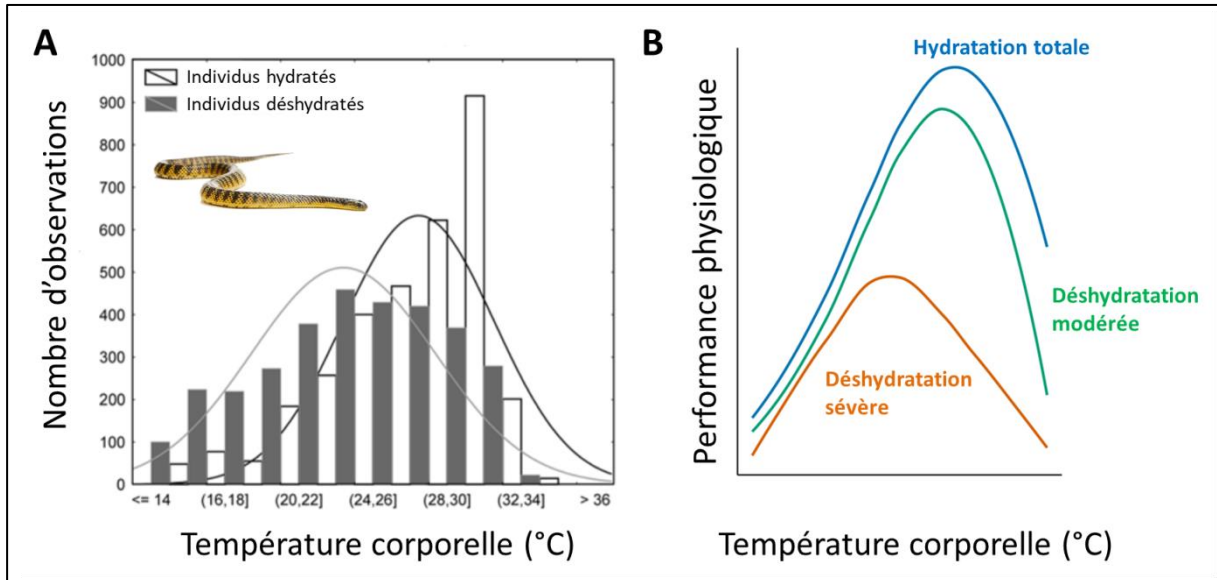


Figure 11 : (A) Températures corporelles de *Notechis scutatus* hydratés ou déshydraté. On constate un abaissement des températures corporelles lorsque les individus sont déshydratés ; modifié d’après Ladyman & Bradshaw, 2003 (B) Courbes des performances physiologiques théoriques en fonction de la température et de l’état d’hydratation individuel ; modifié d’après Rozen-Rechels et al., 2019.

Le risque de déshydratation associé à la thermorégulation active s’explique par des mécanismes proximaux impliquant les pertes hydriques de l’organisme. Les températures élevées sont généralement associées à des déficits de pression de vapeur d’eau élevés, à l’origine d’un gradient hydrique augmentant les pertes d’eau passives de l’organisme et réduisant la résistance cutanée aux pertes hydriques (Chown et al., 2011; Lourdais et al., 2017; Spotila & Berman, 1976). L’augmentation exponentielle du métabolisme et de la fréquence respiratoire avec la température induit aussi des pertes hydriques respiratoires plus élevées (Dupoué et al., 2015b; Riddell et al., 2018, 2017; Woods & Smith, 2010).

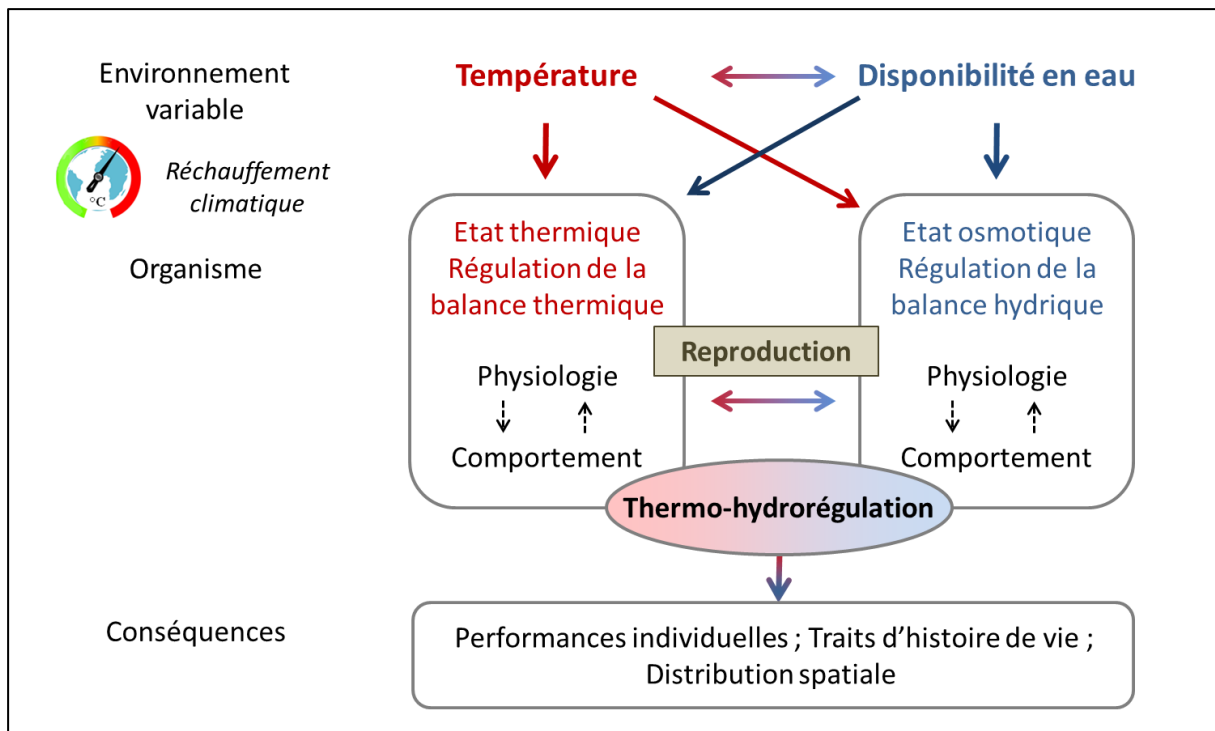


Figure 12: Cadre conceptuel de la thermo-hydrorégulation. Cette représentation illustre les interactions entre la régulation des balances thermique et hydrique à l'échelle de l'organisme. Modifié d'après Olivier Lourdais.

Récemment, le concept de thermo-hydrorégulation a été proposé par Rozen-Rechels et al. (2019) pour définir la régulation conjointe des balances hydriques et thermiques (**Figure 12**). Les mécanismes de réponses physiologiques et comportementaux historiquement réduits à la régulation thermique sont ainsi étendus à la régulation hydrique. Par exemple, la diminution du métabolisme après une acclimatation à des températures élevées réduit de manière conjointe les dépenses énergétiques et les pertes hydriques respiratoires (Riddell et al., 2019, 2018; Riddell & Sears, 2020). La sélection comportementale de microclimats peut également permettre de réduire l'exposition aux pertes hydriques tout en maintenant la température corporelle en dessous du seuil critique (Dupoué et al., 2017, 2015b; Lourdais et al., 2017).

Encore très peu d'effort de recherche a été consacré à l'étude de la thermo-hydrorégulation et des réponses des organismes aux stress thermiques et hydriques combinés (**Figure 13**, Herrando-Pérez et al., 2020 ; voir cependant les études récentes de Bruschi et al., 2020; Anderson et al., 2017; Padda et al., 2021). Alors que des patrons de co-variations entre certains traits physiologiques et comportementaux liés à la régulation thermique ont été mis en évidence (notion de syndromes ; Careau et al., 2019, 2008; Goulet et al., 2018, 2017; Mell

et al., 2016; Michelangeli et al., 2018), les co-variations entre les traits des régulations hydriques et thermiques restent à élucider.

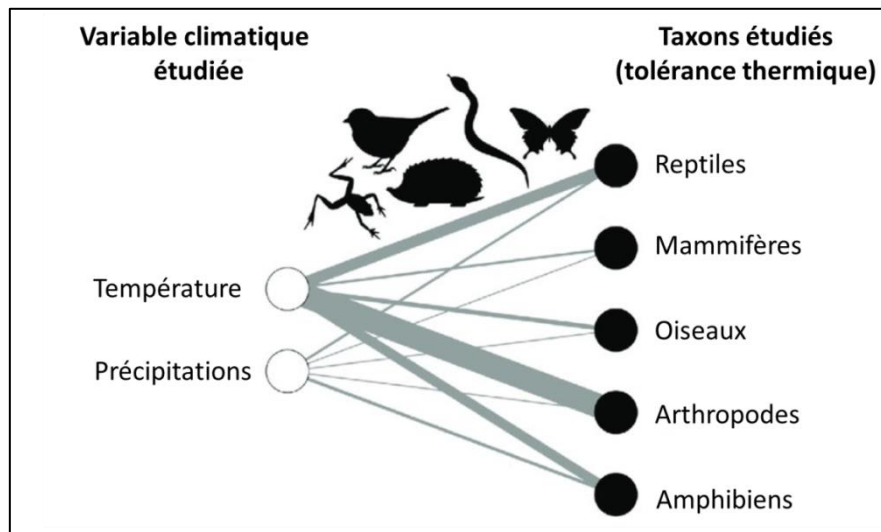


Figure 13 : Fréquences des corrélations étudiées dans la littérature entre les variables climatiques (température vs. précipitation), et la tolérance thermique de la faune terrestre (review générale de 64 papiers, 95 corrélations ; ligne la plus épaisse = 36 cas ; ligne la plus fine = 2 cas) ; modifié d'après Herrando-Pérez et al., 2020.

Des médiateurs physiologiques et hormonaux peuvent contribuer à la régulation de la balance hydrique (McCormick & Bradshaw, 2006). A l'interface entre l'organisme et l'environnement, la barrière cutanée joue un rôle majeur dans la régulation des pertes hydriques (Lahav & Dmi'El, 1996; Lillywhite, 2004; Miller & Lutterschmidt, 2014), et des mécanismes de plasticité via des modifications lipidiques en réponse aux contraintes hydriques ont été décrits chez des reptiles squamates (Agugliaro & Reinert, 2005; Hertz et al., 1979; Kobayashi et al., 1983; Spotila & Berman, 1976). L'organisme peut également réguler l'acquisition de l'eau du milieu extérieur, par exemple via le comportement de boisson (Capehart et al., 2016; Davis & Denardo, 2010; Lillywhite et al., 2015, 2008) ou l'alimentation (Lillywhite, 2017; Nagy, 1994). La production d'eau métabolique, par l'intermédiaire du catabolisme protéique et la mobilisation des réserves musculaires, peut aussi contribuer à la régulation de la balance hydrique (Brusch et al., 2018; Stier et al., 2017). Différentes stratégies d'hydrorégulation comportementale ont également été documentées (Rozen-Rechels et al., 2019; Wolcott & Wolcott, 2001) allant de la recherche d'eau sur de grandes distances (Wood et al., 2021) à la sélection de microclimats humides à fine échelle (Bulova, 2002; Forget-Klein & Green, 2021; Moore et al., 2018). Ces comportements d'hydrorégulation sont cependant généralement étudiés en lien avec la thermorégulation

comportementale et sans clairement séparer les effets thermiques et hydriques (Anderson & Andrade, 2017; Dupoué et al., 2015b; Ladyman & Bradshaw, 2003; Lourdais et al., 2017; Pintor et al., 2016). Les mécanismes de l'hydrorégulation comportementale restent donc à élucider indépendamment des contraintes et des compromis liés au thermique. La capacité de l'hydrorégulation comportementale à limiter la déshydratation et à maintenir l'homéostasie reste aussi à déterminer, aucune étude n'ayant explicitement et directement testé les rétroactions entre homéostasie et hydrorégulation comportementale (Pirtle et al., 2019).

3.3 Les contraintes thermiques et hydriques de la reproduction

Le développement des embryons induit des besoins thermiques spécifiques car la température d'incubation ou de gestation est déterminante pour la qualité du phénotype des descendants, la détermination de leur sexe, de leurs trajectoires individuelles et de leurs performances (Lorioux et al., 2013b; Matsumoto & Crews, 2012; Noble et al., 2018; Singh et al., 2020; Warner & Shine, 2008). La reproduction induit également des contraintes hydriques corrélées à l'effort reproducteur, c'est-à-dire un investissement en eau vers les œufs, ou vers les embryons au cours de la gestation pour assurer la croissance somatique (Dupoué et al., 2015a; Lourdais et al., 2017, 2015). L'environnement hydrique au cours du développement est également essentiel au succès de la reproduction (Capehart et al., 2016; Zani & Stein, 2018) et peut induire des effets transgénérationnels sur le phénotype des descendants, notamment des changements de la morphologie et du comportement (Marquis et al., 2008; Rozen-Rechels et al., 2018), de l'immunité (Brusch & DeNardo, 2019, 2017), voir même du sex-ratio secondaire (Dupoué et al., 2019). Ainsi, la sélection des sites de pontes, l'incubation ou le comportement des femelles gestantes peut assurer le maintien de la balance hydrique des embryons. Par exemple, certaines espèces ovipares de reptiles vont sélectionner des sites de pontes humides ou couvrir leurs œufs en adoptant des postures limitant les pertes hydriques (Brown & Shine, 2004; Stahlschmidt et al., 2011, 2008). D'autres espèces vivipares peuvent assurer des transferts en eau vers les embryons pendant la gestation tout en limitant leurs pertes hydriques en sélectionnant des micro-habitats humides (Dupoué et al., 2015a; Lourdais et al., 2017, 2015). La mobilisation de réserves musculaires, au détriment des performances de la femelle, peut également libérer de l'eau métabolique et assurer les besoins hydriques des embryons quand la ressource est limitante (Brusch et al., 2018). Ces besoins et contraintes spécifiques de la reproduction déplacent le curseur des compromis physiologiques et comportementaux entre thermorégulation et hydrorégulation.

Les modes de reproductions impliquent des stratégies différentes quant à la gestion des besoins hydriques et thermiques. La reproduction vivipare présente un avantage dans les climats froids où la thermorégulation active des femelles gestantes permet de compenser les opportunités thermiques réduites dans l'environnement (Foucart et al., 2018; Furness et al., 2015; Li et al., 2009). Cependant, ce mode de reproduction implique des contraintes hydriques additionnelles (transferts en eau vers les embryons) et une sensibilité supérieure de ces espèces aux contraintes hydriques pendant la reproduction (Dupoué et al., 2018a; Jara et al., 2019; Pincheira-Donoso et al., 2013). Ce mode de reproduction induit également davantage d'effets maternels sur la descendance (MacLeod et al., 2021). L'oviparité au contraire réduit les contraintes hydriques pour la mère et limiter le conflit parent-descendant lié à la ressource hydrique (Dupoué et al., 2020b, 2018a).

4. Hypothèses et objectifs de la thèse

L'objectif principal de ma thèse est d'examiner les compromis entre régulation de la balance thermique et de la balance hydrique à l'échelle de l'individu, et au cours de la reproduction. **Dans ce cadre, j'ai examiné trois hypothèses principales en relation avec les contraintes hydriques :**

Hypothèse 1- Les contraintes thermiques et hydriques devraient impacter de manière interactive la physiologie des individus et influencer les réponses plastiques face au changement climatique.

Hypothèse 2- Les individus peuvent ajuster leur comportement pour (a) limiter l'exposition aux contraintes hydriques ou bien, si l'évitement est impossible, (b) rapidement restaurer l'état physiologique de l'organisme après la période d'exposition.

Hypothèse 3- Les contraintes hydriques sont particulièrement fortes pendant la reproduction chez les espèces vivipares et peuvent impacter la physiologie maternelle, le succès reproducteur et le phénotype des descendants par des effets transgénérationnels.

Mes travaux portent sur deux espèces d'ectothermes terrestres vivipares, deux espèces de vipères européennes : la vipère péliade (*Vipera berus*) et la vipère aspic (*Vipera aspis*). Afin de répondre à ces objectifs, je me suis appuyé sur une approche expérimentale en manipulant les conditions thermiques et hydriques, et en quantifiant les réponses à l'échelle individuelle (morphologie, physiologie, comportement) et pendant la reproduction (physiologie maternelle, succès reproducteur, développement embryonnaire et phénotype des nouveau-nés). Ma thèse s'articule en 3 chapitres :

Chapitre I - Effets à long-terme des conditions thermiques et co-variations entre régulation thermique et hydrique [Article 1](#)

L'objectif de ce chapitre est double. Premièrement, comprendre les réponses d'acclimatation développementale aux conditions thermiques sur le long-terme et examiner leur flexibilité. Deuxièmement, identifier les patrons de co-variations à l'échelle individuelle entre deux traits majeurs de la régulation thermique et de la régulation hydrique : le métabolisme et les pertes

hydriques totales. Pour ce faire, j'ai travaillé sur un jeu de données issu d'une expérience à long terme sur des vipères aspics exposés à des climats contrastés.

Chapitre II - Effets à court terme des contraintes thermiques et hydriques sur l'organisme [Article 2](#) ; [Article 3](#)

L'objectif de ce chapitre est de déterminer la nature des effets à court terme des contraintes thermiques et hydriques combinées sur la physiologie et le comportement. L'enjeu est de comprendre la sensibilité physiologique des organismes à ces contraintes, et de déterminer le potentiel du comportement et du microclimat à compenser les effets de l'environnement sur la physiologie. Pour ce faire, j'ai conçu deux expérimentations avec des vipères aspics non-reproducteurs au cours desquelles j'ai manipulé les contraintes hydriques et thermiques en imitant des événements climatiques extrêmes. J'ai quantifié les réponses physiologiques et comportementales à l'échelle de l'individu. Une première expérience m'a permis de tester les effets combinés des contraintes sur la physiologie, et une seconde de tester l'expression du comportement d'hydrorégulation (sélection de microclimats) et ses bénéfices associés.

Chapitre III - Effets des contraintes hydriques pendant la reproduction [Article 4](#) ; [Expérimentation 5](#)

L'objectif de ce chapitre est de quantifier les effets des contraintes hydriques pendant la reproduction sur la physiologie maternelle, le succès reproducteur, le développement embryonnaire et le phénotype des descendants. L'enjeu est de comprendre la sensibilité hydrique de la reproduction, les mécanismes d'allocation des ressources associés et les conséquences pour la valeur sélective (succès reproducteur, survie future, phénotype des descendants). Pour ce faire, j'ai conçu deux expérimentations sur des vipères péliades gestantes. La première expérience m'a permis de tester l'effet d'une courte période de privation d'eau (imitant une sécheresse estivale) en début de gestation sur la physiologie maternelle et le développement embryonnaire. La seconde m'a permis de tester l'effet de courtes périodes de privation d'eau en fin de gestation et au cours des premières semaines de vie des vipéreaux sur le succès reproducteur, le phénotype des nouveau-nés et leur trajectoire développementale.

Matériels & Méthodes



Mesure de l'épaisseur de la queue d'une vipère péliade gestante © Sydney Hope

1. Modèles d'études

1.1 Les vipères péliades et aspic, deux ectothermes terrestres vivipares

Biologie générale

La vipère péliade (*Vipera berus* ; Linnaeus 1753) et la vipère aspic (*Vipera aspis* ; Linnaeus 1758) sont deux espèces de vipères (**Figure 14**) du genre *Vipera* (Laurenti ; 1768), un groupe d'espèces réparties essentiellement en Europe (Wüster et al.2008 ; Gasc et al. 1997).



Figure 14: (A) Vipères péliades (coloration noire et blanche contrastée du mâle et coloration brune de la femelle) © Mathias Dezetter et (B) vipère aspic femelle gestante © Matthieu Berroneau.

Ces deux espèces présentent de grandes similitudes dans leur morphologie et leur écologie. Ce sont des serpents terrestres de petite taille avec une longueur totale moyenne de l'ordre de 55cm (Forsman, 1991; Lourdais et al., 2004). Il existe un dimorphisme sexuel de taille et de coloration chez les deux espèces, les femelles sont en moyenne plus grandes et les mâles présentent des patrons dorsaux sombres plus fortement contrastés que les femelles (Aubret et al., 2002; Zuffi et al., 2009). Ces espèces occupent des habitats ouverts, utilisant par exemple les écotones des milieux bocagers, les réseaux de haies, de landes et de friches. Elles y utilisent les micro-habitats présents (ronciers, tas de branches, de pierres, terriers et galeries) pour thermoréguler et se réfugier. En journée, ces vipères thermorégulent activement et s'exposent au soleil pour atteindre leurs préférences thermiques en sélectionnant des microclimats plus chauds et également plus humides (Guillon et al., 2014; Lourdais et al., 2017). La nuit, leur température corporelle dépend de celle du refuge nocturne. Ce sont des

prédateurs chassant à l'affût et se nourrissant essentiellement de micromammifères et de lézards (Bea et al., 1992). La digestion impose aux individus une dépense d'énergie et une augmentation des préférences thermiques, de même que la mue ou la reproduction (Dupoué et al., 2015b). Les besoins et les contraintes hydriques associées à ces états physiologiques conduisent généralement à la sélection de microclimats plus humides (Dupoué et al., 2015b; Lourdais et al., 2017).

Affinités climatiques et aires de distribution

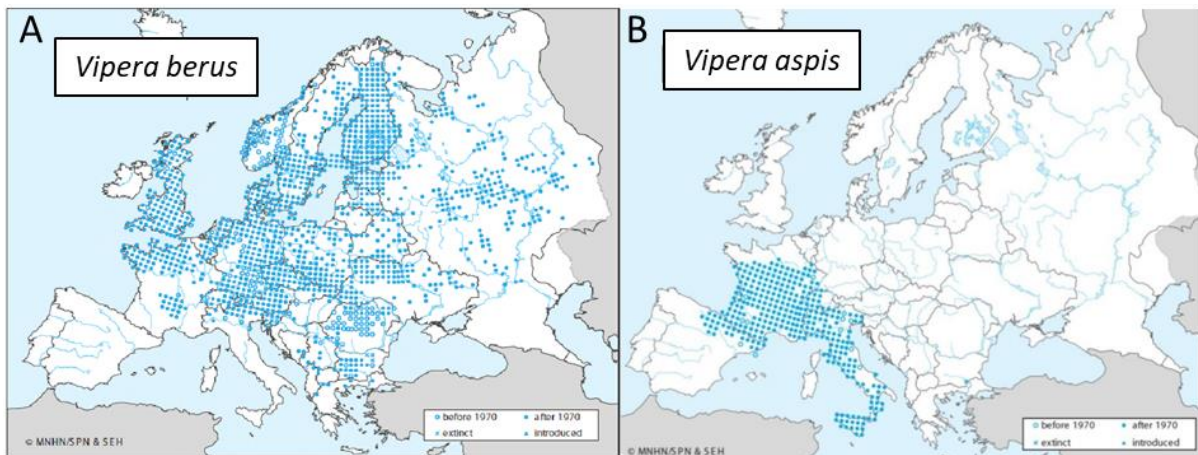


Figure 15 : Aires de distribution géographique de (A) la vipère péliade et (B) la vipère aspic en Europe. D'après Gasc et al. 1997

La vipère péliade et la vipère aspic présentent des aires de distribution géographique et des affinités climatiques contrastées (**Figure 15**) : la vipère péliade a une large répartition au Nord de la zone paléarctique tandis que la vipère aspic a une répartition plus méridionale à l'Ouest de l'Europe. La vipère péliade est inféodée à des climats Euro-sibérien plus frais et humides que la vipère aspic qui est d'affinité méditerranéenne.

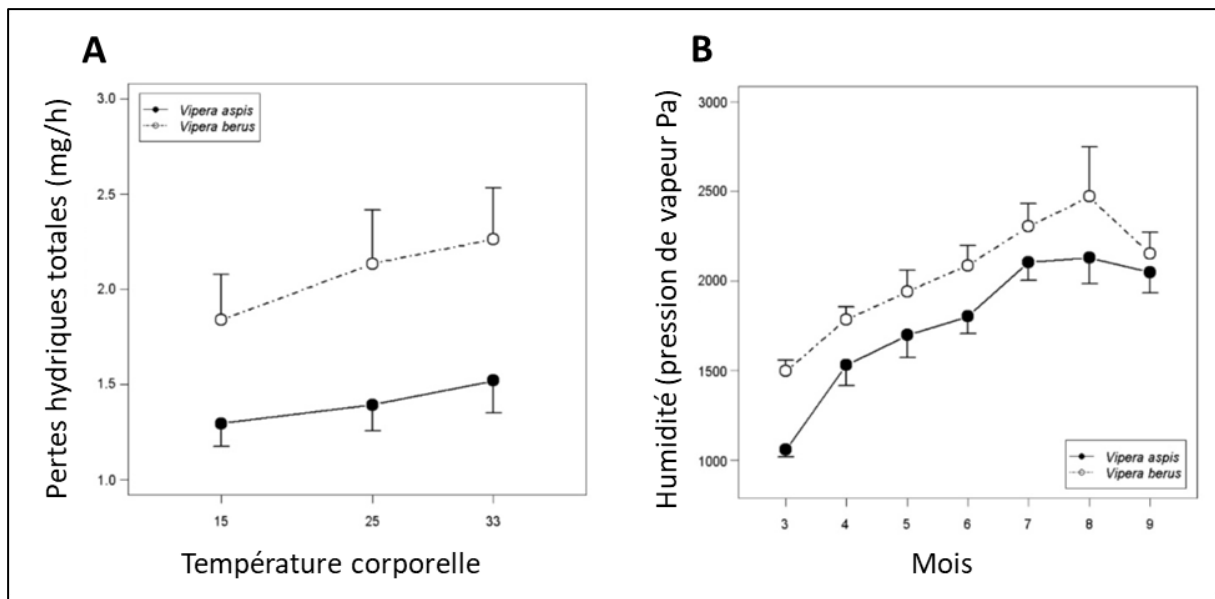


Figure 16 : (A) Pertes hydriques totales (mg/h) en fonction de la température corporelle et (B) humidité (Pa) du micro-habitat de thermorégulation au cours de l'année chez la vipère péliade (cercles blancs) et la vipère aspic (cercles noirs). D'après Guillon et al. 2014.

Les travaux de thèse de Guillon (2012), combinant des données climatiques et des mesures physiologiques, ont mis en évidence que les contraintes thermiques et hydriques déterminent la répartition de ces espèces. La vipère péliade présente des adaptations physiologiques aux climats froids, notamment un métabolisme basal plus élevé, associé à une plus grande sensibilité aux pertes hydriques respiratoires et cutanées par rapport à la vipère aspic (Guillon et al., 2014; Lourdais et al., 2013a). Elle utilise également des micro-habitats plus humides que la vipère aspic en général (**Figure 16** ; Guillon et al. 2014).

Cycle de vie et reproduction

Chez ces deux espèces vivipares, la reproduction commence au printemps, généralement en mars-avril avec l'accouplement et la vitellogénèse chez les femelles. L'ovulation a lieu au début de l'été (fin-mai à fin-juin) et la gestation dure environ 3 mois jusqu'à fin-août à fin-septembre. Les nouveau-nés sont alors complètement autonomes et commencent leur croissance au cours des premières semaines de vie en mobilisant les réserves acquises au cours du développement embryonnaire (Dupoué et al., 2016). Lors de cette phase, la croissance corporelle, et notamment celle des mâchoires est déterminante pour la performance des nouveau-nés lors des premières prises alimentaires (Forsman, 1994; Forsman & Lindell, 1993). Ces vipères sont des reproducteurs sur capital, les femelles accumulent des réserves énergétiques pendant plusieurs années avant de les investir dans la reproduction (Bauwens & Claus, 2019; Bonnet et al., 2002; Lorigou et al., 2016). Les femelles sont généralement

fortement émaciées après la parturition (Dupoué & Lourdais, 2014; Lorigou et al., 2016), la fréquence de reproduction est donc faible et tend parfois à la sémelparité (un seul évènement reproducteur au cours de la vie) dans certaines populations (Bauwens & Claus, 2019).

Les travaux de thèse de Lorigou (2011) et de Dupoué (2014) ont mis en évidence les besoins thermiques et hydriques associés au développement embryonnaire pendant la gestation (**Figure 17**), ainsi que les coûts et mécanismes de la régulation thermique et hydrique maternelle chez la vipère aspic. Les conditions thermiques sont particulièrement importantes en début de développement embryonnaire (Lorigou et al., 2013b). Les femelles ajustent leur physiologie (métabolisme, glucocorticoïdes) au cours de la gestation et présentent notamment un effort de thermorégulation et des dépenses énergétiques plus élevés (Dupoué & Lourdais, 2014; Lorigou et al., 2016, 2013a, 2013b). Les besoins hydriques des embryons augmentent au cours de la gestation en lien avec la croissance somatique et ils dépendent pour une mère de la taille de sa portée par un effet de cumul des besoins hydriques de chaque embryon (Lourdais et al., 2017, 2015). Les femelles sont également plus sensibles aux pertes hydriques durant la gestation en raison de leurs dépenses énergétiques plus élevées (augmentation des pertes hydriques respiratoires en lien avec le métabolisme ; Riddell et al., 2018; Woods & Smith, 2010) mais également en raison de la distension abdominale liée au nombre et à la taille des embryons, augmentant les pertes hydriques cutanées (Lourdais et al., 2017). En cas de privation d'eau en milieu de gestation, les femelles vipère aspic compromettent leur balance hydrique au bénéfice du développement embryonnaire en maintenant les transferts en eau vers les embryons (Dupoué et al., 2015a). Ces compromis liés à l'eau peuvent impliquer des ajustements hormonaux et influencer la croissance des nouveau-nés à travers des effets transgénérationnels (Dupoué et al., 2016). Les compromis entre les besoins thermiques et hydriques au cours de la gestation impliquent également des ajustements comportementaux : les femelles gestantes sélectionnent activement des microclimats plus humide et plus chaud (Lourdais et al., 2017).

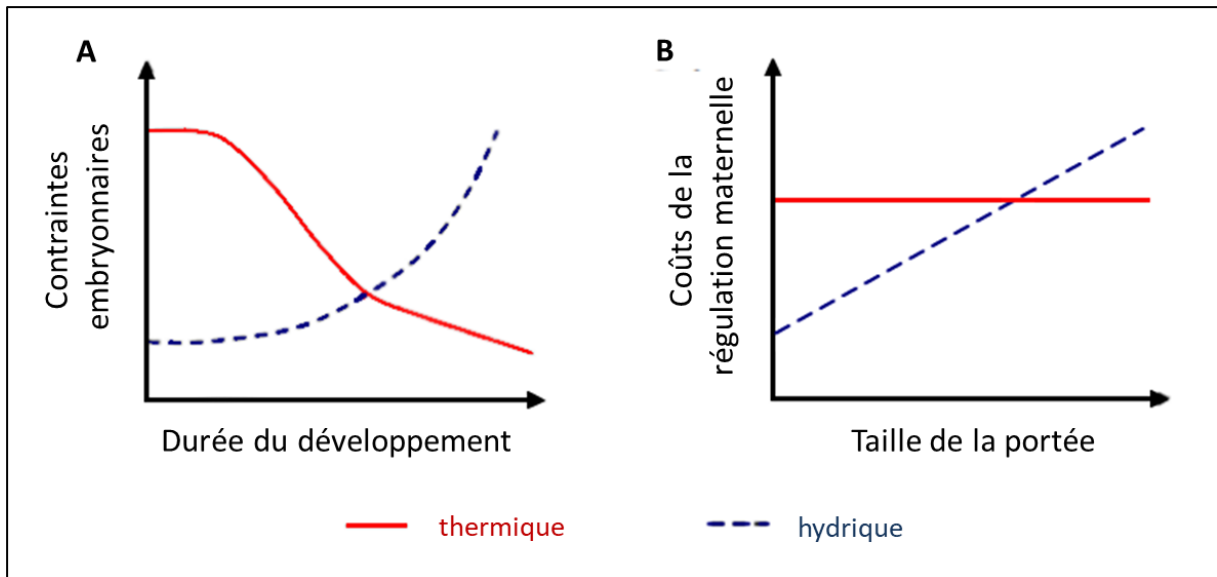


Figure 17 : Dynamique des (A) contraintes embryonnaires thermiques et hydriques au cours de la gestation et des (B) coûts de la régulation maternelle thermique et hydrique en fonction de la taille des portées. (Lorioux 2011)

Chez la vipère péliade, plus sensible aux pertes hydriques, des périodes de privation d'eau au cours de la gestation sont susceptibles d'avoir des effets négatifs plus marqués sur la physiologie maternelle et le développement embryonnaire que chez la vipère aspic.

Le changement climatique influence la phénologie et le cycle de vie de ces vipères (Luiselli et al., 2018; Rugiero et al., 2013). Les canicules et sécheresse estivales sont également plus intenses et plus fréquentes au sein des aires de répartition de ces deux espèces (Perkins et al., 2012; Spinoni et al., 2018; Sutanto et al., 2020). Ces événements extrêmes exposent donc les individus à des températures plus élevées et à des périodes de privation d'eau plus longues et plus fréquentes, notamment lors de phases du cycle de vie cruciales pour la valeur sélective, la gestation et les premières semaines de croissance post-natale (**Figure 18**).

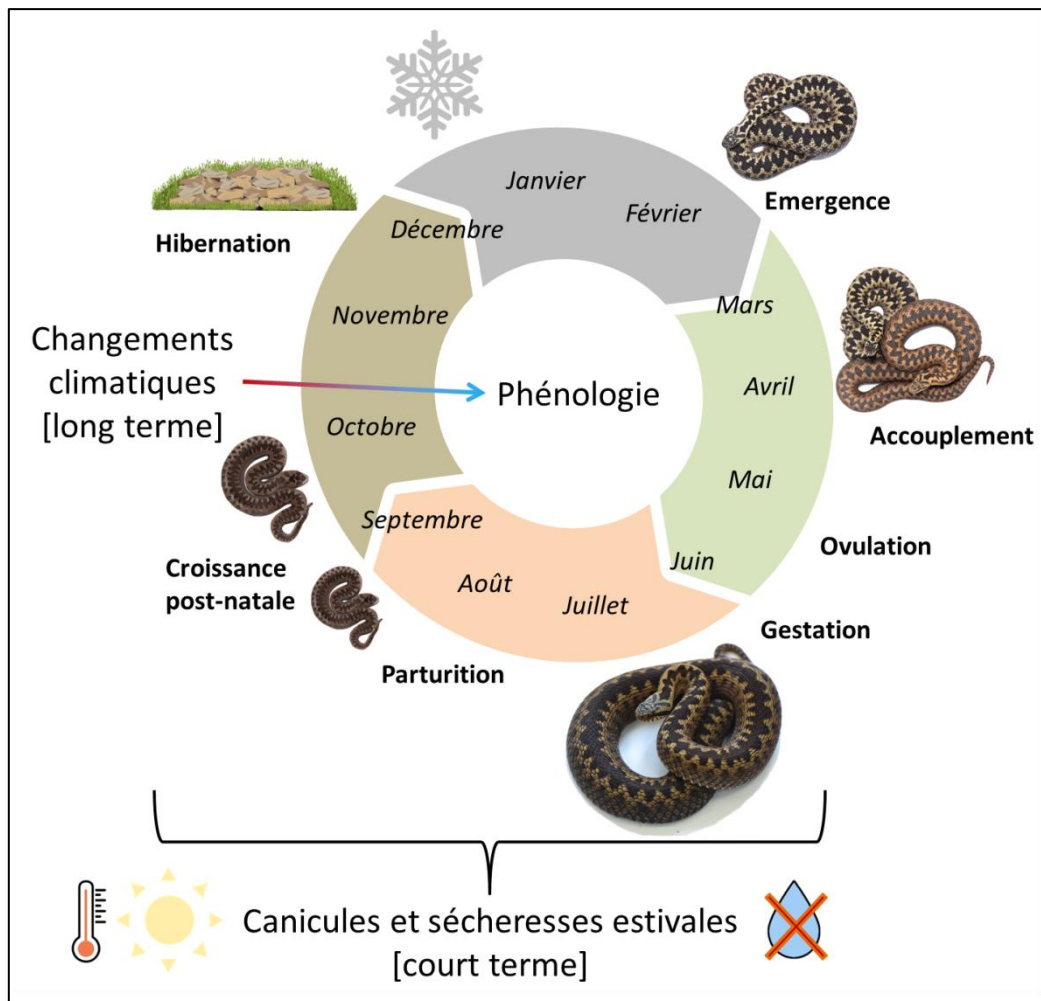


Figure 18 : Représentation du cycle de vie et de la phénologie de la vipère péliade en lien avec les variations climatiques

Au cours de ce doctorat, j'ai mené des travaux expérimentaux sur ces deux espèces de vipères à différentes étapes de leur cycle de vie. J'ai étudié des individus non-reproducteurs de vipère aspic pour mes recherches sur les réponses physiologiques et comportementales aux contraintes abiotiques à l'échelle individuelle ([Article 1](#) ; [Article 2](#) ; [Article 3](#)). Pour mes recherches sur les effets des contraintes hydriques sur la reproduction, mes expérimentations ont porté sur des vipères péliades gestantes et leurs descendants ([Article 4](#) ; [Expérimentation 5](#)).

1.2 Maintien en captivité permanente ou transitoire

Au cours de ce doctorat, j'ai mené des travaux expérimentaux sur une colonie de vipères aspic captives et sur des vipères péliades sauvages maintenues en captivité transitoire puis relâchées sur leur lieu de capture.

Nous avons maintenu en captivité permanente 48 vipères aspic adultes (28 femelles ; 20 mâles). Cette population captive est issue de parents sauvages originaires de l'Ouest de la France et reproduit en captivité au CEBC. Cette colonie initialement maintenue chez nos collaborateurs du centre de production de venin VenomWorld (Saint-Thibault-des-Vignes, France) a été déplacée au CEBC au cours de mon doctorat dans le cadre de mes projets de recherche. En dehors des périodes d'expérimentations, nous avons maintenu les vipères au sein de meubles spécialisés (LP Rack ; Danemark - LP3-V48-C10-2ROW-POM) dans une pièce sécurisée et climatisée (**Figure 19**). Ces meubles comportent des cages individuelles (58 × 41 × 14.5 cm). Des bandes chauffantes permettent de créer un gradient thermique (20-40°C) 6h par jour, avec un point chaud de 15cm de large au fond de chaque cage, à température contrôlée par un thermostat (Habistat Pulse Proportional). Chaque cage comporte un abri en PVC (demi-cylindre, diamètre = 9 cm, longueur = 34 cm), un bac d'eau *ad-libitum* et un substrat de papier journal. Les vipères sont nourries régulièrement (1 à 2 fois par mois) avec des souris décongelées de masse adaptées à la condition corporelle de chaque individu.



Figure 19 : Pièce de maintien en captivité avec meubles LP Rack et cages individuelles.

Au cours de ma thèse, nous avons aussi capturé 76 vipères péliades gestantes avec l'aide d'un réseau de collaborateurs et de partenaires, sur différents sites de landes et de friches en Bretagne (Ille-et-Vilaine et Côtes d'Armor). Le statut reproducteur est identifié sur le terrain par une palpation légère et par la vérification de l'état de mue (l'ovulation est caractérisée par une mue pré-ovulatoire ; Lorioux et al., 2013), puis est confirmé par échographie au laboratoire (voir section 6.2). Les individus sont ensuite marqués individuellement par une procédure classique de marquage d'écailles ventrales, puis la taille (museau au cloaque) et la masse corporelle sont mesurées. Pour minimiser le temps de captivité, les vipères sont maintenues en groupe (nombre maximum de 8 individus) dans 10 enclos situés en extérieur au CEBC avant le début des procédures expérimentales. Ces enclos végétalisés offrent une mosaïque de micro-habitats (plaques ondulées en fibrociment, parpaings, abris souterrains) et un système d'arrosage automatique permet de vaporiser de l'eau quotidiennement (**Figure 20**). Les vipères sont nourries avec des souris lors de leurs séjours en enclos extérieur. Deux semaines avant le début des mesures et procédures expérimentales, les individus sont ramenés en pièce de captivité et maintenus individuellement dans les cages individuelles en conditions standard.



Figure 20 : Captures sur le terrain avec notre collaborateur Gaëtan Guillier en Ille-et-Vilaine et enclos extérieur au CEBC.

2. Manipuler les conditions climatiques

2.1 Contrôler les cycles thermiques et hydriques journalier grâce aux enceintes climatiques

J'ai développé au cours de ma thèse des traitements expérimentaux manipulant des conditions climatiques (température, humidité de l'air, accès à l'eau de boisson). Pour ce faire, j'ai utilisé

des enceintes climatiques (**Figure 21** ; Vötsch VP 600, Balingen, Allemagne) contrôlées avec le logiciel SIMPATI (ver.2.06 Vötsch). Cet équipement permet de contrôler des cycles thermiques et hydriques journaliers avec un haut degré de précision.

L'apport principal de ces enceintes est de pouvoir manipuler de manière indépendante ou conjointe les conditions thermiques (température ; °C) et hydriques (VPD : déficit de pression de vapeur d'eau ; kPa) en contrôlant précisément l'hygrométrie relative (%). J'ai ainsi pu manipuler la température ambiante indépendamment de l'humidité de l'air (régimes thermiques contrastés et déficits de pression de vapeur d'eau similaires) dans l'[Article 2](#) ou au contraire manipuler spécifiquement l'humidité de l'air indépendamment de la température dans l'[Article 3](#) (déficit de pression de vapeur d'eau contrastés et régimes thermiques similaires).

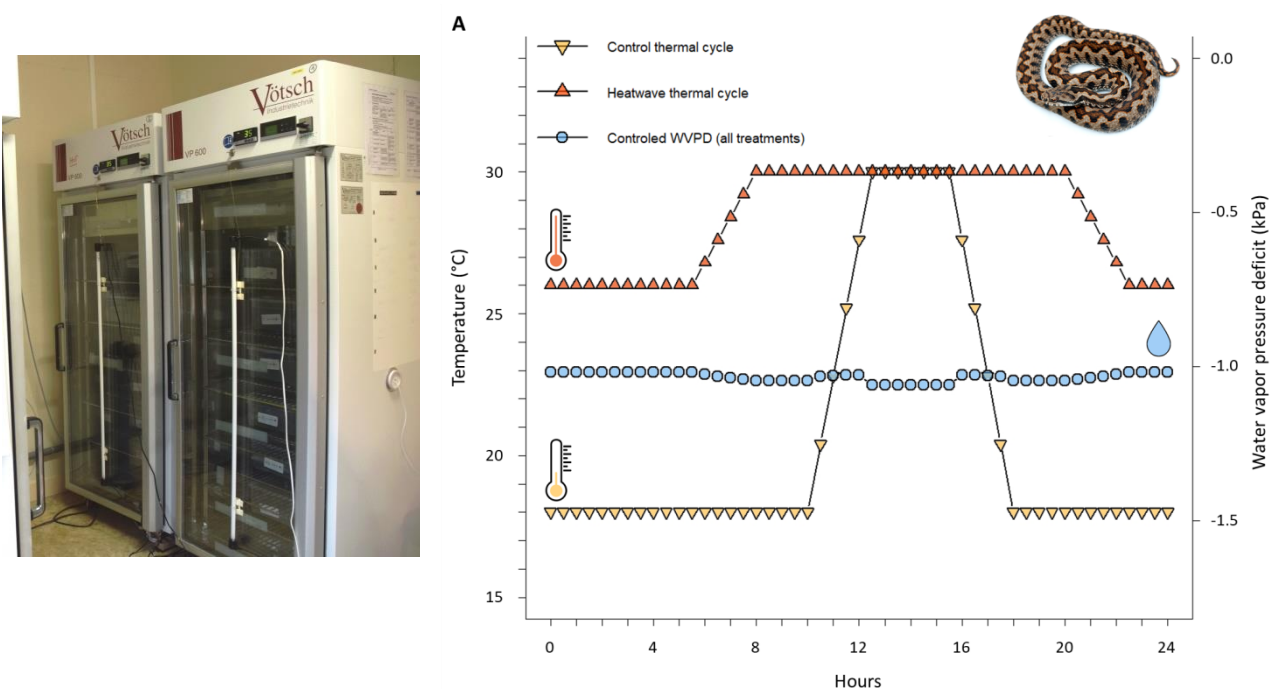


Figure 21 : Enceintes climatiques et exemple de cycles thermiques journaliers contrastés imposés avec des conditions hydriques contrôlées (déficit de pression de vapeur d'eau constant), [Article 2](#).

J'ai conçu les traitements expérimentaux en simulant des conditions climatiques imitant les températures corporelles de vipères dans des situations naturelles. Les cycles thermiques journaliers comprennent donc une phase diurne d'exposition aux préférences thermiques (e.g. 30°C) pour imiter la température corporelle d'une vipère thermorégulante. La phase nocturne imite la température d'un refuge. Afin de simuler des climats contrastés, les traitements

diffèrent dans leur durée d'exposition aux préférences thermiques (durée supérieure dans un climat chaud par rapport à un climat contrôlé ou froid où les opportunités de thermorégulation sont plus réduites ; Blouin-Demers & Weatherhead, 2001) mais aussi dans leur température nocturne (Davy et al., 2017). En simulant des variations abiotiques cycliques et en utilisant des traitements thermiques contrastés dans leur moyenne et leur variance, ces traitements sont pertinents pour tester des scénarios climatiques adaptés aux modèles d'études (Colinet et al., 2015; Morash et al., 2018).

2.2 Manipuler les conditions sur le long terme

Les enceintes climatiques permettent de simuler des conditions sur le long terme au cours du cycle de vie des individus. L'[Article 1](#) repose sur les données issues d'une expérimentation de 7 ans en enceinte climatique grâce à laquelle j'ai pu tester les réponses d'acclimatation long terme aux conditions thermiques chroniques au cours de la croissance (approche expérimentale détaillée en section 6.1).

Les enceintes climatiques ont ainsi été utilisées pour simuler trois conditions climatiques durant la croissance (climat chaud, climat intermédiaire, climat froid) en imposant des cycles thermiques contrastés (« journée chaude », « journée normale », « journée froide ») pendant 4 ans, puis pour imposer un cycle thermique commun (« journée normale ») pendant 3 années supplémentaires.

2.3 Simuler des événements extrêmes

J'ai aussi utilisé les enceintes climatiques pour simuler des événements climatiques extrêmes. J'ai conçu des cycles thermiques simulant des périodes de canicules sur de courtes périodes (33 jours pour l'[Article 2](#) ; 23 jours pour l'[Article 3](#)). Les enceintes climatiques ont également permis de simuler des conditions hydriques de l'air contrastées en manipulant les cycles journaliers d'hygrométrie relative ([Article 3](#) ; [Expérimentation 5](#)).

Afin de simuler des conditions de sécheresses, j'ai également manipulé expérimentalement l'accès à l'eau de boisson ([Article 2](#) ; [Article 3](#) ; [Article 4](#) ; [Expérimentation 5](#)).

3. Manipuler les conditions microclimatiques

3.1 Contrôler le microclimat thermique

Alors que les enceintes climatiques imposent un habitat thermique contrôlé au cours du cycle journalier, la manipulation d'un gradient thermique permet aux individus d'accéder à différents micro-climats thermique au sein de leur enceinte expérimentale.

J'ai simulé des gradients thermiques (20-40°C) permettant la thermorégulation comportementale au sein des cages de maintenance individuelles à l'aide de plaques chauffantes (point chaud large de 15cm) contrôlées par un thermostat ([Article 4](#) ; [Expérimentation 5](#)).

3.2 Contrôler le microclimat hydrique

Afin de manipuler expérimentalement l'accès à des microclimats contrastés en termes de contraintes hydriques, j'ai conçu des abris expérimentaux imitant des micro-habitats utilisés en conditions naturelles. En combinant l'utilisation des enceintes climatiques à des abris maintenus humides ou secs, j'ai pu créer des conditions microclimatiques sans influencer le climat ambiant ([Article 3](#)). Les enceintes climatiques ont également permis d'imposer les conditions thermiques pour étudier les réponses d'hydrorégulation indépendamment de la thermorégulation comportementale.



Figure 22 : Abris utilisés pour simuler des conditions microclimatiques contrastées (abris humide vs. abris sec)

Pour ce faire, j'ai utilisé des abris en plastique (diamètre = 15cm ; hauteur = 11 cm ; entrée circulaire de 3cm) contenant des éponges et lamelles de tissus en microfibrés (**Figure 22**). En

manipulant l'hydratation des éponges et du tissu, j'ai manipulé les conditions microclimatiques au sein des abris. Le contenu a été changé tous les 3 jours, maintenu sec (microclimat sec) ou réhydraté (microclimat humide). La structure et le protocole de réhydratation des abris ont été calibrés en amont des procédures expérimentales pour calibrer les conditions microclimatiques manipulées, vérifier l'absence de condensation et l'absence d'influence du microclimat sur le climat ambiant.

4. Comprendre les réponses physiologiques

4.1 Quantifier le métabolisme et les pertes hydriques

L'utilisation de systèmes de respirométrie (Sable System, Las Vegas, USA) permet de quantifier (1) la consommation d'oxygène (VO_2 ; ml/h), et donc le taux métabolique standard ainsi que (2) les pertes hydriques totales par évaporation (mg/h). Au cours de ce doctorat, j'ai utilisé des données issues de mesures en système fermé et en système ouvert ([Article 1](#)) et nous avons également mis en place un système fermé pour réaliser des mesures de taux métabolique au repos ([Article 2](#)).

Pour ces mesures, les individus sont placés au repos dans des chambres de test opaques à température contrôlée et au volume calibré en fonction de la taille des individus et du système de respirométrie. L'ordre de mesure est aléatoire en fonction des traitements expérimentaux, du sexe, et des conditions thermiques de mesure.

Respirométrie en circuit fermé

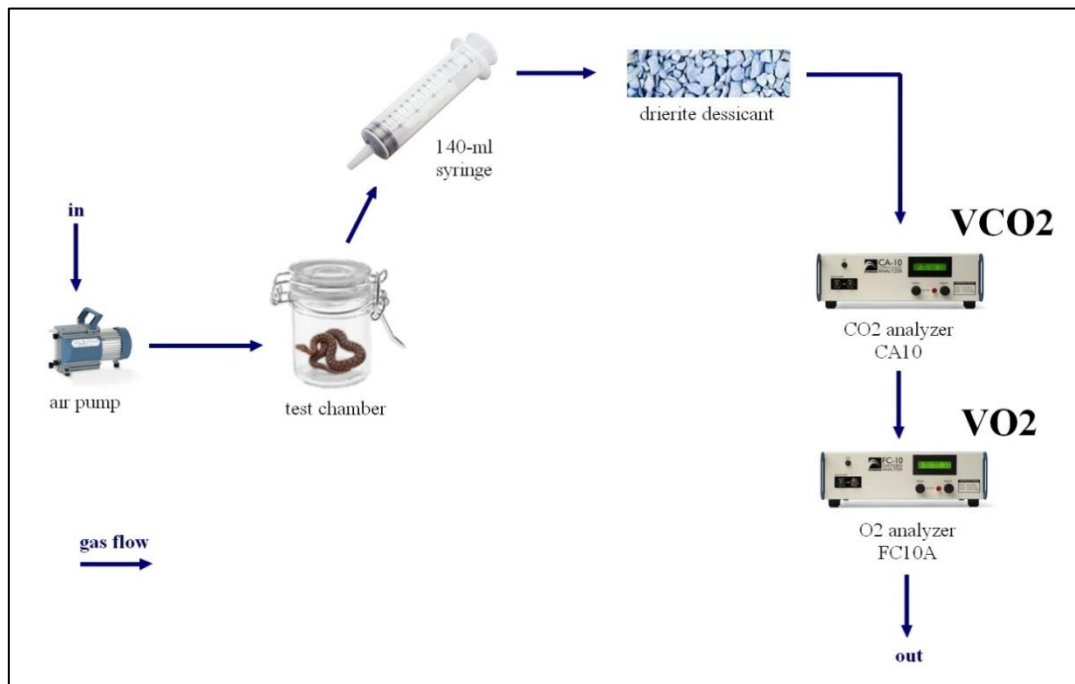


Figure 23 : Fonctionnement du système de respirométrie en circuit fermé

Le système de respirométrie en circuit fermé (**Figure 23**) permet de quantifier le taux métabolique standard à travers de mesures de la consommation d'oxygène.

Les individus sont placés dans une chambre de test opaque (volume = 1000 mL) rempli d'air d'origine extérieur pendant 5 minutes par une pompe afin d'assurer 99 % du renouvellement de l'air (Bioblock Scientific 51). Deux seringues d'air extérieur (140 mL) sont prélevées avant le début du test. Les durées des tests ont été déterminées au préalable en fonction des températures testées afin d'assurer un taux de suppression d'oxygène entre 0.5% et 1% (40 à 180 min). A la fin du test, des échantillons d'air (2 seringues 140 mL) sont prélevés. Chaque échantillon d'air est ensuite poussé par une pompe à débit contrôlé (KDS 210, KD Scientific Inc, Holliston, USA) vers une colonne de drierite pour enlever l'humidité de l'air avant les analyseurs quantifiant les concentrations de dioxyde de carbone (CA10, Sable Systems, Las Vegas, USA) et d'oxygène (FC10A, Sable Systems, Las Vegas, USA). Les analyseurs sont calibrés chaque jour avant la session de mesure en utilisant de l'air extérieur délivré au débit de la pompe.

Respirométrie multivoies en circuit ouvert

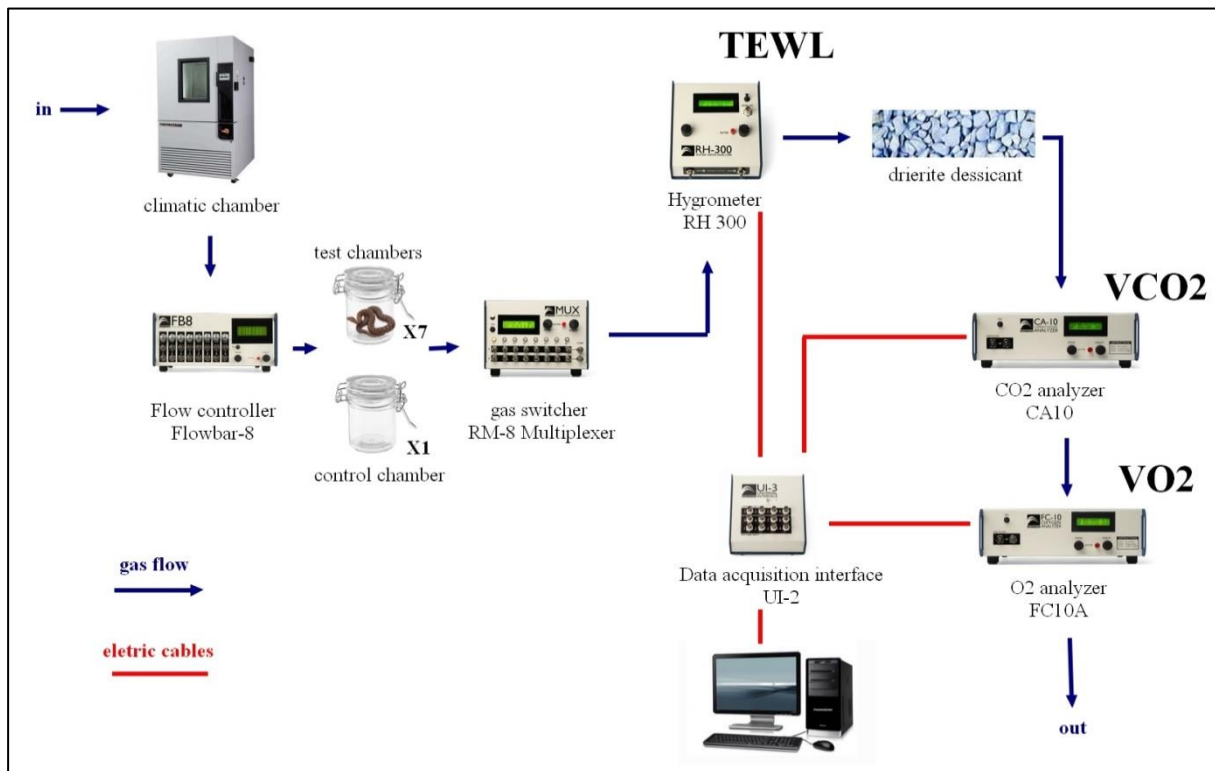


Figure 24 : Fonctionnement du système de respirométrie ouvert multivoies.

Le système de respirométrie ouvert multivoies (**Figure 24**) permet de quantifier le taux métabolique standard et les pertes hydriques totales par évaporation sur 7 individus par session de mesure.

Ce système emploie 8 chambres de test (volume = 500 mL) : 7 individus occupent chacun une chambre alors que la 8^{ième} est vide et sert de référence pour les calculs d'échanges gazeux. La durée du test est de 6 heures avec nos vipères. L'air extérieur est amené par une pompe vers une enceinte climatique (#400 DG LMS Ltd, Sevenoaks, Kent, UK) contenant un système de condensation de l'air afin de contrôler l'humidité de l'air entrant (point de rosé fixé). L'air d'humidité connue est ensuite dirigé par un régulateur de débit (FlowBar-8, Sable Systems, Las Vegas, USA) vers les chambres de test. L'air sortant de chaque chambre est ensuite envoyé séquentiellement vers les analyseurs par un échangeur préalablement programmé (RM-8 Multiplexer, Sable Systems, Las Vegas, USA). L'air est d'abord dirigé vers un hygromètre de précision (RH300, Sable Systems, Las Vegas, USA) mesurant la température du point de rosée, puis passe à travers une colonne de drierite avant d'atteindre les analyseurs (**Figure 25**) de dioxyde de carbone (CA10, Sable Systems, Las Vegas, USA) et d'oxygène (FC10A, Sable Systems, Las Vegas, USA). Les données des analyseurs sont intégrées et

transmises à un ordinateur par l'intermédiaire d'un interface spécifique (UI-2, Sable Systems, Las Vegas, USA). Des équations dérivées de celles de Whitters (1977) et adaptées à notre système permettent alors de calculer la consommation d'oxygène et les pertes hydriques totales en fonction des concentrations entrantes et sortantes et des débits.



Figure 25 : Appareil de contrôle des débits et analyseurs et chambres de tests opaques utilisées pour la respirométrie

4.2 Les paramètres sanguins et hormonaux

Afin de quantifier les effets des traitements expérimentaux sur des paramètres sanguins et hormonaux, nous avons effectué des prises de sang (**Figure 26**) en début et en fin d'exposition aux traitements (**Article 2 ; Article 3 ; Article 4 ; Expérimentation 5**). Pour cela, le sang (150 μ L maximum par prise) est prélevé dans le cœur (localisé par une légère palpation) en utilisant des seringues (1 mL) équipée avec des aiguilles fines (29G) préalablement héparinées. Le sang prélevé est immédiatement centrifugé pour séparer le plasma des hématies. Les échantillons sont conservés au congélateur (-28°C) avant les dosages.

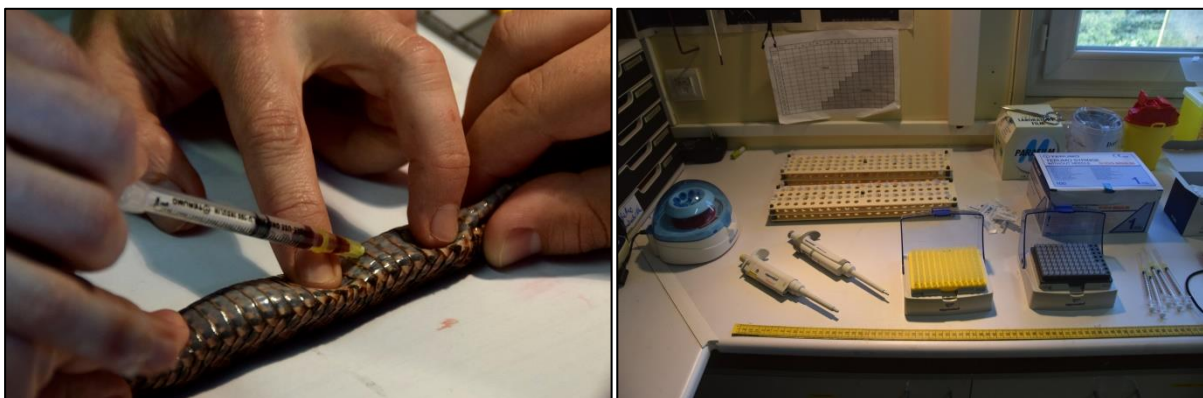


Figure 26 : Prise de sang sur une vipère aspic et matériel pour la préparation des échantillons.

Osmolalité plasmatique, indicateur physiologique de la balance hydrique

L'osmolalité plasmatique (mOsm.kg^{-1}) est un indicateur rigoureux et fiable de la balance hydrique individuelle (Cheuvront & Kenefick, 2014; Peterson, 2002; Uchiyama et al., 2014). Elle correspond à la quantité de solutés (ions et particules libres) par kilogramme de plasma sanguin, et augmente donc quand le volume d'eau dans le sang diminue. Une osmolalité élevée indique ainsi un état de déshydratation. Nous avons mesuré l'osmolalité plasmatique au CEBC et au laboratoire iEES en utilisant des osmomètres à tension de vapeur (Vapro2, Elitech group ; model 5500, Wescor, Logan, UT, USA) calibrés avec des échantillons standards d'osmolalité connus (290 ; 1000 mOsm.kg^{-1}). Pour ces mesures, nous avons utilisé des duplicats de 10 μL de plasma sanguin.

Corticostérone plasmatique

La corticostérone est un glucocorticoïde lié notamment à la mobilisation énergétique et au métabolisme (Dupont et al., 2019; DuRant et al., 2008). La sécrétion basale de ce stéroïde est contrôlée par l'axe Hypothalamus-Hypophyse-Surrénales et le taux basal de la corticostérone joue un rôle de médiateur de la gestion des compromis d'allocation de l'énergie. Cette hormone est également impliquée dans des rôles minéralocorticoïde de régulation de la balance hydrique (Brusch et al., 2020a). En réponse à un stress environnemental, la corticostérone est sécrétée à des concentrations plus élevées (i.e. taux de réponse au stress) et induit des réponses physiologiques et comportementales rapides comme une réponse d'évitement du stress (Angelier 2009 ; Wingfield 1998).

La mesure des taux basaux de corticostérone (ng.mL^{-1}) fournit donc un indicateur de l'état de mobilisation énergétique, tandis que les mesures des taux de réponse au stress (ng.mL^{-1}) renseignent sur la capacité de l'organisme à faire face à un stress additionnel. Des taux basaux peuvent également indiquer un état de stress physiologique selon le modèle allostatique de la régulation du stress (McEwen & Wingfield, 2010). Pour mesurer ces indicateurs sur les mêmes individus, nous avons réalisé une première prise de sang effectuée en moins de 3 minutes (Romero & Wikelski, 2002) pour le dosage des taux basaux, et une seconde prise de sang effectuée une heure plus tard pour les taux induits par le stress. Entre les deux prises de sang, nous avons appliqué un protocole standard de réponse au stress (Dupoué et al., 2014) en plaçant les vipères dans une cage expérimentale sans abris, à température contrôlée (25°C).

Les dosages ont été effectués au sein de la plateforme de biochimie du CEBC en utilisant un protocole préétabli de radio-immuno-essai à partir d'échantillons de 50µL de plasma sanguin (Dupoué 2016).

Marqueurs du statut oxydatif

Le métabolisme cellulaire génère des dérivés réactifs de l'oxygène (radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes), que l'organisme peut neutraliser à travers des mécanismes de défense anti-oxydante. Un stress environnemental peut conduire à un déséquilibre de la balance entre ces deux composants. Une quantité de dérivés réactifs de l'oxygène supérieure aux défenses anti-oxydantes peut ainsi conduire à des dommages oxydatifs engendrant des effets négatifs sur le vieillissement (par exemple, via l'érosion accélérée des télomères), la physiologie et les performances individuelles (Costantini, 2008; Costantini et al., 2011; Monaghan et al., 2014). Nous avons mesuré à l'iEES deux marqueurs plasmatiques du statut oxydatif : l'activité des peroxydes organiques (ROMs, mg H₂O₂ dl⁻¹) comme un indicateur des dommages oxydatifs, et la capacité non-enzymatique du plasma à neutraliser une attaque oxydante d'acide hypochloreux (OXY, µmol HClO ml⁻¹) comme un indicateur des défenses anti-oxydante (Costantini, 2016, 2011a). Pour ce faire, nous avons utilisé des kits colorimétriques (MC003 et LC435, Diacron International Italy).

4.3 La morphologie et l'état des réserves

Masse corporelle

Au cours des traitements expérimentaux, nous avons mesuré les variations de masse corporelle au cours du temps. Chez les reptiles, la masse est un indicateur fiable des modifications de la balance hydrique en l'absence de prise alimentaire (Dupoué et al., 2014; Edwards et al., 2021; Lillywhite et al., 2012), mais elle varie aussi bien évidemment en fonction des dépenses énergétiques.

Epaisseur des muscles

Le catabolisme protéique, et notamment la mobilisation de protéine de structure au sein des muscles, génère la libération d'eau de liaison (l'eau représente près de 75% de la masse des muscles squelettiques). En l'absence d'eau de boisson, ce mécanisme physiologique peut influencer la balance hydrique en compensant l'état de déshydratation de l'individu (Brusch et al., 2018). Chez les serpents, la perte musculaire est cependant coûteuse car cette mobilisation

des réserves réduit les performances individuelles (Lorioux et al., 2016; Lourdais et al., 2013b; 2004). La mesure de l'épaisseur de la queue fournit un estimateur fiable des dimensions des muscles que nous avons utilisé comme proxy du catabolisme des muscles dans nos expériences sur la déshydratation (Lorioux et al., 2016; Lourdais et al., 2005). Pour ce faire, j'ai mesuré en triplicats l'épaisseur de la queue (± 0.01 mm) au niveau de la sixième écaille sub-caudale en utilisant un spécimètre électronique sensible à la pression (**Figure 27** ; Absolute Digimatic, Mitutoyo, Japan), en début et en fin d'exposition aux traitements.

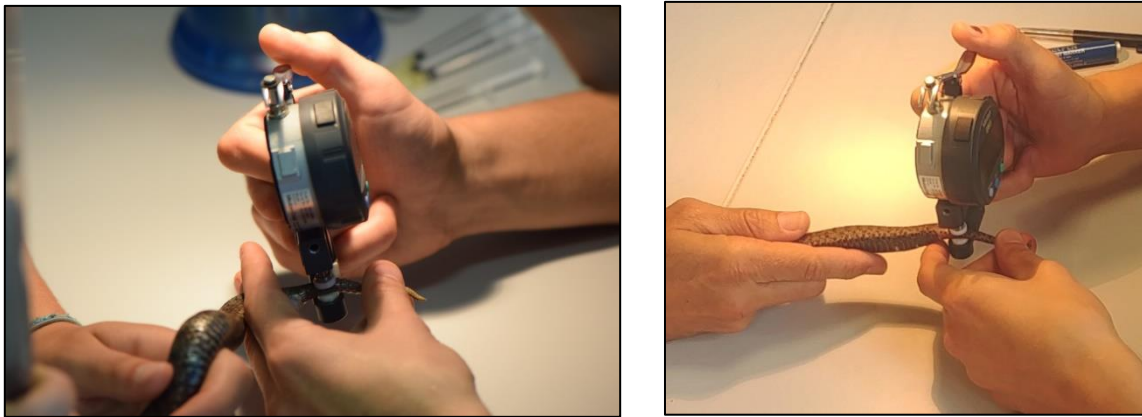


Figure 27 : Mesure de l'épaisseur de la queue à l'aide d'un spécimètre électronique.

5. Comprendre les réponses comportementales

5.1 Utilisation individuelle des microclimats

Lors de mes travaux manipulant les microclimats thermiques ou hydriques (voir section 3.1 et 3.2), un suivi répété de l'utilisation individuelle des microclimats a été effectué.

Thermorégulation comportementale

Afin de quantifier le comportement de thermorégulation au sein de gradients thermiques, j'ai mesuré à intervalle régulier la température corporelle de surface des vipères (4 mesures à 30 min d'intervalle durant la phase d'activité diurne). Pour ce faire, j'ai utilisé un thermomètre infrarouge (Raytek Raynger MX2) en maintenant une distance et un angle défini (1.15m ; 45°), permettant alors une mesure précise (triplicats) de la température de surface sur une aire de 19mm de diamètre. La température de surface mesurée en suivant cette procédure est un estimateur fiable de la température corporelle chez les serpents (Shine et al., 2002a). Cette méthode a été appliquée dans l'[Article 4](#), à travers une approche expérimentale visant à tester

l'effet des contraintes hydriques (privation temporaire de l'accès à l'eau de boisson) sur le comportement de thermorégulation.

Hydrorégulation comportementale

Pour quantifier la sélection comportementale d'abris présentant des conditions microclimatiques hydriques contrastées, j'ai noté quotidiennement l'emplacement de chaque individu dans son enceinte expérimentale (individu à l'intérieur ou à l'extérieur de l'abri), 3 fois par jour à horaire régulier (9:00, 13:00 et 17:00). Cette méthode a été appliquée dans l'[Article 2](#), à travers une approche expérimentale visant à quantifier le comportement d'hydrorégulation comportementale en réponse aux contraintes hydriques (privation temporaire de l'accès à l'eau de boisson et traitements contrastés d'humidité de l'air), indépendamment des contraintes et des compromis liés aux conditions thermique (cycle thermique imposé en enceintes climatiques).

5.2 Comportement de boisson

Le comportement de boisson est un trait crucial pour la régulation et la restauration de la balance hydrique, particulièrement chez les serpents. En effet, ces derniers dépendent de l'eau de boisson plutôt que de l'eau alimentaire pour maintenir leur balance hydrique (Edwards et al., 2021; Lillywhite et al., 2019; Sandfoss & Lillywhite, 2019). Mesurer la prise en masse associée à la boisson en l'absence de nourriture permet d'estimer avec fiabilité la réhydratation d'un individu et plusieurs études ont démontré que le comportement volontaire de boisson est généralement contrôlé par le degré de déshydratation de l'individu (Lillywhite et al., 2015, 2012). Lors de mes travaux manipulant l'accès à l'eau de boisson, j'ai mesuré les gains de masse consécutifs au comportement de boisson en fin de période de privation d'eau (**Figure 28**) en mesurant la masse des individus à la fin du traitement expérimental et 24h après l'accès à de l'eau de boisson ad-libitum ([Article 2](#) ; [Article 3](#) ; [Article 4](#) ; [Expérimentation 5](#)).



Figure 28 : Comportement de boisson d'une vipère péliade gestante après une période expérimentale de privation de l'accès à l'eau de boisson.

6. Comprendre les effets sur la reproduction

6.1 Suivi de la reproduction et du développement embryonnaire

Au cours mes recherches sur les effets des contraintes hydriques sur la reproduction ([Article 4](#) ; [Expérimentation 5](#)), j'ai utilisé un échographe (Sonosite microMaxx, Inc., Bothell, WA, USA) associé à une sonde linéaire à haute fréquence (13MHz) pour quantifier la fécondité des femelles gestantes mais également pour visualiser chaque embryon, suivre le développement embryonnaire et mesurer des traits sur les embryons. J'ai bénéficié des méthodes élaborées lors des travaux de thèse de Lorigoux (2011) et Dupoué (2014).



Figure 29 : Echographie sur une femelle gestante vipère péliade. Un opérateur maintient la vipère dans un tube pendant qu'un second opérateur procède à l'échographie, effectue les mesures, enregistre les images et prend des notes.

Tout d'abord, l'échographie (**Figure 29**) permet de valider le statut reproducteur dès l'ovulation en distinguant les unités embryonnaires (i.e. embryon + vitellus) viables de par leur forme. La visualisation des embryons, la mesure de leur taille (longueur et hauteur) ainsi que la proportion de vitellus permettent conjointement d'identifier les stades embryonnaires en se basant sur les planches de développement développées par Hubert & Dufaure (1968). Le cœur battant des embryons est clairement discernable et constitue un critère fiable pour considérer un embryon vivant. Ces données descriptives sont cruciales pour allouer les femelles gestantes dans les groupes expérimentaux en fonction de leur effort reproducteur et pour imposer les traitements expérimentaux à des phases précises du développement embryonnaire.

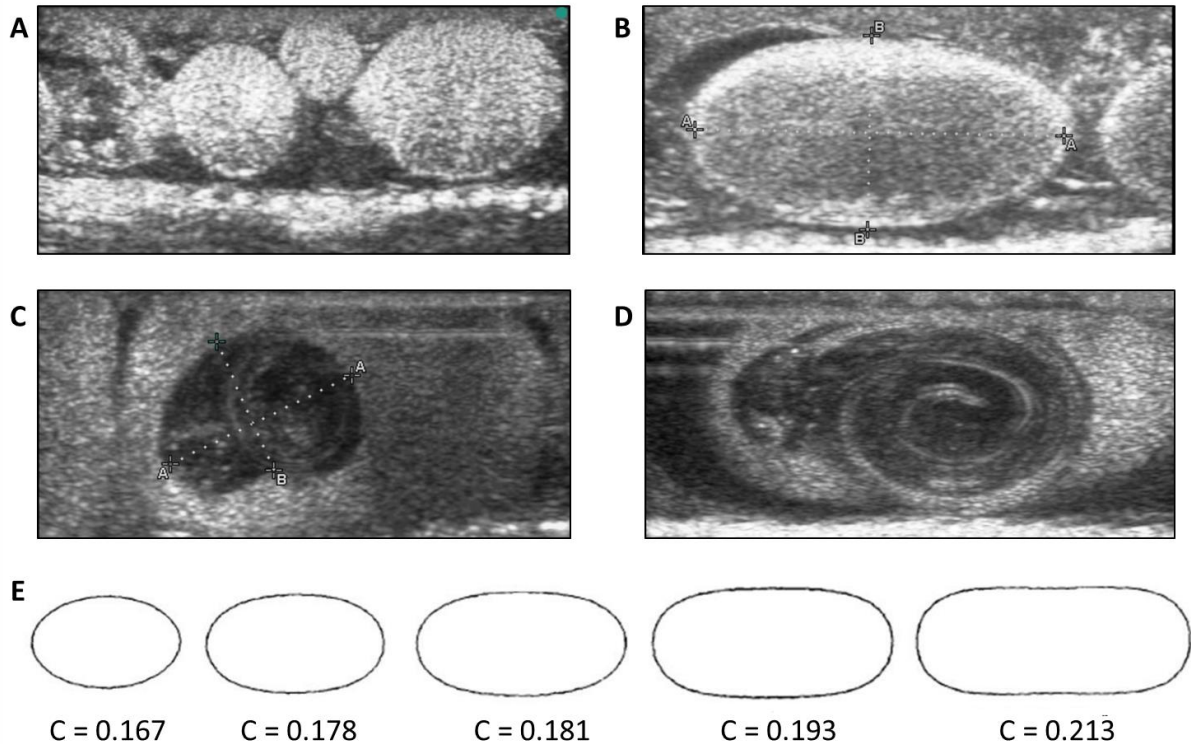


Figure 30 : (A) Unités embryonnaires non viables (forme circulaire et pas d'embryon visible) ; (B) Unité embryonnaire viable (forme ovoïde et embryon visible) ; (C) unité embryonnaire avec un embryon vivant visible (stade 36-37) ; (D) Unité embryonnaire avec un embryon vivant visible (stade 39-40) ; (E) Coefficients associés à la forme des unités embryonnaires utilisés pour les calculs de volume (cm^3).

L'échographie permet également d'estimer le volume des unités embryonnaires (**Figure 30**). Cette mesure permet d'estimer le gain en eau des embryons au cours du développement embryonnaire et donc de quantifier l'investissement hydrique maternel vers les embryons (Lourdais et al., 2017). Le volume (cm^3) est calculé à partir de la longueur (L), de la hauteur (H) et d'un coefficient (C) associé à la forme de l'unité embryonnaire (Maritz & Douglas 1994) : $volume = \pi \times L \times H^2 \times C$.

Le suivi du développement embryonnaire à travers plusieurs échographies au cours de la gestation permet également de détecter la mortalité embryonnaire au cours de la gestation. A la mise bas, les caractéristiques de la portée (nombre d'embryons vivants ; mort-nés ; unités non-développées) permettent de quantifier le succès reproducteur, et les nouveau-nés sont mesurés.

6.2 Suivi du développement postnatal

Après la naissance, une période de croissance s'opère chez les vipéreaux à partir des restes de réserves de vitellus. Cette phase d'environ deux semaines est cruciale pour la survie et la

performance des vipéreaux : la taille des vipéreaux influence la survie et la taille des mâchoires joue un rôle clef pour les performances de premières prises alimentaires (Dupoué et al., 2016; Forsman, 1994; Forsman & Lindell, 1993; Forsman & Shine, 1997; Lориoux et al., 2013b).

Les mesures de la masse corporelle, de la taille corporelle (taille totale et taille museau cloaque) des vipéreaux et de la taille des mâchoires permettent de caractériser le phénotype des nouveau-nés (**Figure 31**). La mesure de la taille corporelle (± 0.1 cm) s'effectue en triplicats en utilisant une règle graduée alors que la taille des mâchoires est mesurée en triplicats à l'aide d'un pied à coulisse électronique (± 0.01 mm). Dans le cadre de l'**Expérimentation 5** visant à déterminer les effets des contraintes hydriques maternelles et post-natales sur le développement des vipéreaux, j'ai mesuré ces traits sur 92 vipéreaux à leur naissance et après 14 jours de traitement post natal.

Dans le cadre de l'**Article 1**, des mesures répétées de taille corporelle, de taux métaboliques et de pertes hydriques au cours de 7 années de vie ont également permis de quantifier les réponses développementales aux conditions thermique à long-terme ainsi que leur flexibilité.



Figure 31 : Mesure de taille corporelle (museau-cloaque) et de taille de la mâchoire sur un nouveau-né vipère péliade.





7. Synthèse des expérimentations

Cette section fait la synthèse des approches expérimentales menées au cours de mon doctorat.

La section 7.1 synthétise les paramètres manipulés expérimentalement et les traits individuels mesurés dans chaque projet.

La section 7.2 présente le plan expérimental de chaque projet.

7.1 Paramètres manipulés et données récoltées

	Article 1	Article 2	Article 3	Article 4	Article 5	
Collecte des données	2009 à 2016	janvier à mars 2019	janvier à mars 2020	mai à août 2019	mai à octobre 2020	
Stade de vie	Naissance à vie adulte	Adultes non reproducteur	Adultes non reproducteur	Gestation, début de développement embryonnaire	Gestation, fin de développement embryonnaire	Deux premières semaines de vie
Outils de manipulation expérimentale	Enceintes climatiques	Enceintes climatiques	Enceintes climatiques	Meubles expérimentaux	Meubles expérimentaux	Enceintes climatiques
Paramètres abiotiques manipulés expérimentalement						
Température 	cycles thermiques froid, intermédiaire ou chaud	contrôle vs. canicule	cycle thermique canicule	gradient thermique optimal	gradient thermique optimal	contrôle vs. canicule
Hygrométrie de l'air (VPD) 	VPD lié au cycle thermique: -1.24, -1.55 ou -1.91 kPa	VPD contrôlé: -1.0 kPa	-1.4 kPa vs. -3.1 kPa	VPD ambiant	VPD ambiant	-0.9 kPa vs. -1.7 kPa
Accès à l'eau de boisson 	ad-libitum	ad-libitum vs. privation d'eau	privation d'eau	ad-libitum vs. privation d'eau	ad-libitum vs. privation d'eau	ad-libitum vs. privation d'eau
Accès à des micro-habitats 	abris sec	abris sec	abris humide vs. abris sec	abris sec	abris sec	abris sec
Paramètres physiologique						
Taux métabolique						
Pertes hydriques						
Osmolalité plasmatique						
Glucocorticoïdes						
Statut oxydatif						
Morphologie						
Croissance						
Masse corporelle						
Muscles						
Comportement						
Comportement de boisson						
Thermorégulation						
Sélection de micro-habitats						
Traits liés à la reproduction						
Développement embryonnaire						
Succès reproducteur						
Phénotype des nouveau-nés						

7.2 Plans expérimentaux par projet

	Modèle d'étude	Stade	Milieu expérimental	Traitement expérimental	Effectif	Durée du traitement	Traits mesurés
Article 1	Vipera aspis	Naissance à vie adulte	Enceintes climatiques	3 cycles thermiques journaliers (chaud, froid, intermédiaire)	N = 49	4 ans de traitement ; 3 ans de jardin commun	Croissance ; métabolisme et pertes hydriques
Article 2	Vipera aspis	Adulte non-reproducteur	Enceintes climatiques	2x2 factoriel : eau de boisson (ad-libitum vs. privation d'eau) et cycle thermique (contrôle vs. canicule)	N = 48	33 jours	Physiologie (pertes de masse, osmolalité, corticostérone, stress oxydatif)
Article 3	Vipera aspis	Adulte non-reproducteur	Enceintes climatiques	Privation d'eau et canicule ; 2x2 factoriel : humidité de l'air (air humide vs. air sec) et microclimat (abri humide vs. abri sec)	N = 42	23 jours	Physiologie (osmolalité, pertes de masse, pertes musculaires) et réponse comportementale (sélection des microclimats)
Article 4	Vipera berus	Gestation, début de développement embryonnaire	Meubles expérimentaux	Accès à l'eau de boisson : ad libitum vs. privation d'eau	N = 43	15 jours	Physiologie maternelle ; succès reproducteur ; développement embryonnaire
Expérimentation 5	Vipera berus	Gestation, fin de développement embryonnaire	Meubles expérimentaux	Accès à l'eau de boisson : ad libitum vs. privation d'eau	N = 19	12 jours	Succès reproducteur ; phénotype des descendants
		Premières semaines de vie	Enceintes climatiques	Canicule ; eau de boisson (ad-libitum vs. privation d'eau) et humidité de l'air (air humide vs. air sec)	N = 92	14 jours	Morphologie à la naissance, croissance, pertes de masse

Résultats



Mâle *Vipera berus* sur l'un des sites de terrain en Bretagne. © Mathias Dezetter

Chapitre I – Effets à long-terme des conditions thermiques et co-variations entre régulation thermique et hydrique



Femelle adulte *Vipera aspis zinnikeri* s'exposant au soleil © Mathias Dezetter

I.1 Résumé du chapitre

Des processus d'acclimatation du métabolisme ont été démontrés chez des organismes à courte durée de vie et dans des environnements saisonniers (Berg et al., 2017; Lachenicht et al., 2010; Sandblom et al., 2014). Cependant, pour des espèces à longue durée de vie, différents mécanismes peuvent limiter leurs capacités à s'acclimater aux variations climatiques. Par exemple, certains traits physiologiques sont déterminés pendant le développement de manière permanente et irréversible (Ligon et al., 2012; Sinclair et al., 2016; Sultan, 2017). De plus, la plupart des études sur la plasticité des traits physiologiques sont réalisées sur des pas de temps trop courts (semaines ou mois en général) pour évaluer les capacités d'acclimatation totales et la réversibilité des réponses chez les espèces longévives (Kingsolver and Huey, 2008; Pörtner et al., 2017; Rohr et al., 2018).

La capacité d'acclimatation d'un trait, comme le métabolisme basal, doit aussi intégrer le fait que ce trait est impliqué dans plusieurs fonctions parfois en conflit. Ainsi, le métabolisme est lié aux pertes hydriques par des compromis fonctionnels et des mécanismes partagés. Chez les ectothermes, les pertes hydriques sont liées aux échanges respiratoires que ce soit via le tégument ou via l'appareil respiratoire et il existe une relation "universelle" entre les échanges de gaz et d'eau (Riddell et al., 2018a; Woods and Smith, 2010b). Les conditions thermiques peuvent déclencher des ajustements plastiques des traits contrôlant les pertes hydriques, comme la résistance cutanée, mais ceux-ci vont entrer en conflit avec les capacités d'échange de gaz et le métabolisme respiratoire (e.g. Riddell et al., 2019). Alors que des co-variations entre métabolisme et certains traits physiologiques et comportementaux ont été mis en évidence (syndromes ; Careau et al., 2008; Goulet et al., 2018, 2017b; Michelangeli et al., 2018), les patrons de co-variation du métabolisme et des pertes hydriques restent à élucider.

Ainsi, on peut faire **l'hypothèse que les conditions thermiques influencent de manière conjointe la plasticité du métabolisme et des pertes hydriques, et que l'exposition prolongée à ces conditions au cours du développement devrait conduire à des effets persistants sur le long-terme.** L'objectif ce chapitre est donc de comprendre les réponses d'acclimatation développementale du métabolisme et les pertes hydriques totales (mesurés au repos) aux conditions thermiques sur le long-terme et d'examiner leur flexibilité ainsi que les co-variations entre les deux traits.

En m'appuyant sur un jeu de données issu d'une expérience à long terme menée au CEBC sur des vipères aspics, j'ai testé les prédictions suivantes :

- (1) Les individus exposés à des cycles journaliers plus chauds devraient présenter un taux métabolique plus bas lié à une réponse de « compensation négative ».
- (2) L'exposition chronique aux conditions thermiques devrait conduire à des effets persistants sur le métabolisme et sur les pertes hydriques.
- (3) Taux métaboliques et pertes hydriques devraient être corrélées à l'échelle individuelle en raison d'un lien fonctionnel entre les traits ou d'un effet développemental influençant conjointement les deux traits.

Des vipères ont été exposés à 3 traitements climatiques (cycles thermiques journaliers imitant des climats contrastés ; « chaud » ; « intermédiaire » ; « froid ») de leur naissance à leur maturité sexuelle (4 ans), puis regroupé dans un « jardin commun » (cycle thermique « intermédiaire ») pendant 3 années supplémentaires. Tout au long de leur vie, des mesures de taux métabolique standard et de pertes hydriques totales ont été effectuées. Les vipères exposées aux conditions chaudes ont réduit de manière flexible leur métabolisme, leur permettant de compenser de près de 40% les dépenses énergétiques prédites dans un climat plus chaud. Les conditions thermiques pendant le développement ont mené à des effets sur les pertes hydriques qui ont persisté à l'âge adulte. Les jeunes vipères exposées aux cycles chaud et froid présentaient des pertes hydriques réduites à l'âge adulte. Les taux métaboliques et taux de pertes hydriques étaient corrélés positivement tout au long de la vie des vipères, indépendamment des conditions environnementales.

Cette étude démontre l'existence de deux réponses plastiques contrastées aux conditions thermiques développementales : un ajustement flexible du métabolisme et une plasticité développementale irréversible des pertes hydriques. La co-variation du métabolisme et des pertes hydriques entre et au sein des individus au cours de 7 ans de mesure suggère l'existence d'un syndrome reliant ces traits régulant les balances énergétiques et hydriques (**Figure 32**).

Dans ce chapitre, les résultats sont présentés sous la forme d'un article rédigé en anglais et publié dans *Functional Ecology* (**Article 1**). L'article est présenté dans cette section dans un format facilitant la lecture.

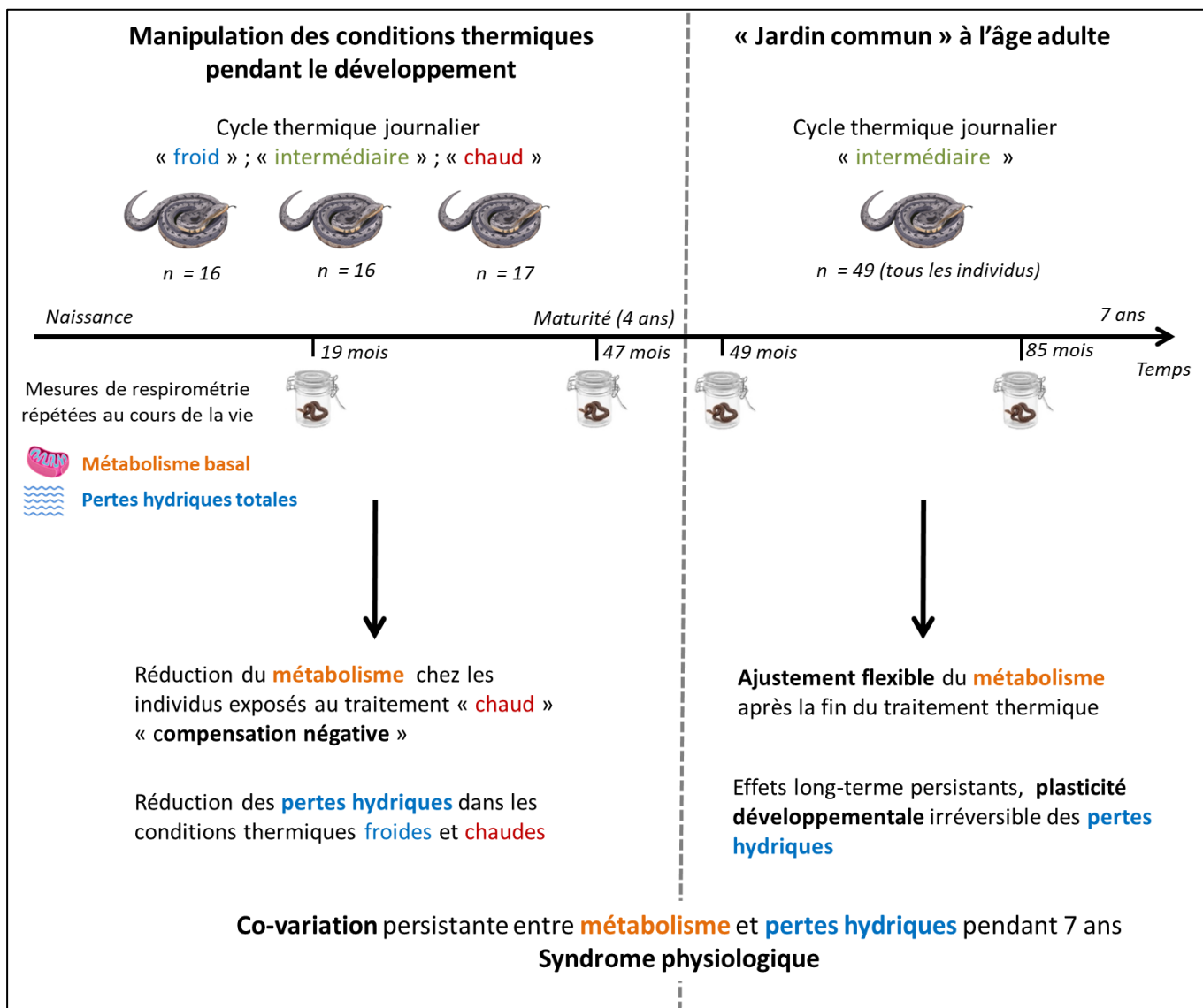


Figure 32 : Synthèse des résultats de l'Article 1.

I.2 Article 1

Running title: determinant of lifetime metabolic and water loss rates of a dry-skinned ectotherm

Additive effects of developmental acclimation and physiological syndromes on lifetime metabolic and water loss rates of a dry-skinned ectotherm

Mathias Dezetter^{1,2,*}, Andréaz Dupoué¹, Jean François Le Galliard^{1,3}, Olivier Lourdais^{2,4}

¹ CNRS Sorbonne Université, UMR 7618, iEES Paris, Université Pierre et Marie Curie, Tours 44-45, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

² Centre d'étude biologique de Chizé CNRS, UMR 7372, 79360, Villiers en Bois, France

³ Ecole normale supérieure, PSL Research University, Département de biologie, CNRS, UMS 3194, Centre de recherche en écologie expérimentale et prédictive (CEREPEP-Ecotron IleDeFrance), 78 rue du château, 77140 Saint-Pierre-lès-Nemours, France

⁴ School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

* Correspondence:

Mathias Dezetter, CEBC UMR 7372 CNRS-ULR

79360 Villiers en Bois, FRANCE

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

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

E-mail: mathias.dezetter@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-5083-624X

Accepted in *Functional Ecology*

Abstract

1. Developmental plasticity and thermal acclimation can contribute to adaptive responses to climate change by altering functional traits related to energy and water balance regulation. How plasticity interacts with physiological syndromes through lifetime in long-lived species is currently unknown.

2. Here, we examined the impacts of long term thermal acclimation in a long-lived temperate ectotherm (*Vipera aspis*) and its potential flexibility at adulthood for two related functional traits: standard metabolic rate (SMR) and total evaporative water loss (TEWL).

3. We used climatic chambers to simulate three contrasted daily thermal cycles (warm, medium and cold) differing in mean temperatures (28, 24, and 20°C respectively) and amplitudes (5, 10 and 13°C respectively) during immature life (0 to 4 years of age). Individuals were then maintained under common garden conditions (medium cycle) for an additional 3-years period (4 to 7 years of age). SMR and TEWL were repeatedly measured in the same individuals throughout life during and after the climate manipulation.

4. Individuals reduced their SMR (negative compensation) when experiencing the warm cycle but flexibly adjusted their SMR to common garden conditions at adulthood. In addition, thermal conditions during the juvenile life stage led to changes in TEWL persisting until adulthood.

5. We further found consistent intra-individual variation for SMR and TEWL and a positive intra-individual and inter-individual covariation between them throughout life. Thus, plastic responses were combined with a physiological syndrome linking SMR and TEWL.

6. Our study demonstrates the capacity of long-lived organisms to flexibly shift their SMR to reduce daily maintenance costs in warmer and less variable thermal environments, which might be beneficial for low energy specialist organisms such as vipers. It further suggests that thermal conditions provide cues for developmental changes in TEWL. Beside plasticity, contrasted individual physiological syndromes could be selected for and contribute to the response to climate change.

Keywords: metabolism, physiology, plasticity, temperature, water loss

Introduction

Physiological plasticity refers to the ability of an organism to change its physiological state in response to external cues and is an important process for coping with thermal variations (Bonamour et al., 2019; Fuller et al., 2010). In particular, physiological plasticity in response to changes in thermal conditions might determine ‘winner or losers’ in the context of global warming (Seebacher et al., 2015c; Somero, 2010). Thermal plasticity involves a range of distinct but interconnected mechanisms including flexible acclimation responses (shift in physiological routines throughout life) and developmental plasticity (persistent effects induced during development; da Silva et al., 2019; Healy et al., 2019; Sultan, 2017). Recent attention has focused on physiological acclimation capacity to a persistent increase in environmental temperatures (Angilletta, 2009; Huey et al., 2012). Thermal acclimation response for ectotherms involves shifts in physiological responses, which thereby changes the optimal temperature for biological process, and the temperature tolerance limits (Angilletta Jr., 2009; Seebacher, 2005). Such responses are critical to cope with global warming for long-lived ectotherms because of their presumed limited potential for rapid genetic evolution (Chevin et al., 2010; Seebacher et al., 2015c; Urban et al., 2014). Yet, uncertainty surrounds the speed and breadth of thermal acclimation responses and their efficiency as a means to buffer ectotherms from global warming (Gunderson & Stillman, 2015; Havird et al., 2020; Morley et al., 2019; Rohr et al., 2018; Seebacher et al., 2015).

There are several reasons why we might underestimate the true acclimation capacity of long-lived terrestrial ectotherms such as some species of amphibians and reptiles. First, most experiments on these organisms do not last long enough to ensure that individuals are fully acclimated (Rohr et al., 2018; Seebacher et al., 2015c). Time to acclimate is typically longer for large-bodied species, based on energetic models and empirical evidence (Kingsolver & Huey, 2008; Pörtner et al., 2017) and recent comparative analyses across a diversity of ectothermic organisms (Rohr et al., 2018). Long-term (> 1 year) acclimation studies are crucial to investigate the plastic responses of long-lived ectotherm but are very rare. Second, the flexibility of phenotypic responses to acclimation temperatures is rarely tested for, and how persistent are the effects of developmental plasticity remains unknown for most organisms (Beaman et al., 2016; Ligon et al., 2012). Irreversible acclimation responses to developmental conditions might lead to maladaptive mismatches between the phenotype and ecological conditions in highly variable and unpredictable environments (Gluckman et al.,

2007; Piersma and Gils, 2011). Therefore, the ability of organisms to flexibly adjust their phenotype to environmental variations throughout their lifetime may determine their capacity to cope with climate change (Morley et al., 2019; Pallarés et al., 2020). Similarly, whether plastic responses supersede fixed inter-individual differences in physiology has been poorly investigated so far, despite evidence of consistent physiological syndromes in some ectotherms (Goulet et al., 2017a; Mell et al., 2016).

In ectotherms, SMR represents the minimal energy requirements to fuel maintenance energy demands, and variation in SMR within and between species may faithfully reflect life history strategies (Clarke, 2006; Seebacher et al., 2015c). Considerable variation in MR exists within and between species (Careau et al., 2019), potentially reflecting thermal adaptations (Addo-Bediako et al., 2002) and additive constraints from habitat aridity (Dupoué et al., 2017). Within species, individuals can respond to thermal fluctuations through MR modulation (Noble et al., 2018; While et al., 2018). For instance, after exposure to warm temperatures, MR may decrease (“negative compensation”) to limit the energy costs of self-maintenance and minimize oxidative stress (see Costantini, 2008, Angilletta, 2009; Norin et al., 2014). Temperature is also a proximate cue for water constraints inducing adjustment of evaporative water loss (TEWL see Riddell et al., 2019). In terrestrial species, a universal cost of metabolic gas exchange is the loss of water vapor such that there could be a functional trade-off between SMR and TEWL (Woods & Smith, 2010). Because climate change will affect both energy and water balance, considering jointly SMR, TEWL and associated tradeoffs between both is required (Riddell & Sears, 2020; Riddell et al., 2018b). Individual variation in metabolism can co-vary with variation in other physiological or in personality traits through consistent pace-of-life syndromes, where “fast” phenotypes are characterized by a higher SMR (Biro & Stamps, 2010; Careau et al., 2019, 2014). Thus, phenotypic correlations may also exist between SMR and TEWL and could influence individual sensitivity to temperature and water constraints. Despite its relevance, the long-term developmental effect on variation and co-variation in SMR and TEWL has not been addressed to date, and the pace-of-life syndrome framework has not been extended yet to these functionally related traits.

We used a 7-years long experiment to characterize the long-lasting consequences of thermal conditions on the asp viper (*Vipera aspis*), a temperate ectotherm with a late sexual maturation (age at maturation between 3 to 4 years depending on growth; Bonnet et al., 1999) and a relatively long generation time (maximum lifespan >10 years) compared to other

squamate reptiles. We hypothesized that thermal conditions should shape both SMR and TEWL, and that chronic exposure would result in persistent effects. We applied three contrasted daily thermal cycles (warm, medium, and cold) with contrasted temperature and thermal amplitude from birth to sexual maturity (4 years). Individuals were then placed in a common garden treatment (medium thermal cycle) during their adult life (from 4-7 years old). Building up from previous findings in ectotherms, we tested the following three predictions. First, individuals raised in the warmest thermal cycle should exhibit the lowest SMR due to a negative compensation (Bruton et al., 2012; Clarke, 2006; Zari, 1996). Second, chronic exposure to the thermal treatments during growth should lead to persistent acclimation responses in both SMR and TEWL (Nettle & Bateson, 2015; Refsnider et al., 2019). Third, SMR should correlate with TEWL among and within individuals because of a functional relationship between the two traits (e.g., water loss caused by ventilation) and/or to some persistent early environment or genetic effects on an underlying trait influencing both SMR and TEWL (Riddell et al., 2018a; Rozen-Rechels et al., 2019).

Material and Methods

Thermal treatment and experimental design

The use of realistic thermal treatment mimicking natural condition is of critical importance to address the impact of climatic changes on physiological responses (Morash et al., 2018; Potter et al., 2013b). The asp viper is a diurnal species that behaviorally thermoregulates to reach preferred temperature close to 30°C (Lorioux et al., 2013b). At night this species will usually hide in a shelter and body temperature will fluctuate with the temperature of the resting habitat. This implies that warmer climate conditions within the thermal critical limits will lead to an extended time spent at the basking temperature, and exposure to warmer nighttime temperatures in vipers (Davy et al., 2017), as predicted by mechanistic models and as seen in empirical studies of heliothermic squamate reptiles (Blouin-Demers & Weatherhead, 2001). This implies higher mean body temperature and to lower thermal variability in a warmer climate.

Therefore, we simulated three realistic daily thermal cycles (Fig. 1A, here after designated as “warm”, “medium” and “cold” cycles) that differed in mean temperature (28, 24 & 20°C respectively) but also in the time at preferred temperature and daily amplitude. Preferred temperature (30°C) was simulated in all of our treatments but with different durations (14, 9

and 5 hours in warm, medium and cold cycles). We also simulated different night-time temperatures (25, 20°C and 17°C respectively in warm, medium and cold cycles; see Fig. 1A). Thus, daily thermal amplitude differed between groups (5, 10, and 13°C respectively). For all treatments, relative humidity was set at a constant value of 50% and water vapor pressures deficit were respectively, 1.91 kPa (warm cycle), 1.55 kPa (medium cycle) and 1.24 kPa (cold cycle). We simulated these cycles using three climatic chambers (Vötsch VP 600, Balingen, Germany) with the SIMPATI software (ver.2.06 Vötsch).

We used 49 captive-born snakes from a colony of aspic vipers maintained in the Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, France. Mothers were collected in west-central France from neighboring populations and were reproduced in captivity where they were maintained in the same standard conditions during pregnancy (see Lориoux et al., 2013 for details on maintenance conditions and thermal cycles). From birth (September-October 2009) to maturity (October 2013), individuals were randomly assigned within families to one of three treatment (n=16, 16 and 17 respectively for warm, medium and cold cycle; see Fig. 1B). In November 2013, we transferred all adult individuals to a common garden at the medium cycle for an additional 3-year period (Fig. 1A). Individuals exposed to the medium cycle during development were thus kept in the same conditions across the experimental timeframe. Individuals from hot and cold cycles were exposed to new thermal conditions when transferred to the common garden, allowing us to test for the flexibility of acclimation responses in these treatment groups.

Snakes were housed individually in plastic boxes (35 x 25 x 13 cm) with ad-libitum access to drinking water in a glass bowl. In all experimental treatments, photoperiod followed that of natural day light cycles. We fed the vipers with thawed laboratory mice (*Mus musculus*). The size of the mice was scaled at 20% (± 10) of the snake mass. Digestion rate, feeding intake and feeding performance increases with temperature in vipers (Naulleau, 1983; Vincent & Mori, 2007), and the maximum feeding rate is therefore strongly constrained by environmental temperatures. In order to avoid providing food that cannot be processed and digested at low temperatures, we adjusted the feeding regimes to each thermal treatment in order to allow *ad libitum* feeding rates (every 7, 10 and 15 days for warm, medium and cold cycles respectively).

Laboratory measurements

To investigate how experimental treatments affected growth rate, we weighed ($\pm 0.01\text{g}$) and measured (snout-vent-length, SVL $\pm 0.5\text{cm}$) all individuals throughout their life. Body mass (BM) was measured at birth and then at the same time points as the respirometry exchanges measurements (see below), while we measured SVL at birth, and when snakes were 30, 49 and 85 month-old. To assess both short-term and long-term phenotypic responses, we quantified SMR and TEWL during four successive measurement sessions (Fig. 1B). We measured respiratory exchanges when individuals were 19 and 47 month-old in order to examine to pace of the acclimation response during the development period exposed to contrasted thermal treatments. We conducted measurements 3 months after the beginning of the common garden situation (at 49 month-old) in order to detect any quick changes in SMR or TEWL that may occur following the change in thermal conditions. Later, we realized a last measurement session 3 years later (at 85 month-old) in order to test for long-term persistent effects of developmental plasticity.

Respiratory exchanges

We measured the rate of oxygen consumption ($\dot{V}O_2$ proxy for SMR; $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$) and the total evaporative water loss (TEWL; $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$) on resting individuals at two test temperatures (20°C and 30°C), to calculate Q10 and acclimation response (Einum et al., 2019; Havird et al., 2020). We randomized temperature trials for each individual. To measure $\dot{V}O_2$, we used a closed-system respirometry at 19 months post- birth measurements because of the small size of the snakes, and an open-flow respirometry system at 47, 49 and 85 months post-birth measurements (see detailed methods regarding respirometry systems on Appendix S1 in Supporting Information). We measured TEWL together with $\dot{V}O_2$ using the open flow-system (Fig. 1A). We measured gas exchanges at night on post-absorptive snakes after a minimum of 7 days of fasting. To stabilize the test temperatures and avoid exploratory behaviors, we placed each individual in the temperature-controlled chamber to acclimate for 3 h prior to each measurement.

A

Daily temperature cycles

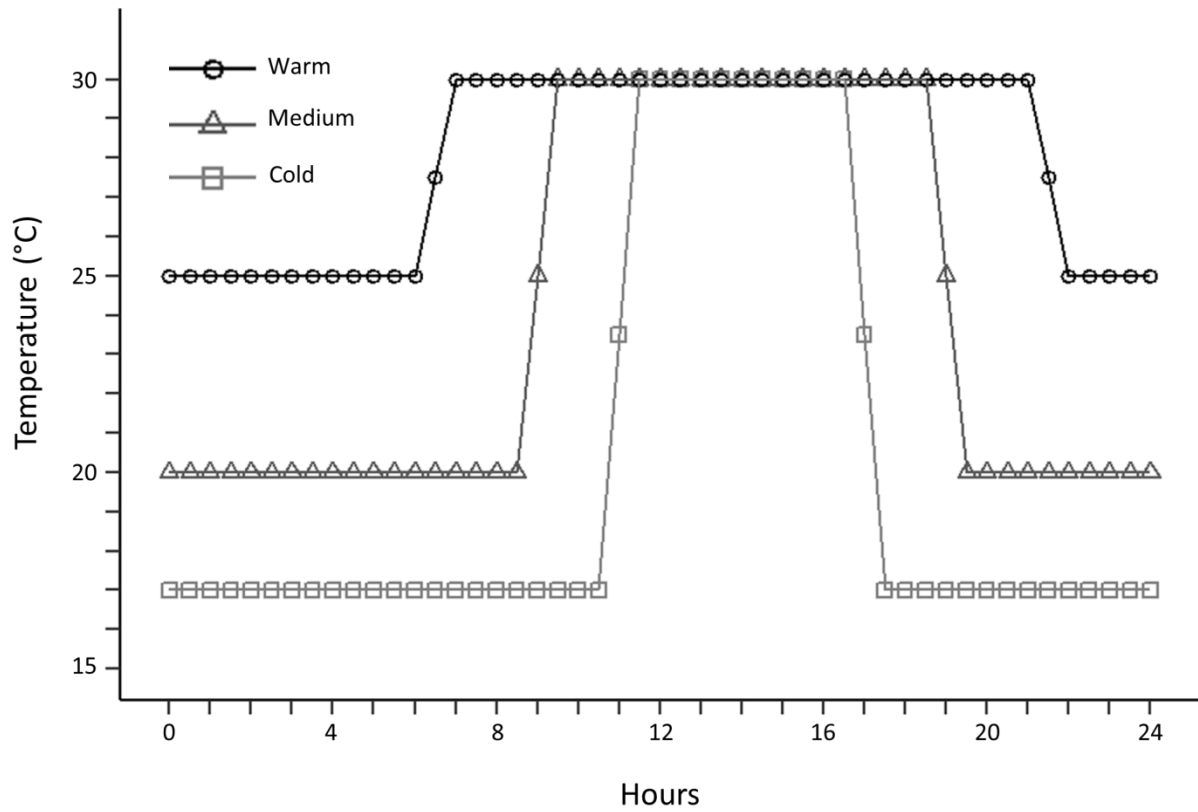
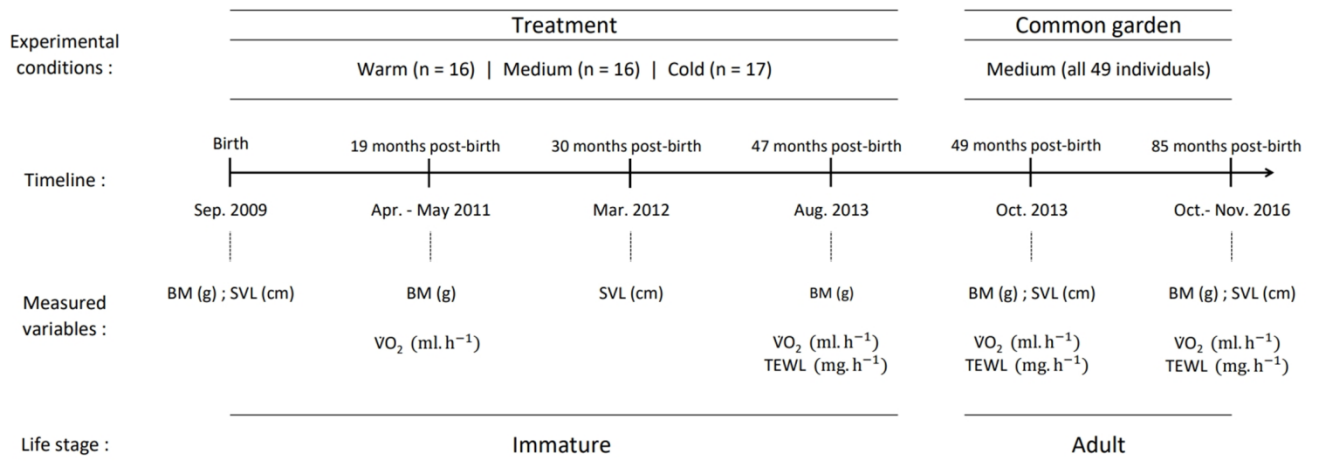
**B**

Figure 1. **A)** Daily temperature (°C) cycle applied for each thermal treatment (warm, medium, cold). **B)** Experimental design and variables collected through time. 19 and 47 months post-birth are during the time in which vipers were exposed to thermal treatments, while sessions 49 and 85 months post-birth are during the time in which vipers were in a common garden. $\dot{V}O_2$ is the oxygen consumption (standard metabolic rate); TEWL is Total Evaporative Water Loss; SVL is Snout-Vent Length; BM is Body Mass.

Statistical analyses

All analyses were performed in the R environment, version 3.6.3 (Holding the windsock, (R Core Team, 2020))

Linear model to estimate treatment effects on growth rate

Growth rate for SVL was computed for each individual during three successive life stages (see Figure 1 and Table 1) and analyzed with a linear model including effects of initial SVL, sex, treatment groups and first order interaction.

Bayesian models to estimate treatment effects on BM, SMR and TEWL

We fitted linear mixed models using a Bayesian inference approach with Markov Chain Monte Carlo (MCMC) techniques from the *MCMCglmm* library (Hadfield, 2009). Results from Bayesian models are further presented as medium estimates \pm 95% highest posterior density intervals (HPDI). To investigate independently the effects of experimental conditions on body mass and physiological trait, we first ran univariate mixed effects models with individual identity and mother identity included as random intercepts. In these univariate models, the variance attributed to individual identity represents the intra-individual variance V_I , whereas the variance attributed to maternal identity represents the intra-litters variance V_m . For each univariate model, treatment group (warm, medium, or cold cycle), effects of session (see Figure 1), and their interaction were included as fixed factors. The SMR, TEWL, BM trait values were treated as the dependent variable in each univariate model. In univariate models for BM, we included sex as a factor to account for sexual dimorphism. In univariate models for SMR and TEWL, we tested the effect of the ambient temperature during the measurement by including trial temperature (20 or 30°C), along with its interactions with treatment and session, as factors. Because BM can strongly influence SMR and TEWL, individual mass at the time of measurement was also included as a covariate in these univariate models but we did not include sex based on preliminary analyses indicating no sexual differences in metabolism and water loss rates.

We ran the full model including all variables and interactions following standard guidelines of the *MCMCglmm* package (Hadfield, 2009). The analysis was performed on raw variables, assuming a Gaussian distribution of the residuals, and poorly informative priors for fixed effects (Gaussian distributed with zero mean and large variance), and uncorrelated poorly

informative priors for variance components (inverse Wishart distribution with $nu = 0.004$ and V set at 1). The MCMC algorithm was set to 120,000 iterations after a minimum burn-in phase of 10,000 iterations to allow convergence and using a thinning interval of 50 to avoid autocorrelation issues. We examined the posterior distribution of model estimates, calculated autocorrelation terms to evaluate independence of the samples in the posterior distributions, and performed half-width tests of convergence, which showed satisfactory properties of the sampling distribution. Using the full model, we then tested for the significance of random effects using model comparison with the deviance information criterion (DIC).

We next performed a model selection procedure of the fixed effects based on DIC and the posterior probability associated to the null hypothesis or pMCMC. To ease interpretation of the results, we further conducted Tukey post-hoc comparisons using the posterior chains of parameter estimates converted into posterior samples of contrasts with the *emmeans* package (Lenth et al., 2020). Note that the results of the *MCMCglmm* model selection for univariate models were similar to those of classical, maximum likelihood based approaches fitted with the *lme* procedure (Pinheiro & Bates, 2006).

Bivariate mixed model to estimate phenotypic correlation between SMR and TEWL

We estimated the phenotypic correlation between SMR and TEWL by including the two as dependent variables in a bivariate mixed model and allowing a heterogeneous residual variance structure. The bivariate model included a regression with body mass, an additive temperature effect, a two-way interaction between treatment and session, residual variance components V_e for SMR and TEWL and a covariance between the trait-specific V_e (COV_e), random intercept variance of individual identity V_I for SMR and TEWL and a covariance between trait-specific V_I (COV_I). We performed this analysis on centered and scaled variables, assumed a Gaussian distribution of the residuals, and used poorly informative priors for fixed effects (Gaussian distributed with zero mean and large variance) and uncorrelated poorly informative priors for variance components (inverse Wishart distribution with $nu = 2$ and V set at 0.5). The MCMC algorithm was run for 60,000 iterations with a burn-in phase of 10,000 iterations and a thinning interval of 25. We used the DIC to test the significance of the covariance terms and calculated intra-individual (r_e), inter-individual (r_I) and total (r_T) phenotypic correlations from the sampled distributions.

Quantification of the compensation

We used a Q_{10} formulation of the Arrhenius equation relating metabolic and water loss rates with temperature to calculate the predicted energy budget during inactivity and total evaporative loss during the day for each viper from each treatment at each measurement session. The Q_{10} formulation of a process rate R can be written as:

$$R(T) = R(20^{\circ}\text{C}) \times Q_{10}^{(T-20)/10} \quad (1)$$

where $R(T)$ is the predicted process rate at temperature T , $R(20^{\circ}\text{C})$ is our reference process rate at 20°C and Q_{10} is the ratio of the process rate at 30°C and 20°C . We calculated Q_{10} for each viper at each measurement session. We then used equation (1) to calculate the predicted SMR and TEWL over each 30 minutes' time bin from the daily nycthemeral cycle of ambient temperatures for each treatment group of the viper. Daily energy expenditure during inactivity (DEEi; cal.day⁻¹) and daily total evaporative water loss (DEWL; mg.day⁻¹) were calculated by summing the predicted SMR and TEWL over each 30-minute time bin through a day. This calculation therefore accounts for both acute effects of temperature (through individual Q_{10} and the nycthemeral cycle) and acclimation effects of temperature (through changes in $R(20^{\circ}\text{C})$ and Q_{10} among treatments). To quantify the degree of metabolic and water loss compensation induced by the observed acclimation response, we compared the DEEi and DEWL of each treatment group at each session with those predicted by a null model. Individuals had lower SMR in response to warmer and less variable temperatures (see results below). Thus, in order to quantify how much individuals saved energy through acclimation to warmer and less variable temperatures, the null model for DEEi assumed no warm acclimation response. We therefore used the mean $R(20^{\circ}\text{C})$ and Q_{10} of vipers from the cold cycle to predict the DEEi from the warm and medium cycle treatment in the absence of metabolic acclimation. We estimated the degree of metabolic compensation only at 19 and 47 months post-birth because the acclimation response in SMR did not persist at adulthood in the common garden (49 and 85 months post-birth, see Fig. 2A). In addition, individuals had lower TEWL in both cold and warm cycle treatment than in medium treatment (see results below). In order to quantify the compensation in DEWL induced by lower TEWL, the null model for DEWL therefore used the mean $R(20^{\circ}\text{C})$ and Q_{10} from vipers from the medium cycle treatment as a baseline reference for the two other groups.

Results

Morphological differences between treatments

There was strong inter-individual variation in body mass but a negligible variation among littermates in the full model (DIC, full model: -929.76, model without V_I : -644.09, model without V_m : -929.57). The change in body mass through time was weakly influenced by a sex-specific effect of treatment groups (DIC, full model: -929.76; full model without three-way interaction: -927.7). In females, body mass did not change between treatments but increased through time faster than in males, especially between session 2 and session 3 (analysis on subset of females data; DIC, model with Treatment \times Time: -453.2, model without Treatment \times Time: -457.7). In males, body mass was weakly influenced by treatments (analysis on subset of males data; DIC, model with Treatment \times Time: -475.02, model without Treatment \times Time: -473.98) because males from the cold cycle were slightly bigger at 19 months post-birth than males from the two other treatments (Tukey post-hoc contrast between cold and warm cycle: 0.104 [-0.034, 0.244] 95% HPDI, warm and medium cycle: 0.099 [-0.034, 0.237] 95% HPDI see Table S1). After accounting for these fixed effects, the inter-individual variation in body mass was highly significant ($R_I = 0.660$ [0.523, 0.743] 95% HPDI).

Growth rate measured in each life stage differed between sexes consistently (faster growth in females, all $P < 0.001$) and also between treatments from birth to 30 months post-birth ($F_{2,44} = 6.69, P = 0.003$) and from 49 months post-birth to 85 months post-birth ($F_{2,44} = 3.75, P = 0.03$). During the acclimation phase, vipers grew longer in the warm cycle than in the medium and cold cycle. During the common garden phase at adulthood, there was a compensatory growth response in vipers from the medium and cold cycle, which reached slightly higher SVL than vipers from the warm cycle group at 85 months post-birth (see Table 1).

Table 1. Descriptive statistics (mean and SE) for body mass and body size (SVL) of aspik vipers maintained in three different thermal conditions during immature life stage (birth to 47 months post-birth) and kept in common environmental conditions during adult life stage (49 and 85 months post-birth).

		Treatment group (sample size)		
		Warm (16)	Medium (16)	Cold (17)
Body mass (g)	Time of measurement			
Females (24)	Birth	6.51 ± 0.35	7.12 ± 0.38	7.32 ± 0.41
	19 months post-birth	17.86 ± 2.05	22.97 ± 1.7	21.18 ± 2.08
	47 months post-birth	117.31 ± 4.94	125.89 ± 4.66	139.29 ± 5.55
	49 months post-birth	112.39 ± 4.31	126.40 ± 4.74	137.61 ± 4.42
	85 months post-birth	156.50 ± 8.84	172.41 ± 7.02	187.79 ± 4.57
Males (25)	Birth	7.23 ± 0.55	7.12 ± 0.24	7.12 ± 0.37
	19 months post-birth	17.89 ± 1.97	17.62 ± 1.54	23.13 ± 2.57
	47 months post-birth	89.80 ± 7.78	77.89 ± 3.93	79.72 ± 4.07
	49 months post-birth	83.65 ± 7.07	76.26 ± 3.85	80.19 ± 4.22
	85 months post-birth	88.93 ± 7.11	79.62 ± 4.69	86.03 ± 4.32
Body size (cm)	Time of measurement			
Females (24)	Birth	17.91 ± 0.49	18.27 ± 0.38	18.2 ± 0.49
	30 months post-birth	41.28 ± 1.46	38.12 ± 1.82	36.22 ± 2.42
	49 months post-birth	52.36 ± 1.18	50.86 ± 2.25	50.5 ± 3.02
	85 months post-birth	55.22 ± 1.2	56.93 ± 1.55	58.44 ± 1.23
Males (25)	Birth	18.09 ± 0.46	18.47 ± 0.46	18.7.12 ± 0.27
	30 months post-birth	39.22 ± 2.11	36.5 ± 2.11	37.39 ± 1.56
	49 months post-birth	46.54 ± 2.18	45.48 ± 2.18	46.92 ± 1.28
	85 months post-birth	47.36 ± 2.25	46.89 ± 2.25	47.83 ± 1.19

Univariate models for SMR and TEWL

According to our model selection procedure, there was strong inter-individual variation in SMR and comparatively little variation among littermates in the full model (DIC, full model: -186.69, model without V_I : -171.7, model without V_m : -186.03). Regarding the fixed effects (see Table S2), SMR increased with body mass (pMCMC > 0.001) and was higher at 30°C than at 20°C (pMCMC > 0.001), but neither the treatment group nor the trial temperature influenced the allometric relationship with body mass (pMCMC > 0.10). Independently from body mass, treatment groups influenced SMR differently through time and trial temperature levels (DIC, model without V_m and without Treatment \times Time \times Temperature: -182.3). At 20°C, vipers raised in the warm cycle treatment had slightly lower SMR than vipers raised in the medium and cold cycles during the acclimation phase (19 and 47 months post-birth) and this difference was significant three months after the end of the manipulation (49 months post-birth; post-hoc contrasts of the median posterior distribution, see Fig. 2A). Two years later, at 85 months post-birth, SMR values were not different between treatments irrespective of body temperatures. At 30°C, vipers raised in the warm cycle treatment had significantly lower SMR than vipers raised in the medium and cold cycles during the acclimation phase (19 and 47 months post-birth), but this difference vanished right after the end of the manipulation (49 and 85 months post-birth, see Fig. 2A). After accounting for these fixed effects, the inter-individual variation in SMR was significant but relatively small ($R_I = 0.129$ [0.049, 0.231] 95% HPDI).

Similarly, there was inter-individual variation in TEWL and comparatively little variation among littermates in the full model (DIC, full model: -97.7, model without V_I : -66.2, model without V_m : -97.9). The TEWL increased with body mass similarly between treatment and temperature groups (pMCMC > 0.05) and was higher at 30°C than at 20°C (pMCMC > 0.001). Contrary to SMR, treatment groups significantly influenced TEWL independently from time and trial temperature (see Table S2). On average, vipers raised in the medium cycle treatment displayed consistently higher TEWL rates through lifetime relative to the warm treatment (Tukey post-hoc contrast: 0.1203 [0.0281, 0.2141] 95% HPDI) and also slightly higher TEWL than in the cold cycle treatment (Tukey post-hoc contrast: 0.092 [-0.0035, 0.1827] 95% HPDI) irrespective of trial temperature (see Fig. 2B). After accounting for these fixed effects, the inter-individual variation in TEWL was significant and twice than the one for SMR ($R_I = 0.237$ [0.115, 0.373] 95% HPDI)

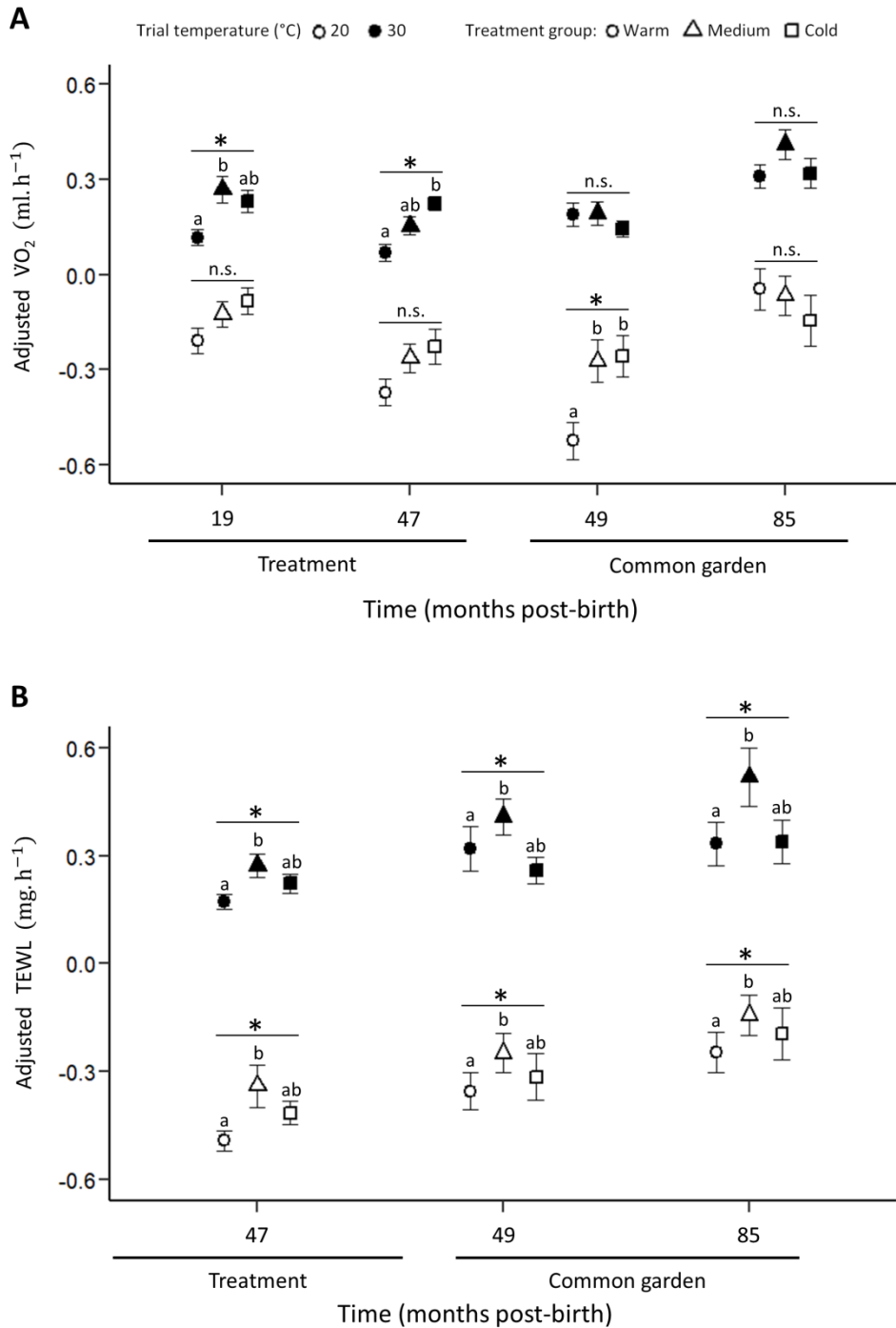


Figure 2. Effect of the thermal treatments on the residual standard metabolic rate (log transformed $\dot{V}O_2$ provided in mL per hour, **A**) and residual total evaporative water loss (log transformed TEWL provided in mg per hour, **B**) measured at different time points through lifetime (see Figure 1) at 20°C and 30°C body temperatures. Residual SMR and TEWL scores were calculated from a log-log regression of individual raw values with body mass and thus accounts for ontogenetic and inter-individual variation in body mass. Error bars represent SE. The * sign and different letters indicate significant differences among treatment groups based on Tukey post-hoc tests of contrasts performed A) in each treatment and temperature group, B) on average for all treatment and temperature group. ns = not significant

Bivariate models for SMR and TEWL

The bivariate mixed models indicated that both the intra-individual and inter-individual covariance between SMR and TEWL were positive and significantly different from zero as shown by the DIC (full model: DIC = 1173.91, COV_e set to zero: DIC = 1268.6; COV_I set to zero: DIC = 1198.21; see Table 2). The inter-individual correlation was slightly larger ($r_I = 0.69$ [0.46, 0.88] 95%CI) than the intra-individual correlation ($r_e = 0.60$ [0.51, 0.68] 95%CI) and the total phenotypic correlation ($r_P = 0.44$ [0.15, 0.75] 95%CI, see Fig. 3A and 3B).

Table 2. Variance and covariance components for residual (V_e and COV_e) and individual (V_I and COV_I) intercept of centered and scaled standard metabolic rate (SMR) and total evaporative water loss (TEWL) rates in aspic vipers after controlling for trait-specific allometric relationships with body mass and treatment-specific changes through time. Estimates are from the posterior-distribution of (co)variance matrices.

Trait	Variance component	Estimate \pm 95% CI
SMR	V_e	0.400 [0.33, 0.482]
	V_I	0.252 [0.107, 0.415]
TEWL	V_e	0.569 [0.463, 0.671]
	V_I	0.217 [0.08, 0.367]
SMR-TEWL	COV_e	0.286 [0.217, 0.363]
	COV_I	0.168 [0.048, 0.324]

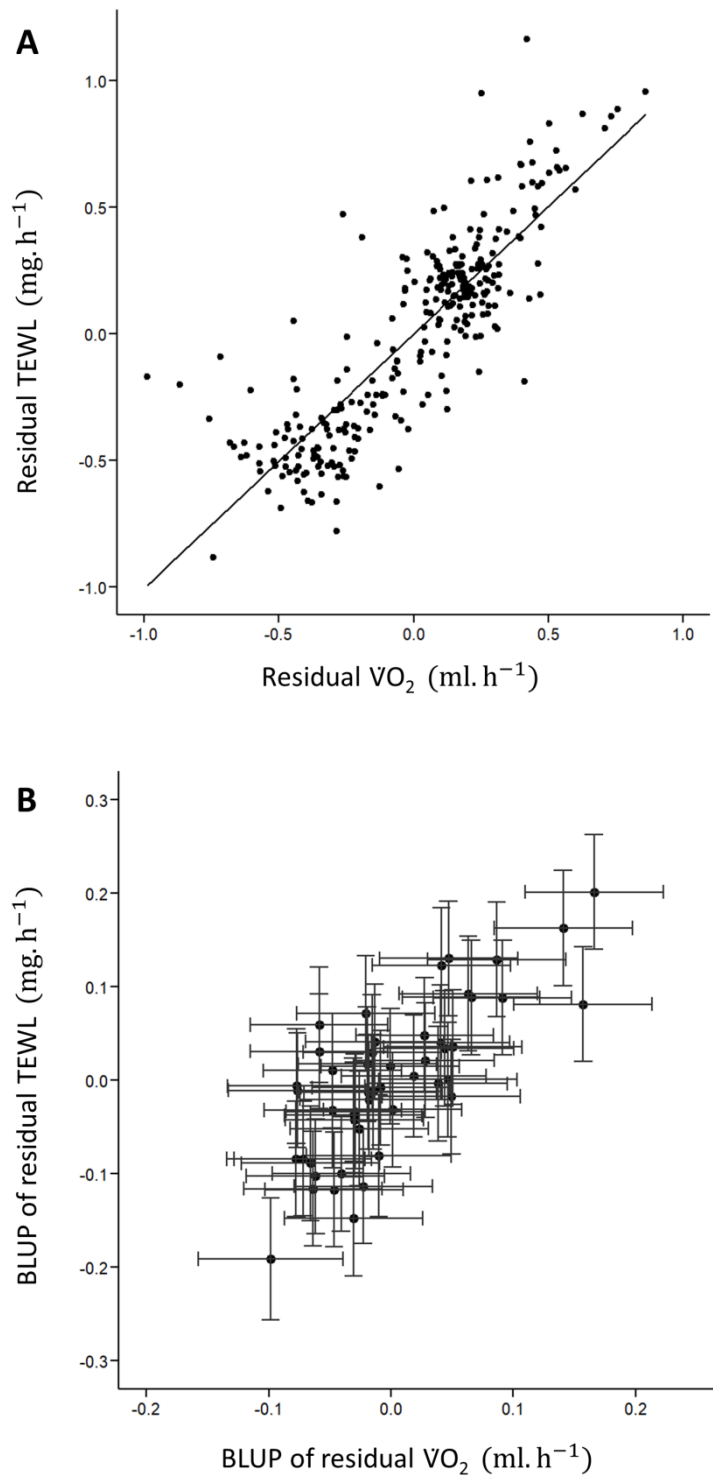


Figure 3. **A)** Residual total evaporative water loss (log transformed TEWL provided in mg per hour) against residual standard metabolic rate (log transformed $\dot{V}O_2$ provided in mL per hour) for all aspik vipers across all lifetime stages, treatments and temperatures. **B)** Best linear unbiased predictors (BLUP) of residual $\dot{V}O_2$ for the random effect of identity as function of BLUP for TEWL for all aspik vipers with concurrent measurements of $\dot{V}O_2$ and TEWL at the same lifetime stage. BLUPs and associated standard errors were extracted from univariate mixed models.

Metabolic and water loss compensation

Individuals from warm and medium cycle treatment groups had lower predicted DEEi than expected in the null model without an acclimation response. Individuals from the warm cycle treatment compensated for approximately 40% of their DEEi at both 19 and 45 months post-birth. In the medium cycle treatment group, individuals compensated for 28.5 % of their DEEi at 45 months post-birth (Table 3, Fig. 4A). Similarly, DEWL was lower than expected in the null model without an acclimation response for individuals from the warm and cold cycle treatment groups. At 47 months post-birth, DEWL was reduced by 36.4 % for individuals acclimated to the warm cycle treatment, and by 24.2 % for individuals acclimated to the cold cycle treatment. At 49 months post-birth individuals acclimated to the cold cycle treatment compensated for 32.7 % of their DEWL, and individuals acclimated to the warm cycle treatment compensated for 49.5 % of their DEWL at 85 months post-birth (Table 3, Fig. 4B).

Table 3. Degree of metabolic and water loss compensation induced by acclimation response (% differences between values predicted by a null model and calculated DEEi and DEWL values) of each treatment group at each session. P values are from t-test comparing DEEi and DEWL predicted by a null model with calculated DEEi and DEWL. Because the acclimation response in SMR did not persist at adulthood in the common garden (49 and 85 months post-birth, see Fig. 2A), we estimated the degree of metabolic compensation only at 19 and 47 months post-birth.

Time of measurement	Treatment group	Degree of metabolic compensation	
19 months post-birth	Warm	38.36 %	P < 0.001
	Medium	9.34 %	P = 0.26
	Cold	0.21 %	P = 0.98
47 months post-birth	Warm	42.21 %	P < 0.001
	Medium	28.50 %	P < 0.001
	Cold	5.42 %	P = 0.61
Time of measurement	Treatment group	Degree of water loss compensation	
47 months post-birth	Warm	36.36 %	P < 0.001
	Medium	13.46 %	P = 0.15
	Cold	24.24 %	P < 0.001
49 months post-birth	Warm	27.67 %	P = 0.05
	Medium	14.92 %	P = 0.14
	Cold	32.72 %	P < 0.001
85 months post-birth	Warm	49.48 %	P < 0.001
	Medium	16.26 %	P = 0.22
	Cold	23.97 %	P = 0.08

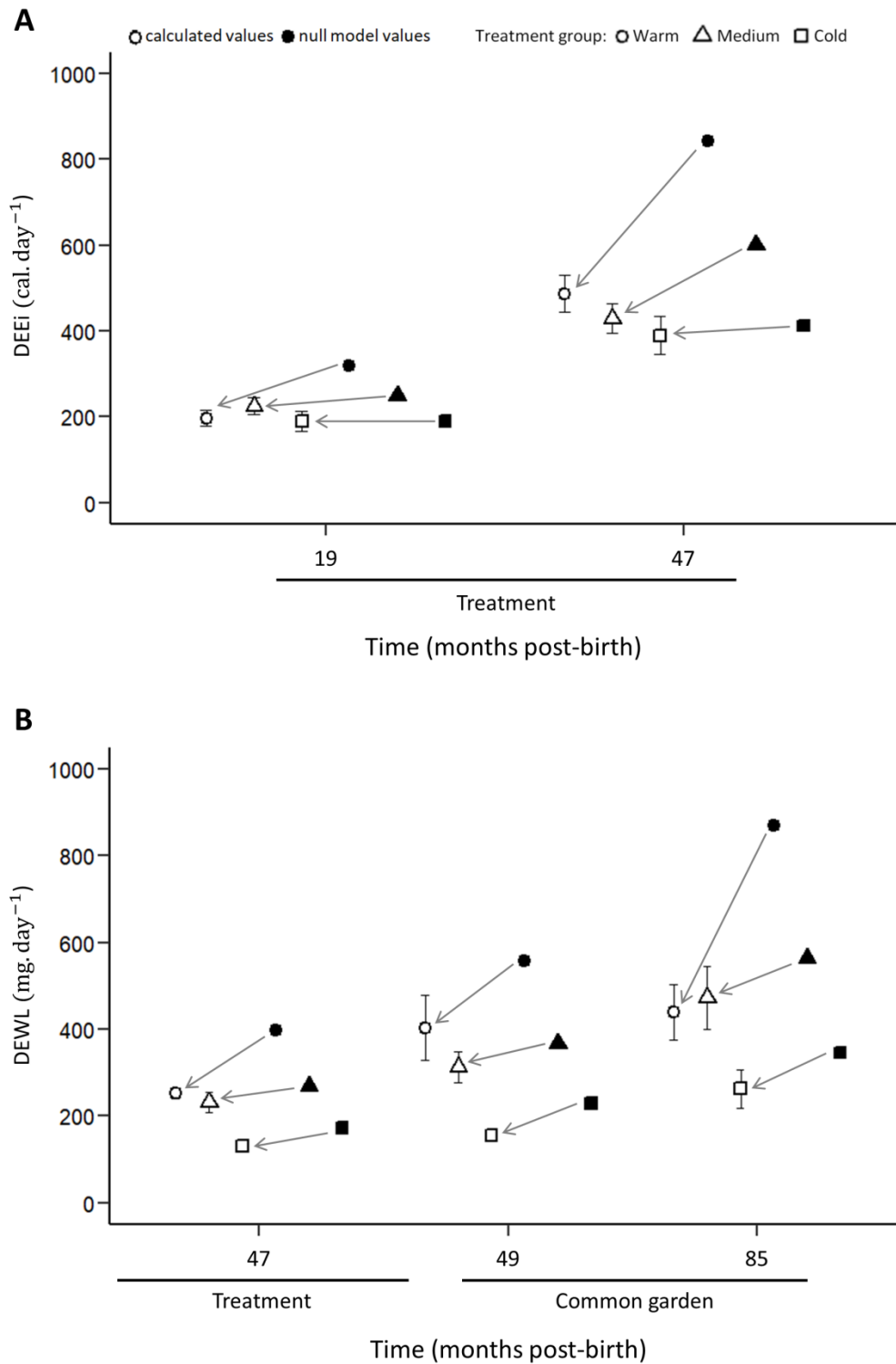


Figure 4. Daily expenditure during inactivity (DEEi), **A**) and daily total evaporative water loss (DEWL), **B**) calculated at different time points through lifetime (see Figure 1A) for each treatment group. White points represent mean values (\pm SE) of calculated DEEi and DEWL. Black points represent single values of DEEi and DEWL predicted by a null model. Arrows symbolize the degree of metabolic or water loss compensation. Because the acclimation response in SMR did not persist at adulthood in the common garden (49 and 85 months post-birth, see Figure 2A), we calculated and predicted DEEi only at 19 and 47 months post-birth.

Discussion

Thermal conditions simulated in three different daily thermal cycles led to developmental changes in TEWL that persisted at adulthood but individuals flexibly adjusted their SMR to thermal conditions experienced *in situ*. Further, we found that inter-individual variation of these two functional traits was consistent and positively correlated throughout life. This persistent phenotypic (co)variation at the individual level likely reflects a physiological syndrome linking metabolism and water loss.

Negative compensation and flexible acclimation in SMR

During the time period of exposure to contrasted treatments (until the age of 4 years old), snakes exposed to the warmest and less variable thermal conditions adjusted their SMR with a negative compensatory response (Clarke, 2006; Dupoué et al., 2017) when compared to snakes maintained at lower and more variable temperatures (medium and cold cycle). This physiological response to thermal conditions did not persist in a common garden, providing unambiguous evidence that acclimation in SMR was flexible. The compensatory response was quantified and allowed vipers to save as much as 40% of their DEE_i relative to a null model hypothetical estimate simulating no acclimation response. The asp viper is a typical capital breeder with a low feeding frequency and a slow pace of life strategy. Therefore, lower SMR is likely to be advantageous according to the “allocation model” of energy metabolism where individuals with lower SMR benefit from more energy to spend in maintenance (e.g., survival), activity and/or reproduction (Careau et al., 2008; Mathot & Dingemanse, 2015). In support of this scenario, we found that warm-acclimated vipers had both the lowest SMR and the highest growth rate. Thus, warm-acclimated snakes were able to advantageously invest more energy into growth, given their lower energetic demands. Even though the relationship between SMR and fitness can be quite variable across organisms (Arnold et al., 2021), these results confirm earlier findings where MR reduction in warm-acclimated ectotherms minimized the daily energetic costs of self-maintenance and limited oxidative stress by decreasing respiratory activity (Norin et al., 2014; Seebacher et al., 2010a). In addition, the covariation between SMR and TEWL suggests that lower SMR is likely to positively impact water balance through reduced respiratory water loss (Dupoué et al., 2015b). In colder conditions, MR may remain high to support performance, activity, and physiological functions despite lower temperatures (Berg et al., 2017). We further found that treatment-induced changes in SMR differed at body temperatures of 20 and 30°C, suggesting that

thermal acclimation changed also the acute effects of temperature on metabolism (Xie et al., 2017).

Both the mean temperature and the thermal variability from each daily cycle could drive these acclimation responses (Kern et al., 2015). At a given mean temperature, it has been suggested that a higher daily thermal fluctuation can lead to an increased tolerance to extreme temperature (Verheyen & Stoks, 2019). However, the effects of temporal variation of temperatures on acclimation responses of metabolism and other functional processes are often species dependent in ectotherms (Niehaus et al., 2011; Noer et al., 2020), and can also interact with changes in mean temperature (Bozinovic et al., 2011; Colinet et al., 2015). Further studies are required to elucidate whether acclimation responses of SMR and other functional traits in asp vipers are causally linked with changes in mean temperature, changes in the thermal variability or both. Our results however likely illustrate more realistic responses to climate change compared to findings from studies focusing on acclimation responses at a constant daily temperature because animals are exposed to climate variability in their environment and predictions from laboratory studies in complex thermal environments are more likely to predict future changes in natural populations (Morash et al., 2018).

Some SMR differences persisted among groups for a month after the beginning of the common garden (49 months post-birth, at 20°C), but no group difference in SMR was found 3 years later (85 months post-birth). This indicates that SMR responds dynamically to the thermal environment to optimize performance and satisfy daily energetic costs (Berg et al., 2017). Such reversibility is adaptive in seasonal, variable, or unpredictable environments (Piersma & Gils, 2011), and thus was likely selected for in temperate ectotherms such as the aspic viper (Little & Seebacher, 2016). In turn, the inherent capacity of these organisms to reversibly shift their SMR in response to fluctuating temperatures significantly buffers their energetic sensitivity to climate change and to extreme weather events by allowing them to compensate for the energy costs of life at warmer temperatures (Pallarés et al., 2020; Seebacher et al., 2015). Flexible metabolic shifts may be achieved by a range of short-term proximal mechanisms, such as changes in the structure (membrane fluidity, protein activity) and density of mitochondria (Chung et al., 2017; Norin & Metcalfe, 2019; Seebacher et al., 2010). Exploring the mechanisms underlying thermal acclimation of SMR in vipers would require further functional studies of their energy metabolism, especially detailed analyses of the thermal plasticity of mitochondrial activity. Additional experimental design could also

help to fully disentangle between developmental plasticity and thermal acclimation *sensu stricto* by investigating how flexible is SMR plasticity to temperature at different stages through life (Beaman et al., 2016).

Developmental plasticity in TEWL

Thermal conditions during development induced long-lasting effects on TEWL across the experimental timeframe. Thus, our study provides a clear demonstration that, at a given relative humidity, mean temperature and thermal variability can lead to developmental plasticity in a key functional trait related to water balance. Individuals raised in both the warmest and the coldest conditions (warm and cold cycles) had lower TEWL rates on average than those raised in the intermediate conditions (medium cycle treatment). Metabolic compensation associated with the warm cycle treatment may have contributed to the decrease in TEWL that we observed in this group as lower metabolic gas exchanges are associated with reduced loss of water vapor (Dupoué et al., 2015b; Riddell et al., 2018a). However, individuals raised in the cold treatment also had low evaporative water loss, despite their high oxygen consumption rates. We calculated the daily evaporative water loss (DEWL) taking into account solely the thermal dependence of TEWL. This showed that individuals from warm and cold cycles were able to reduce their DEWL by approximately 30 %, and even up to 50 % for individuals from the warm cycle treatment group at 85 months post-birth. The decrease of TEWL for snakes from the warm cycle treatment may thus be adaptive in anticipation of hotter and drier conditions by reducing DEWL and thus reducing the risks of dehydration. The fact that TEWL also decreased under the cold cycle treatment remains intriguing because the water vapor deficit was minimal and vipers had low predicted DEWL in this treatment group. This reduction in cold conditions could reflect a plastic response of TEWL to the lower absolute air humidity in this treatment or to some behavioral constraints (less frequent drinking behavior) imposed by activity restriction in cold environments. Our results suggest that mean and variance of temperature can provide a relevant cue to regulate water balance (Riddell et al., 2019) probably because temperature, water vapor pressure deficit and water constraints are correlated in natural habitats and organisms cue on temperature to assess dehydration risks (Dai, 2013). Manipulating both temperature and humidity levels will be required to elucidate how temperature and humidity levels jointly influence TEWL plasticity (Rozen-Rechels et al., 2019). Heretofore, the pace of TEWL

plasticity and the period of sensitivity during development also remain unknown, as well as the proximal mechanisms involved.

Persistent individual differences and covariation between SMR and TEWL

Phenotypic (Baškiera & Gvoždík, 2020; Careau et al., 2019; Nilsson et al., 2009) and quantitative genetic (Pettersen et al., 2018) studies of energy metabolism have uncovered that MR and its thermal sensitivity are often consistent over time and variable among individuals within the same species (Nespolo et al., 2003; Nespolo & Franco, 2007; Réveillon et al., 2019). In line with these results, our study shows consistent inter-individual variation in SMR throughout 7 years of life and, for the first time, also in TEWL. In addition, SMR and TEWL were strongly positively correlated both within and among individuals and so independently of developmental treatments. The quite remarkable age span over which we examined these individual differences suggests very strong and persistent effects of pre-natal factors on these two functional traits regardless of post-natal conditions and growth trajectories. Our dataset does not allow to elucidate the origin of these physiological syndromes that possibly include long-lasting effects of early environmental conditions and/or genetic factors (White et al., 2019).

The pace-of-life syndrome describes covariation between MR and individual personality, behavior, and life history traits. It is an useful framework to understand how variation in SMR may correlate with maximum MR, behavioral activity and risk-prone behaviors (Careau et al., 2019, 2014; Mell et al., 2016). This theoretical framework has recently been extended to thermal physiology where inter-individual in MR and behavior coincide with variation along the cold-hot axis of thermal physiology (Goulet et al., 2017a; Goulet et al., 2017b). Our results suggest that such a physiological syndrome can also integrate functional traits related to water and energy balance. Although this is the first quantitative analysis of this physiological syndrome, the shared proximal mechanisms, joint plasticity and potential co-evolution between functional traits related to energy balance, respiration, thermal physiology and water biology have already been emphasized (Eric A Riddell et al., 2019; Riddell et al., 2018a; Rozen-Rechels et al., 2019).

Conclusion

Vipers exhibited two distinct plastic responses to thermal treatment: a phenotypic flexibility of SMR and persistent developmental plasticity in TEWL. In addition, SMR and TEWL strongly co-varied both within and among individuals over their lifespan. Therefore, terrestrial ectotherms can simultaneously exhibit strong individual variation, reflecting physiological syndromes and likely genetic variation, and plastic responses in two functional traits related to thermal and water balance. These two sources of variability may allow these organisms to cope with climate change by combining plastic, adaptive responses to droughts and heatwaves (Gunderson et al., 2017; Seebacher et al., 2015) and responses to selection on physiological syndromes (Žagar et al., 2018).

Authors' contributions

O.L. and A.D. designed the study and collected the data. M.D. led the data analyses together with O.L., J.-F.L.G. and A.D. M.D. led the writing of the manuscript and all authors contributed critically in result interpretation and manuscript writing. All authors gave final approval for publication.

Data accessibility

Data are available at Zenodo with DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5561142> (Dezetter et al., 2021b)

Acknowledgement

The authors thank Maxime Le Henaff, Marie Vaugoyeau and Jérémie Souchet who contributed to respirometry data acquisition and cares to vipers. The authors also thank Pierre de Villemereuil for help with the construction and analysis of the bivariate model analysis using MCMCglmm. Funding support was provided by the ANR JCJC ECTOCLIM, the Project AQUASTRESS 2018-1R20214 and Climate Sentinels Program 2016 - 2021 coordinated by the “Cistude Nature” association (PhD Fanny Mallard) and funded by the European Regional Development Fund, the region Nouvelle Aquitaine, the department of Gironde and Pyrénées-Atlantiques. M. D. is supported by a doctoral grant from ED 227 Sorbonne University.

Supporting information

Appendix S1 – Detailed methods regarding respirometry systems

Closed-system respirometry (19 months post-birth)

Individuals were placed in 1000 mL test chambers filled with outside air with a known composition. The outside air was drawn into each test chamber using a Bioblock Scientific 51 air pump for 5 min assuring 99% air turn. The duration of each trial was predetermined in precedent studies and adjusted for each test temperature (40–180 min) to ensure sufficient O₂ suppression (0.5–1%). At the end of each trial, an air sample was collected and then analyzed to estimate snake oxygen consumption. These samples were collected using two 140-ml syringes connected to the chambers via a three-ways stopcock. Then, the air samples were pushed by an infusion pump (KDS 210, KD Scientific Inc, Holliston, USA) through Drierite to absorb moisture, and then sent at a controlled flow to a calibrated O₂ analyzer (FC10A, Sable Systems, Las Vegas, USA). Oxygen consumption was derived by subtracting collected samples values from baseline values.

Open-flow respirometry system (47, 49 and 85 months post-birth)

Individuals were placed in a 500 mL test chamber for 6 hours with a continuous air-flow being simultaneously analyzed. We did not scrub CO₂ from the air going into the chambers. We used outside atmospheric air to flow into the chambers and we accounted for entering and exiting CO₂ concentration in the respirometric equations to calculate O₂ consumption. We used an eight-channel flow controller and meter (± 1 ml. ml.min⁻¹, Flowbar-8 Sable Systems, Las Vegas, USA) to provide a constant influx of air (82.7 ± 6.6 ml.min⁻¹) to eight test chambers. Seven chambers were used to measure the gas exchange of snakes and one was left empty to measure baseline concentrations. To ensure that air was at the target humidity, we saturated the entering air with water vapor, using a double bubbling system in a climatic

chamber set at a temperature of 15°C (dew point temperature). To collect the final air samples, the efflux of each chamber was sequentially selected with a gas switcher (RM-8 Multiplexer, Sable Systems, Las Vegas, USA). Excurrent and baseline water densities were measured using a precision hygrometer (RH 300, Sable Systems, Las Vegas, USA). Air then passed through a column of desiccant (Drierite) before entering an O₂ analyzer (FC10A, Sable Systems, Las Vegas, USA). Output signals from the different hardware were continuously recorded with a specific interface (UI-2, Sable Systems, Las Vegas, USA). In our set-up, CO₂ and O₂ outputs, and water vapor content are reported in volumetric concentration (%). We used respirometric equations derived from Withers (Withers, 1977), which account for the fractional contents of CO₂, O₂ and water vapor entering and exiting the chamber and the flow rate of air to calculate TEWL (converted to mg.h⁻¹) and $\dot{V}O_2$ (converted to ml.h⁻¹):

In case the animal was active or defecated during the run, we repeated the trial for another night until standard conditions were reached. We removed TEWL data for two snakes from the cold cycle group at 49 months post-birth at 30°C because standard conditions could not be reached.

Table S1 – Parameter estimates from the univariate linear mixed model fitted with the *MCMCglmm* R package for body mass (g) in laboratory acclimated asp vipers with fixed effects of treatment group (factor: Hot, Medium and Cold), sex (factor: Males and Females) and time session (factor: S0 to S4; see Figure 1). Fixed effects estimations are provided as posterior means with 95% HDP intervals together with posterior probabilities pMCMC (*** < 0.001, ** < 0.01, * < 0.05).

		Body mass (N = 49, n = 441)
MCMC model	Transformation	Log transformation
	Iterations	140,000
	Burn-in phase	20,000
	Thinning interval	75
	Sample size	1,600
Fixed effects		
	Intercept	0.8081 [0.7294, 0.8991]*** for S0 time session
	Initial SVL	
	Sex [Males]	0.0428 [-0.0818, 0.1783]
	Time session [S1]	0.4052 [0.3448, 0.4682]***
	Time session [S2]	1.2543 [1.1892, 1.3201]***
	Time session [S3]	1.2362 [1.1807, 1.301]***
	Time session [S4]	1.3742 [1.3102, 1.4376]***
	Treatment [Medium]	0.0397 [-0.0919, 0.1633]
	Treatment [Cold]	0.0517 [-0.0656, 0.1743]
	Sex: Time session [Males-S1]	-0.0423 [-0.1397, 0.0491]
	Sex: Time session [Males-S2]	-0.1821 [-0.279, -0.0855]***
	Sex: Time session [Males-S3]	-0.1922 [-0.2815, -0.0951]***
	Sex: Time session [Males-S4]	-0.3001 [-0.3926, -0.2024]***
	Treatment: Sex [Medium-Males]	-0.04 [-0.226, 0.1376]
	Treatment: Sex [Cold-Males]	-0.0563 [-0.2356, 0.1173]
	Treatment: Time session [Medium-S1]	0.0918 [0.0019, 0.1813]*
	Treatment: Time session [Cold-S1]	-0.0074 [-0.1021, 0.0917]
	Treatment: Time session [Medium-S2]	0.0126 [-0.0834, 0.1078]
	Treatment: Time session [Cold-S2]	0.008 [-0.0824, 0.1062]
	Treatment: Time session [Medium-S3]	0.026 [-0.0617, 0.1144]
	Treatment: Time session [Cold-S3]	0.0235 [-0.0707, 0.1089]
	Treatment: Time session [Medium-S4]	0.0399 [-0.0478, 0.1333]
	Treatment: Time session [Cold-S4]	0.0387 [-0.0485, 0.1351]
	Treatment: Sex: Time session [Medium-Males-S1]	-0.0878 [-0.2346, 0.0344]

Treatment: Sex: Time session [Cold-Males-S1]	-0.0369 [-0.1751, 0.0968]
Treatment: Sex: Time session [Medium-Males-S2]	-0.0373 [-0.1621, 0.0982]
Treatment: Sex: Time session [Cold-Males-S2]	-0.0477 [-0.1746, 0.0956]
Treatment: Sex: Time session [Medium-Males-S3]	0.0811 [-0.0482, 0.2106]
Treatment: Sex: Time session [Cold-Males-S3]	-0.051 [-0.1852, 0.0821]
Treatment: Sex: Time session [Medium-Males-S4]	-0.0379 [-0.1676, 0.1011]
Treatment: Sex: Time session [Cold-Males-S4]	-0.0346 [-0.165, 0.0998]
Random effects	
Mother identity (V_m)	0.0039 [0.0003, 0.0099] #
Individual identity (V_I)	0.0107 [0.0064, 0.0162]
Intra-individual residual variation (V_e)	0.006 [0.0052, 0.0069]

This variance component was negligible according to model comparison with DIC and was not retained in the best model.

Table S2 – Parameter estimates from the univariate linear mixed models fitted with the *MCMCglmm* R package for standard metabolic rate (SMR, mL O₂ per hour) and total evaporative water loss rate (TEWL, mg water per hour) in laboratory acclimated asp vipers with fixed effects of body mass (log transformed), treatment group (factor: Hot, Medium and Cold), ambient temperature (factor: 20°C and 30°C) and time session (factor: S1 to S4; see Figure 1). Fixed effects estimations are provided as posterior means with 95% HDP intervals together with posterior probabilities pMCMC (***) < 0.001, ** < 0.01, * < 0.05). Note that TEWL was not measured at session 1 and intercepts were therefore not calculated at the same time than for SMR.

	SMR (N = 49, n = 391)	TEWL (N = 392, n = 292)
MCMC model		
Transformation	Log transformation	Log-transformation
Iterations	100,000	120,000
Burn-in phase	10,000	10,000
Thinning interval	50	50
Sample size	1,800	2,200
Fixed effects		
Intercept	-0.9877 [-1.1766, -0.7946]*** for S1 time session	-0.1843 [-0.6285, -0.2315]*** for S1 time session
log(BM)	0.7604 [0.6272, 0.9064]***	0.3320 [0.1249, 0.5518]***
Treatment [Medium]	0.0703 [-0.0611, 0.2067]	0.1218 [0.0281, 0.2141]*
Treatment [Cold]	0.1091 [-0.0172, 0.2399]	0.030 [-0.0639, 0.1213]
Temperature [30°C]	0.3273 [0.2044, 0.4461]***	0.6225 [0.5806, 0.6642]***
Time session [S2]	-0.3048 [-0.4625, -0.128]***	-
Time session [S3]	-0.4551 [-0.6086, -0.2779]***	0.1052 [0.0509, 0.1555]***

Time session [S4]	0.008 [-0.1531, 0.1916]	0.2023 [0.1439, 0.2519]***
Treatment:Temperature [Medium-30°C]	0.0658 [-0.1077, 0.2376]	0.006 [-0.1049, 0.104] #
Treatment:Temperature [Cold-30°C]	-0.0127 [-0.176, 0.1708]	-0.0483 [-0.1539, 0.0586] #
Treatment: Time session [Medium-S2]	0.0417 [-0.1349, 0.2207]	-
Treatment: Time session [Cold-S2]	0.0321 [-0.1522, 0.2031]	-
Treatment: Time session [Medium-S3]	0.1814 [-0.0052, 0.3559]*	-0.0293 [-0.153, 0.055] #
Treatment: Time session [Cold-S3]	0.1466 [-0.0213, 0.3214]	-0.076 [-0.2066, 0.0415] #
Treatment: Time session [Medium-S4]	-0.0874 [-0.2673, 0.0854]	0.0214 [-0.1064, 0.1464] #
Treatment: Time session [Cold-S4]	-0.2105 [-0.3765, -0.0308]*	-0.0307 [-0.1581, 0.0994] #
Temperature: Time session [30°C-S2]	0.1124 [-0.0561, 0.2936]	-
Temperature: Time session [30°C-S3]	0.3864 [0.2074, 0.5481]***	0.0047 [-0.0971, 0.102] #
Temperature: Time session [30°C-S4]	0.0313 [-0.1384, 0.2134]	-0.0511 [-0.1472, 0.0592] #
Treatment:Temperature:Time session [Medium-30°C-S2]	-0.0913 [-0.3269, 0.1615]	-
Treatment:Temperature:Time session [Cold-30°C-S2]	0.023 [-0.2085, 0.2764]	-
Treatment:Temperature:Time session [Medium-30°C-S3]	-0.3137 [-0.5472, -0.0499]*	0.0341 [-0.2276, 0.2918] #
Treatment:Temperature:Time session [Cold-30°C-S3]	-0.2849 [-0.5126, -0.0095]*	-0.0584 [-0.3004, 0.2240] #
Treatment:Temperature:Time session [Medium-30°C-S4]	0.0489 [-0.1981, 0.2858]	0.1450 [-0.1234, 0.398] #
Treatment:Temperature:Time session [Cold-30°C-S4]	0.1136 [-0.1247, 0.358]	-0.0066 [-0.2636, 0.2596] #
Random effects		
Mother identity (V_m)	0.0036 [0.0004, 0.0093]	0.0048 [0.0004, 0.0131] \$
Individual identity (V_I)	0.0039 [0.0011, 0.0077]	0.0116 [0.0046, 0.0194]
Intra-individual residual variation (V_e)	0.0319 [0.0273, 0.0369]	0.0346 [0.0282, 0.0407]

\$ This variance component was negligible according to model comparison with DIC and was not retained in the best model.

These posterior means were not significant and were calculated before backward elimination of predictor variables starting from the three-way interaction of the full model, the two-way interaction between treatment and time, the two way between treatment and temperature, and eventually the two-way interaction between temperature and time.

Chapitre II – Effets à court terme des contraintes thermiques et hydriques sur l'organisme



Utilisation d'un micro-habitat en nature par une vipère aspic © *Mathias Dezetter*

II.1 Résumé du chapitre

Dans ce chapitre, nous analyserons les réponses sur des pas de temps courts (de l'ordre de la semaine au mois) à des modifications conjointes des conditions thermiques et hydriques.

Du fait des compromis fonctionnels entre la régulation de la balance hydrique et thermique chez les ectothermes (Rozen-Rechels et al., 2019), **mon hypothèse est que les contraintes thermiques et hydriques combinées compromettent de manière interactive le maintien de l'homéostasie. Les organismes devraient déployer des ajustements physiologiques et comportementaux pour (1) atténuer l'exposition aux contraintes, (2) minimiser les effets de ces contraintes mais aussi (3) restaurer l'état physiologiques après l'exposition si les contraintes ne sont pas évitables.** Dans cette optique, j'ai mis au point deux protocoles expérimentaux distincts évaluant séparément le potentiel de déstabilisation de l'homéostasie et d'ajustements physiologiques et comportementaux avec des vipères aspic non-reproducteurs. Dans les deux cas, j'ai manipulé les contraintes thermiques et hydriques afin d'imiter des événements climatiques extrêmes.

Une première expérience ([Article 2](#)) m'a permis de tester les conséquences physiologiques d'un cycle thermique simulant une canicule qui a été combiné à une privation de l'accès à l'eau de boisson simulant une sécheresse. Les conditions climatiques ont été imposées en enceinte climatique pendant 33 jours afin de tester les effets sur le statut physiologique sans possibilité d'ajustement comportemental. J'ai quantifié les réponses physiologiques en mesurant des traits liés à la balance énergétique, l'état d'hydratation et le stress physiologique. J'ai testé les si les contraintes thermiques et hydriques combinées menaient à (1) une plus forte déshydratation individuelle et une plus forte mobilisation énergétique (reflétée notamment par une augmentation des taux basaux de corticostérone), (2) plus de stress physiologique (reflétée notamment par une augmentation du stress oxydatif) et (3) une réduction du métabolisme basal limitant les dépenses énergétiques et pertes hydriques.

Une seconde expérience ([Article 3](#)) m'a permis de tester l'expression du comportement d'hydrorégulation (sélection de microclimats humides) et ses bénéfices associés pour le maintien de l'homéostasie face à des contraintes hydriques (air desséchant ou non) dans des conditions de sécheresse – privation d'eau – et de cycle thermique caniculaire. J'ai à nouveau utilisé des enceintes climatiques pour imposer des conditions hydriques plus ou moins contraignantes (air humide vs. air sec) indépendamment des conditions thermiques (cycle

thermique imposé et thermorégulation comportementale impossible). Afin de permettre la possibilité aux vipères de réaliser des comportements “hydorégulateurs”, j’ai installé des abris maintenus humides ou non pour manipuler les conditions microclimatiques. J’ai ensuite quantifié l’utilisation individuelle des microclimats et mesuré des traits physiologiques liés à la régulation de la balance hydrique. J’ai testé les prédictions suivantes : (1) les contraintes hydriques (air plus sec) devraient impacter négativement la balance hydrique et induire des mécanismes compensatoires (pertes musculaires et comportement de boisson post-expérimental) ; (2) les individus devraient utiliser les microclimats humides lorsqu’ils sont exposés à ces contraintes hydrique; et (3) le taux d’utilisation de ces microclimats devrait être corrélé à la réduction de la déshydratation et/ou des mécanismes physiologiques compensatoires.

Contrairement à nos prédictions, les résultats de l’[Article 2](#) suggèrent des effets principalement additifs des contraintes thermiques et hydriques sur le statut énergétique (pertes de masse, glucocorticoïdes) et l’état de déshydratation (**Figure 33**). Par contre, des effets interactifs sur le comportement de boisson ont été observés en fin de traitement expérimental - ce comportement étant particulièrement important pour la régulation hydrique en populations naturelles (Edwards et al., 2021; Lillywhite et al., 2012; Sandfoss & Lillywhite, 2019). En réponse à la déshydratation, les vipères ont bu davantage lorsqu’elles ont été exposées aux contraintes thermiques et hydriques conjointes. Les résultats de l’[Article 3](#) indiquent que les vipères ont graduellement ajusté leur comportement face aux contraintes hydriques (air sec) en utilisant un abri comportant un microclimat plus humide (**Figure 34**). Le degré d’expression de cet ajustement comportemental était corrélé à l’atténuation des effets de l’air sec sur la physiologie, notamment une atténuation du niveau de déshydratation et des pertes musculaires associées. L’ensemble de ces résultats suggèrent que les contraintes thermiques et hydriques impactent la physiologie et compromettent donc l’homéostasie principalement via des effets additifs mais que le comportement est sensible à l’interaction des deux facteurs et joue un rôle tampon.

Dans ce chapitre, les résultats sont présentés sous la forme d’un article rédigé en anglais et en cours d’évaluation dans *Journal of Experimental Biology* ([Article 2](#)), ainsi que d’un article en cours de préparation pour être soumis à *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* ([Article 3](#)).

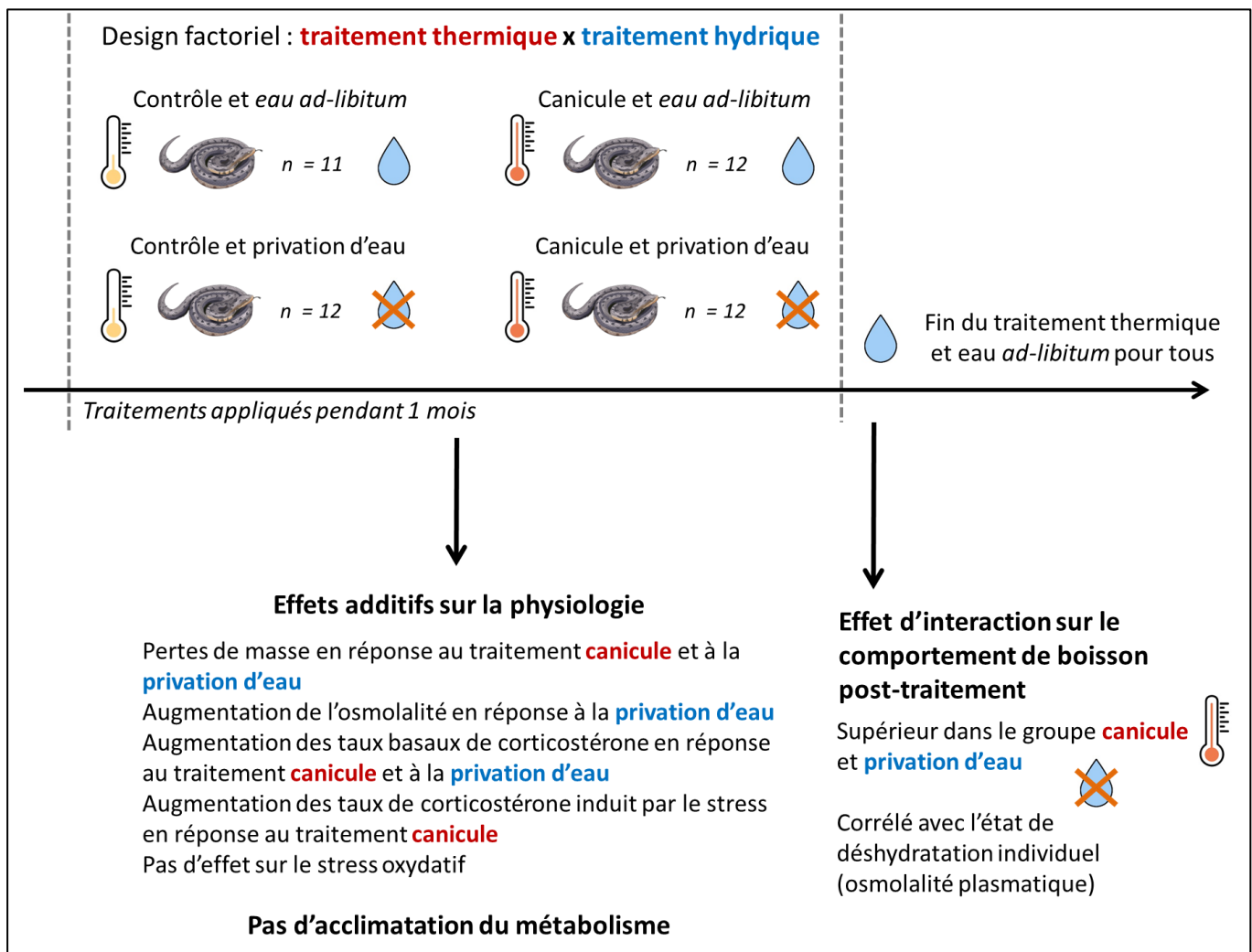


Figure 33 : Synthèse des résultats de l'Article 2.

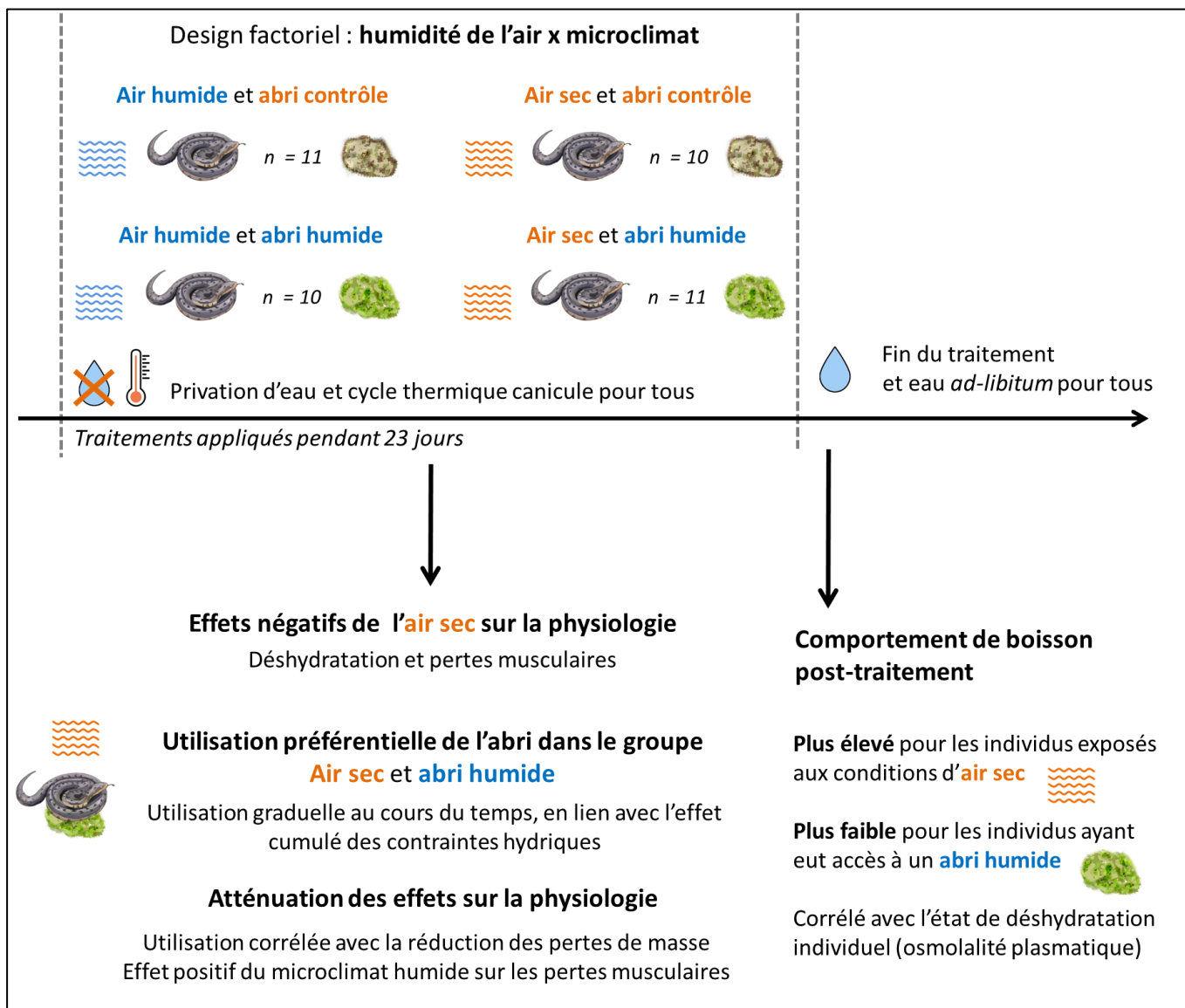


Figure 34 : Synthèse des résultats de l'Article 3.

II.2 Article 2

Running head: combined effects of simulated heatwave and drought in the asp viper

Two stressors are worse than one: combined heatwave and drought affect hydration state and glucocorticoid levels in a temperate ectotherm

Mathias Dezetter^{1,2,*}, Jean François Le Galliard^{1,3}, Mathieu Leroux-Coyau¹, François Brischoux², Frédéric Angelier², Olivier Lourdais^{2,4}

¹ Sorbonne University, CNRS, IRD, INRA, Institut d'écologie et des sciences de l'environnement (iEES Paris), 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 5, France

² Centre d'étude biologique de Chizé, UMR 7372 CNRS-La Rochelle Université, , 79360, Villiers en Bois, France

³ Ecole normale supérieure, PSL University, Département de biologie, CNRS, UMS 3194, Centre de recherche en écologie expérimentale et prédictive (CEREPEP-Ecotron IleDeFrance), 11 chemin de Busseau, 77140 Saint-Pierre-lès-Nemours, France

⁴ School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

* Correspondance :

Mathias Dezetter, CEBC UMR 7372 CNRS-ULR

79360 Villiers en Bois, FRANCE

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

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

E-mail: mathias.dezetter@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-5083-624X

Summary statement

We simulated a combined heatwave and drought to challenge homeostasis in a temperate ectotherm. Water deprivation and higher body temperatures additively altered physiological state but synergistically led to increased thirst.

Under review in *Journal of Experimental Biology*

Abstract

Heatwaves and droughts are becoming more intense and frequent with climate change. These extreme weather events often occur simultaneously and may alter organismal physiology, yet their combined impacts remain largely unknown. Here, we experimentally investigated physiological responses of a temperate ectotherm, the asp viper (*Vipera aspis*), to a simulated heatwave and drought. We applied a two-by-two factorial design by manipulating the daily temperature cycle (control vs. heatwave) and the water availability (water available vs. water-deprived) over a month followed by exposure to standard thermal conditions with *ad libitum* access to water. Simulated heatwave and water deprivation additively increased mass loss, while water deprivation led to greater plasma osmolality (dehydration). Mass gain from drinking after the treatment period was higher in vipers from the heatwave and water-deprived group suggesting that thirst was synergistically influenced by thermal and water constraints. Heatwave conditions and water deprivation also additively increased baseline corticosterone levels but did not influence basal metabolic rates and plasma markers of oxidative stress. Our results demonstrate that a short-term exposure to combined heatwave and drought can exacerbate physiological stress through additive effects, and interactively impact behavioral responses to dehydration. Considering combined effects of temperature and water availability is thus crucial to assess organismal responses to climate change.

Keywords: combined stressors, dehydration, physiological stress, temperature, water availability

Introduction

The vulnerability of organisms to climate change depends on their capacity to maintain homeostasis when they face multiple environmental changes (Huey et al., 2012a; McEwen and Wingfield, 2010; Williams et al., 2008). In particular, combined climate stressors can challenge the maintenance of energy and water balance in wild animals, and alter their physiology (Gunderson et al., 2016; Rozen-Rechels et al., 2019; Sokolova, 2013). Individuals may cope with changes in climate conditions over months or years through the acclimation of their physiological traits (Gunderson et al., 2017; Seebacher et al., 2015c). However, climate is also characterized by extreme climatic events (i.e. “ECE”; Ummenhofer & Meehl, 2017) that can challenge homeostasis over periods of days or weeks and may reduce survival (Buckley and Huey, 2016; Zhang et al., 2018). Rapid modulations of glucocorticoid secretion and metabolic rate can ensure homeostasis when individuals are exposed to such unpredictable events (Angelier & Wingfield, 2013; Bruijn & Romero, 2018; Sandblom et al., 2014). Documenting the energy and water balance regulation mechanisms of organisms exposed to ECEs is thus crucial to assess their capacity to cope with current and future climate conditions (Sergio et al., 2018; van de Pol et al., 2017).

In temperate ecosystems, climate change is leading to more intense and frequent summer droughts and heatwaves over some geographic areas (Stillman, 2019; Trenberth et al., 2014b). These ECEs often occur simultaneously given the strong relationship between temperature and rainfall (Hao et al., 2019; Liu et al., 2009). This leads to combined changes in air temperature and water availability at a fast pace, from days to weeks (Ummenhofer & Meehl, 2017), challenging the regulation of both thermal and water balance in wild animals (Riddell et al., 2019; Rozen-Rechels et al., 2019). The negative effects of droughts on energy and water balance are likely to be exacerbated by heatwave stress because energy expenditure and water loss both increase at higher temperatures (Albright et al., 2017). Yet, the combined effects of high temperatures and water constraints on energy and water balance regulation mechanisms remain largely unknown. To understand these mechanisms, it is necessary to disentangle the independent effects of each climate variable and examine their possible interactions, which generally calls for experimental approaches (Brusch et al., 2020b; Padda et al., 2021). Such experiments are needed because thermal and water constraints could either i) synergistically impact physiology through interactive effects on mechanisms involved in the regulation of heat and water exchanges (Riddell et al., 2018; Rozen-Rechels et al., 2019),

or ii) additively alter physiology through independent effects on different response pathways (Brusch et al., 2020b).

Ectotherms are particularly sensitive to the combined effects of temperature and water availability and rely on daily and seasonal changes in behavior and physiology to select their optimal body temperatures and minimize their water loss (Angilletta Jr., 2009; Pintor et al., 2016; Riddell et al., 2019). These organisms can maintain homeostasis by acclimating to environmental temperature and water availability through changes in the secretion of hormonal mediators of allostasis such as glucocorticoids, including corticosterone (CORT), or through metabolic rate adjustments (Berg et al., 2017; Bruijn & Romero, 2018; Riddell et al., 2018). In response to unpredictable events, the Hypothalamus-Pituitary-Adrenals axis is activated with a rapid and intense secretion of CORT (Wingfield et al., 1998). This increase is then thought to mediate physiological and behavioral responses that help the organism to cope with the stressor (Angelier & Wingfield, 2013; Wingfield, 2013). These changes can involve metabolic and immune adjustments or changes in locomotor activity, and affects other endocrine pathways (reviewed in Landys et al. 2006). For instance, individuals can acclimate to warmer and drier conditions by simultaneously reducing basal metabolic rates and respiratory water loss (Riddell et al., 2018; Woods & Smith, 2010), and such detrimental conditions have also been associated with increased CORT levels (Dupoué et al., 2014, 2013). Indeed, baseline CORT levels often increase in response to a rise in environmental temperature (Dupoué et al., 2018c; Jessop et al., 2016), especially as a result of increased metabolism and energy mobilization at higher temperature. In addition, CORT present both glucocorticoid and mineralocorticoid activities and effects in vertebrates, and water deprivation can also increase baseline CORT levels (Dupoué et al. 2014; Brusch et al. 2020). Importantly, environmental temperature and water deprivation can also influence the functioning of the HPA axis, and therefore, affect the ability of individuals to further increase their circulating levels of CORT (i.e. stress-induced CORT levels) when an additional stressor occurs. Extreme temperatures can further generate oxidative stress, leading to shorter lifespans (Burraco et al., 2020a; Zhang et al., 2018), while dehydration can trigger oxidative defense during some physiological states, such as reproduction (Stier et al., 2017). The joint effects of environmental temperature and water availability on these physiological responses have not been thoroughly examined so far in ectotherms.

Herein, we experimentally examined the physiological response to temperature and water availability in the asp viper, *Vipera aspis* (Linnaeus 1758). This temperate ectotherm is exposed to more frequent and intense heatwaves and droughts within its range distribution (Bador et al., 2017; Spinoni et al., 2018). We used climatic chambers to manipulate independently daily thermal cycles (control vs. heatwave) and access to drinking water (water available vs. water-deprived) in a two-by-two factorial design lasting one month, the standard length of ECE during the summer (Perkins et al., 2012; Sutanto et al., 2020), followed by re-exposure to standard thermal conditions with *ad libitum* access to water. We applied similar water vapor pressure deficits (WVPD) in both thermal treatments to control for the confounding effects of temperature on evaporative water loss rates of snakes. Body mass, plasma osmolality, resting metabolic rate (RMR) and glucocorticoids levels (i.e. baseline and stress-induced CORT) were monitored to assess water and energy balance regulation. In addition, markers of oxidative status were recorded to assess physiological health. We hypothesized that higher temperatures combined with water deprivation should synergically challenge homeostasis during the simulated ECE. We tested the following predictions: at a higher temperature, water deprivation will lead to (1) greater dehydration and energy mobilization (increased body mass loss, higher increase in plasma osmolality and in plasma corticosterone levels) and (2) oxidative stress. Further, (3) organisms will acclimate to warmer temperatures and to water-deprivation by reducing their RMR to minimize both energy expenditure and water loss.

Material and Methods

Study species

The asp viper is a medium sized viviparous snake distributed over southwestern Europe (Lourdais et al., 2002b). This species is predominately found in hedgerow landscapes, forest edges and fallow lands where access to water can be limited. This is especially the case during summer droughts which frequency and intensity have increased in recent times over its range distribution (Spinoni et al., 2018). Ambient temperatures influence the phenology of this heliothermic ectotherm (Luiselli et al., 2018; Rugiero et al., 2013), whose morphological, behavioral and physiological traits are also highly sensitive to thermal and water constraints at crucial life-history stages (Dupoué et al., 2015a, 2015b; Lориoux et al., 2013). This capital breeder relies on sporadic feeding events to accumulate energy reserves and can fast during several months (Lourdais et al., 2002a). The asp viper can also tolerate water deprivation over

weeks, even during water demanding stages such as pregnancy (Dupoué et al., 2018b; Lourdais et al., 2017, 2015). It has been demonstrated that water shortage can involve changes in energy and water resources allocation, corticosterone secretion and up-regulation of oxidative defense in adult females, especially during pregnancy (Dupoué et al., 2016; Stier et al., 2017). Herein, we used 47 non-reproductive adult snakes (27 females and 20 males) from a captive colony of asp vipers originating from western France and maintained at the Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, France.

Experimental design and treatments

We exposed individuals to one of four treatments in a two-by-two factorial design manipulating thermal conditions (control versus heatwave thermal treatment) and access to drinking water (water available versus water-deprived). We applied the treatments for 33 days (hereafter called the treatment period), which corresponds to a moderate ECE duration within the range distribution of the asp viper in Western Europe (Perkins et al., 2012; Sutanto et al., 2020). On Day 34, all individuals were provided water *ad-libitum* and transferred to standard maintenance thermal conditions (see below).

We designed ecologically relevant daily thermal cycles with different mean and variance of temperatures (Colinet et al., 2015; Morash et al., 2018) to mimic either a moderate summer heatwave (hereafter “HW” thermal treatment) or standard summer weather conditions (hereafter “control” thermal treatment, see Fig. 1). During the daytime in natural conditions, the asp viper uses micro-habitats to behaviorally thermoregulate at a preferred temperature close to 30°C (Lorioux et al., 2013b). At night in natural conditions, body temperature fluctuates with the ambient temperature of the underground shelters used by these snakes. Higher ambient temperatures induced by a moderate heatwave will lead to an extended time spent at the preferred temperature and to higher nighttime body temperatures (Blouin-Demers & Weatherhead, 2001; Davy et al., 2017). We thus applied a daytime body temperature of 30°C in both thermal treatments but with different durations during the daytime (3 versus 12 hours of daytime in the control versus the HW thermal treatment, respectively). We also applied different nighttime temperatures and durations (18 versus 26°C in the control versus the HW thermal treatment, see Fig.1).

In the water available treatment, individuals were provided drinking water *ad-libitum* in a glass bowl, whereas individuals in the water-deprived treatment had no access to drinking water during the treatment period. Air humidity is tightly linked to air temperature and respiratory or cutaneous water loss rates increase when the deficit in water vapor pressure is higher (Dupoué et al., 2015b; Woods & Smith, 2010). Thus, we maintained a similar WVPD of ca. -1 kPa in all treatments (Fig.1), which corresponds to a minimally desiccant environment for vipers (Dupoué et al., 2015b). To achieve this, relative humidity was set at 75% at 30°C ambient temperature, 70% at 26°C, and 50% at 18°C.

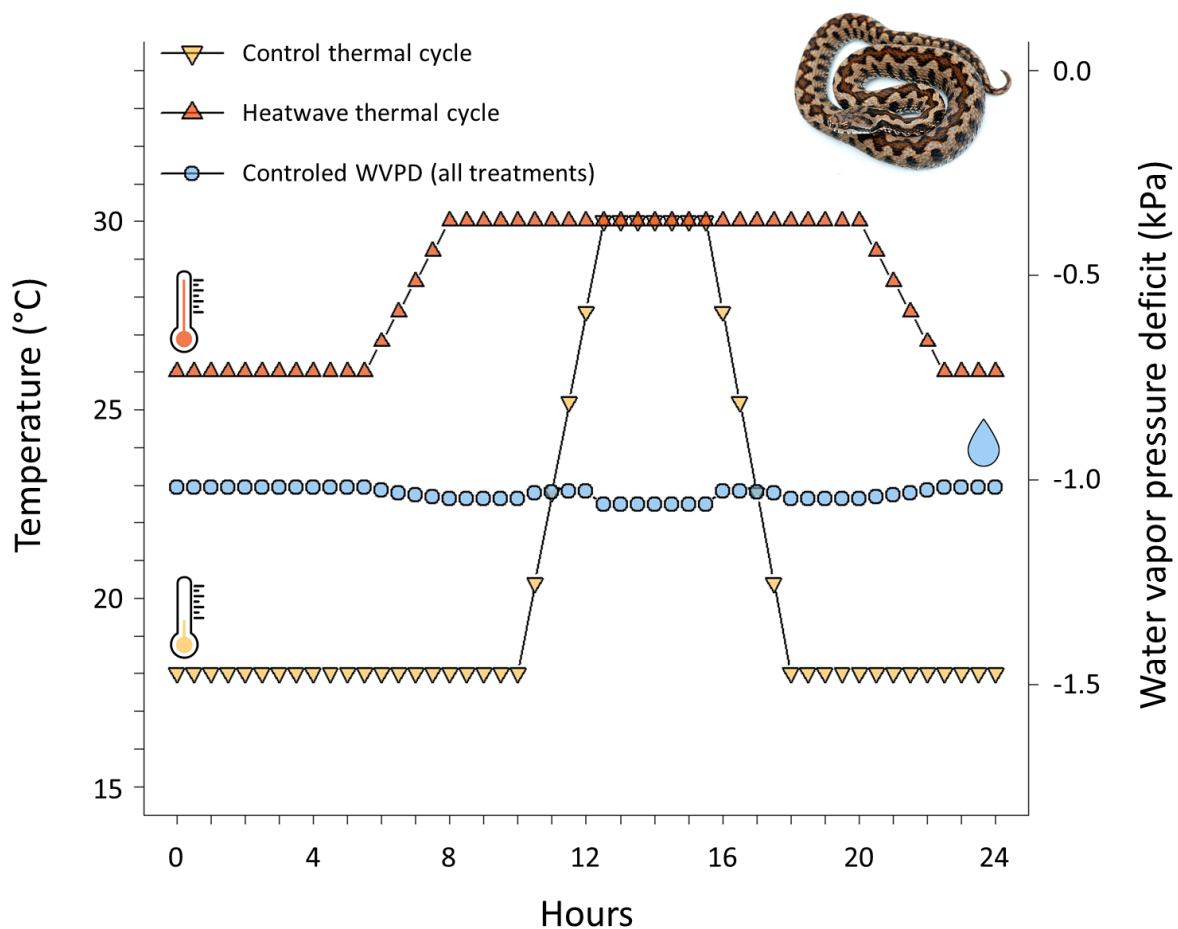


Figure 1. Daily temperature cycle (°C; left axis) applied in each thermal treatment (control: yellow inverted triangles; simulated heatwave: red triangles) and controlled water vapor pressure deficit set at ~ -1 kPa (blue squares; right axis) for both treatments. These conditions were applied to a sample of 47 non-reproductive adult asp vipers of both sexes. To mimic ecologically relevant thermal conditions, we manipulated both mean temperature and the amplitude of thermal variability (control: mean of 20.7°C, amplitude of 12°C; simulated heatwave: mean of 28.4°C, amplitude of 4°C). Photo Credit: Copyright Matthieu Berroneau

Males and females were randomly assigned to treatments with similar sex ratios in each treatment. We manipulated temperature cycles while keeping a constant WVPD by using four climatic chambers (Vötsch VP 600, Balingen, Germany) controlled with the SIMPATI software (ver.2.06 Vötsch). Individuals were housed individually in plastic boxes (35 x 25 x 13 cm) with a PVC shelter and an artificial grass carpet as substrate. The photoperiod followed that of natural day light cycles (circa 12:12). Prior to the treatment period, individuals were housed for a month inside the climatic chambers for acclimation to general maintenance conditions with *ad-libitum* access to drinking water and a daily thermal cycle intermediate between the control and HW thermal treatments (6 hours of daytime at 30°C and a night-time temperature of 22°C) with a similar WVPD of ca. -1 kP_a. We did not feed the snakes during this pre-experimental period and the experimental period in order to avoid confounding effects of digestion and energy intake on physiology (Stahlschmidt et al., 2015).

Variable collected and parameters measured

Changes in mass

Body mass (BM) changes provide a reliable proxy of hydration state in the absence of food intake in squamate reptiles (Dupoué et al., 2014). We therefore weighed (± 0.1 g) all individuals every 3 days during the treatment period and further weighted them at the end of Day 34 to assess post-treatment water intake.

Blood parameters

We collected blood samples from each individual at the onset (Day 0) and at the end (Day 33) of the treatment period to assess plasma osmolality, baseline and stress-induced plasma CORT concentration as well as two standard markers of oxidative status (concentration of reactive oxidative metabolites, ROMs; and antioxidant capacity, OXY). We sampled individuals in a random order by sex and experimental treatments. All blood samples (150 μ L) were collected through cardiocentesis with a 1 mL syringe and a heparinized 29-gauge needle. Blood was immediately centrifuged at 2000 g, plasma was separated from red blood cells and samples were stored at -28°C until laboratory analysis. During each blood sampling session, we used a standardized capture and restraint stress protocol (see Dupoué et al., 2014, 2013). A first blood sample was collected immediately upon removing the snake from its cage (mean blood sample duration \pm SE = 3.4 \pm 1.4 min) in order to measure baseline CORT levels (Romero & Wikelski, 2001) as well as plasma osmolality and markers of oxidative status. In

this case, animals were maintained at their preferred temperature (ca. 30 °C). Snakes were then placed in a transparent plastic box (35 x 25 x 13 cm) without any shelter for 1 hour (mean \pm SE = 64.0 \pm 2.6 min) at a controlled temperature (25 \pm 0.1°C) to promote a stress response. Blood was then sampled a second time to measure stress-induced CORT levels.

Plasma CORT concentrations (ng mL⁻¹) were determined using a radioimmunoassay protocol (see Dupoué et al., 2016 for details). Samples were run in six assays (intra-assay variation: 10 %, inter-assay variation: 14.6 %). We measured plasma osmolality from 10 μ L aliquots using a vapor pressure osmometer (\pm 3 mOsm kg⁻¹; Vapro2, Elitech group). We used the d-ROMs colorimetric kits (MC003, Diacron International Italy; coefficients of variation: intra-plate, 1.5%; inter-plate 1.4%) to measure the activity of organic hyperoxides (ROMs, mg H₂O₂ dl⁻¹) as an index of oxidative damage. Further, we used OXY-absorbent test kits (MC435, Diacron International Italy; coefficients of variation: intra-plate, 0.5%; inter-plate 9.8%) to assess the non-enzymatic ability of diluted plasma samples (1:100) to neutralize an oxidant attack from hypochlorous acid (OXY, μ mol HClO ml⁻¹) as an index of oxidative defense (Costantini, 2016, 2011a).

Resting metabolic rate

To investigate energy saving responses, we measured the rate of oxygen consumption ($\dot{V}O_2$, ml.h⁻¹) as a proxy of the resting metabolic rate (RMR), 5 days prior to the start of the treatment period, on Day 14 and on Day 28. We used a closed-system respirometry (see detailed methods in supplementary file) to assess $\dot{V}O_2$ for animals at rest at 25°C in randomized trials by sex and experimental treatments. Individuals were inactive when $\dot{V}O_2$ was measured. We used a temperature-controlled test chamber in which we placed each individual 2 h prior to each measurement in order to stabilize the test temperature and avoid exploratory behaviors. In the event that the snake was active or defecated during the run, we repeated the trial until standard conditions were reached.

Statistical analyses

All analyses were performed using the R software version 3.6.3 (Holding the windsock, R Core Team, 2020). We used linear models fitted with the *lm* function of the *stats* package, and linear mixed effects models fitted with the *lme* function of the *nlme* package (Pinheiro et al., 2020). For model selection, we started with full models and used stepwise removal of

insignificant variables and interactions using standard and marginal F tests for linear and mixed models, respectively (*anova*, package *stats*). We checked that residuals of our models fulfilled a Gaussian distribution using Shapiro-Wilk tests and had homogeneous variances across treatments. Statistical differences between treatment groups were further explored using pairwise post-hoc Tukey tests (*emmeans*, package *emmeans* ; Lenth et al., 2019).

Before testing for the effects of temperature and water treatments on changes in mass, in blood parameters and in RMR, we built linear models to confirm that there were no differences among groups at the beginning of the experiment. We built independent linear models for each variable with the initial values as the dependent variable, thermal and water treatment and their interaction as explanatory factors. To confirm that baseline CORT was not dependent on blood sample duration in each treatment, we built 4 independent linear models (i.e. one for each treatment group) with baseline CORT as the dependent variable and blood sample duration as the explanatory variable.

Effects of temperature and water treatment on BM were tested with a linear mixed effect model for repeated measurements with BM as the dependent variable, thermal treatment, water treatment, time (i.e. days on which individuals were weighted) and the interactions between thermal treatment, water treatment and time as explanatory factors. Individual identity was set as a random factor. To assess the effects of experimental treatments on the water intake subsequent to the end of the water deprivation period, we built a linear model with post-treatment water intake as the dependent variable, initial BM as a linear covariate, sex, thermal treatment, water treatment, time and the interactions between thermal treatment, water treatment and time as explanatory factors.

To further investigate the effects of thermal and water treatment on changes in blood parameters, we built 5 independent linear models with the changes in each physiological trait as the dependent variable (either Δ plasma osmolality, Δ baseline CORT, Δ stress-induced CORT, Δ ROMs or Δ OXY), the initial value of each physiological trait as a linear covariate, and sex, thermal treatment, water treatment and the interactions between these three parameters as fixed factors. To investigate linear changes in RMR in response to the thermal and water treatments, we built a linear mixed effect model for repeated measurements with $\dot{V}O_2$ as the dependent variable, BM as a linear covariate, sex, thermal treatment, water treatment, time and the interactions between thermal treatment, water treatment and time as

explanatory variables. We log-transformed $\dot{V}O_2$ to meet the assumptions of homoscedastic and normal residuals. Individual identity was included as a random factor.

We investigated the relationship between BM loss and changes in baseline CORT and in plasma osmolality using two independent linear models with BM loss as the dependent variable, initial BM as a linear covariate and either Δ baseline CORT or Δ plasma osmolality as an explanatory variable. We further examined the relationship between baseline CORT and plasma osmolality across both sampling periods using a linear regression, grouping all individuals together regardless of treatment. To investigate the relationship between post-treatment water intake and plasma osmolality, we built two independent linear models with water intake as the dependent variable, initial BM as a linear covariate, and either Δ plasma osmolality or final plasma osmolality as a covariate. Similarly, we investigated the relationship between post-treatment water intake and BM loss using a linear model with water intake as the dependent variable, initial BM as a linear covariate, and BM loss as a covariate. We also investigated the relationship between water intake and baseline CORT using similar linear models with either Δ baseline CORT or final baseline CORT as a covariate. These analyses allowed us to examine how physiological and behavioral responses correlate with each other.

Results

Effects of thermal and water treatment on body mass change and thirst

At the beginning of the experiment, individuals had similar body mass between treatments (all $P > 0.05$, Table S1). Unsurprisingly, vipers lost weight during the manipulation (Time: $F_{1,514} = 77.5, P < 0.001$, Fig. 2A). The thermal treatment (Thermal treatment \times Time: $F_{1,514} = 40.9, P < 0.001$) and the water treatment (Water treatment \times Time: $F_{1,514} = 83.6, P < 0.001$) additively influenced BM loss during the treatment period (Fig. 2A; Table S3). Water-deprived vipers lost BM at a faster rate than vipers in the water available treatment groups, and vipers also lost BM at a faster rate in the HW than in the control treatment. There was no interactive effect of thermal and water treatments on BM loss (Thermal treatment \times Water treatment \times Time: $F_{1,513} = 0.1, P = 0.74$).

Unlike body mass, post-treatment water intake was influenced by the interaction between the thermal treatment and water treatment ($F_{1,42} = 5.3, P = 0.01$; Table S4). Individuals exposed

to combined HW and water deprivation abundantly drank water and rapidly gained mass whereas water-deprived snakes from the control thermal treatment only slightly recovered body mass, at a similar level than snakes from the water available groups (see Fig. 2B). Sex had no influence on the pattern of BM loss nor on the post-treatment water intake (all $P > 0.05$).

Changes in blood parameters in response to thermal and water treatment

At the beginning of the experiment, there was no initial difference in blood parameters between treatments (all $P > 0.05$, Table S1). Changes in plasma osmolality were dependent on initial plasma osmolality ($F_{1,41} = 25.3, P < 0.001$) and on the water treatment ($F_{1,41} = 10.0, P = 0.002$), but were not influenced by thermal treatment ($F_{1,41} = 0.07, P = 0.79$; Table S5). Plasma osmolality increased in water-deprived vipers (mean \pm SE = 17.4 ± 4.8) throughout the experiment as expected if vipers were more dehydrated, while it remained stable (mean \pm SE = -0.8 ± 3.4) in vipers from the water-available treatment (Fig. 3A, Table 1) as expected if they maintained a normosmotic state.

Baseline CORT levels were not dependent on blood sample duration (all $P > 0.05$, Table S2). Changes in baseline CORT levels were influenced by initial baseline CORT levels ($F_{1,42} = 50.7, P < 0.001$) and sex ($F_{1,42} = 5.7, P = 0.02$), but we also found additive effects of both thermal ($F_{1,42} = 4.8, P = 0.03$) and water treatment ($F_{1,42} = 7.7, P = 0.008$) on changes in baseline CORT (Fig. 4, Table 1 and S5). Change in baseline CORT was higher on average in vipers from HW treatment than in controls, and in water-deprived vipers than in the water available groups. Changes in stress-induced CORT levels were dependent on initial stress-induced CORT levels ($F_{1,43} = 20.1, P < 0.001$) and the thermal treatment ($F_{1,43} = 6.2, P = 0.02$), but not the water treatment ($F_{1,43} = 0.3, P = 0.61$). Stress-induced CORT levels (Table 1) increased in vipers from the HW thermal treatment (mean \pm SE = 17.1 ± 7.7) while it decreased in vipers from the control thermal treatment (mean \pm SE = -10.3 ± 7.8 ; Fig. S1).

On the contrary, treatments had no effects on changes in plasma ROMs (Thermal treatment: $F_{1,42} = 1.4, P = 0.25$; Water treatment: $F_{1,42} = 0.2, P = 0.62$) and OXY concentrations (Thermal treatment: $F_{1,42} = 1.58, P = 0.21$; Water treatment: $F_{1,42} = 0.002, P = 0.96$). Instead, the changes in ROMs and OXY were dependent on sex (Δ ROMs, Sex: $F_{1,42} = 6.5, P = 0.01$; Δ OXY, Sex: $F_{1,42} = 12.2, P = 0.001$) and on initial values of ROMs ($F_{1,42} = 33.6, P < 0.001$) and OXY ($F_{1,42} = 46.4, P < 0.001$).

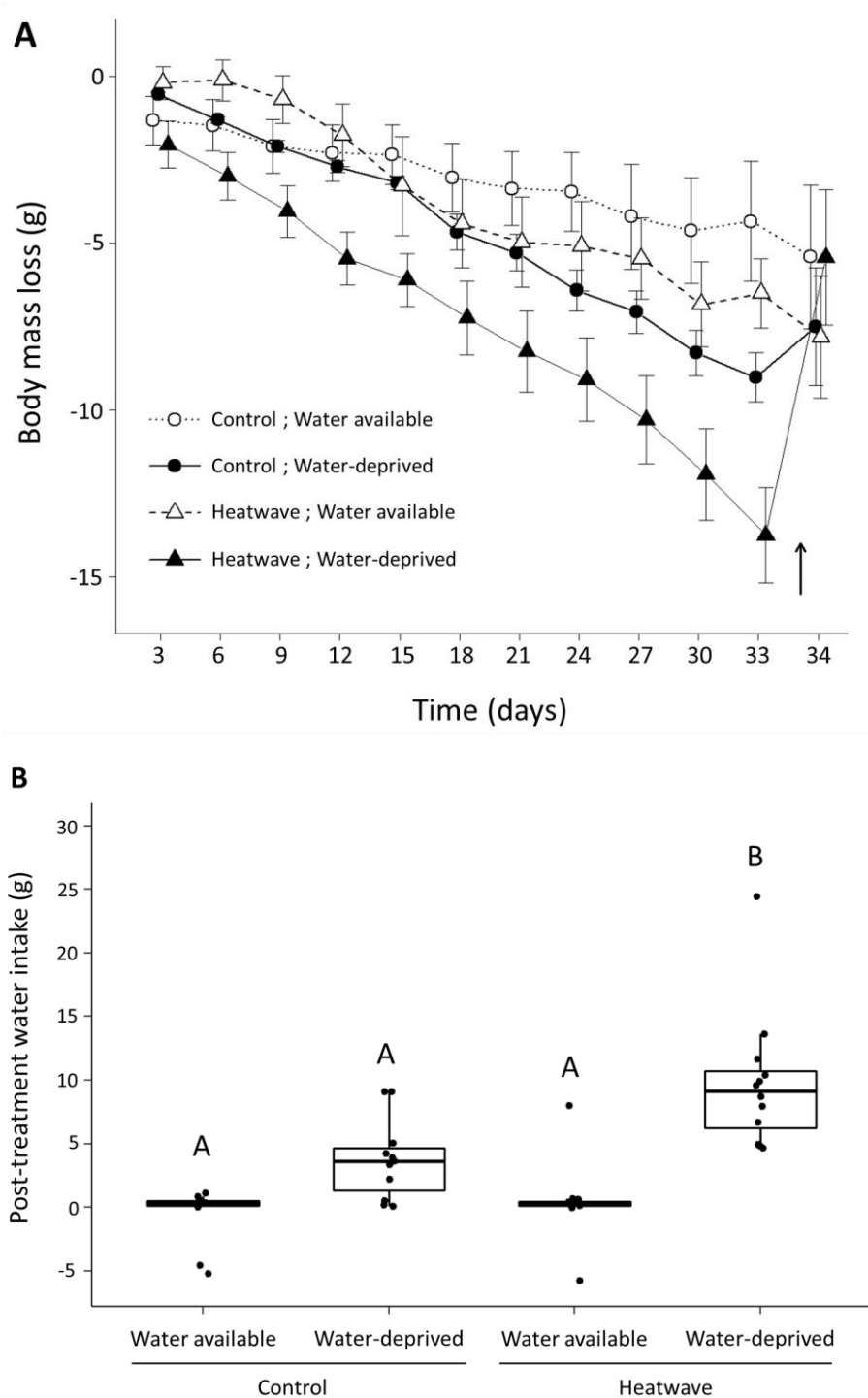


Figure 2. (A) Effect of thermal and water treatment on changes in body mass through time in asp vipers during the manipulation (mean \pm SE, cold treatment: circles; hot treatment: triangles; water available: open symbols; water-deprived: filled symbols). Body mass values were adjusted to initial body mass. The arrow indicates the end of the treatment period and access to ad-libitum water for all vipers. (B) Effect of thermal and water treatment on the post-treatment water intake (g). The top and bottom of the boxes represent the first and last quartiles, the horizontal line within the box represents the median and the whiskers represent the fifth and 95th percentiles. Points are individual data records. The different letters indicate significant differences among treatment groups based on Tukey post-hoc tests of contrasts.

Table 1. Summary statistics of the physiological parameters measured on individuals at the onset and at the end of the treatment period

		Experimental treatments			
		Control	Control	Heatwave	Heatwave
		Water available	Water-deprived	Water available	Water-deprived
Variables		Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)
Onset - Day 0	Osmolality (mOsm.kg ⁻¹)	286.20 (4.21)	284.50 (4.70)	289.45 (4.22)	284.83 (5.88)
	Baseline CORT (ng mL ⁻¹)	20.23 (3.61)	12.47 (1.94)	14.73 (3.03)	16.75 (2.98)
	Stress-induced CORT (ng mL ⁻¹)	63.01 (14.23)	79.21 (17.66)	55.48 (8.00)	75.77 (18.03)
	ROMs (H ₂ O ₂ dL ⁻¹)	7.90 (1.56)	5.53 (0.81)	7.57 (1.19)	8.36 (1.37)
	OXY (μ mol HClO mL ⁻¹)	269.70 (21.94)	264.59 (20.69)	283.96 (18.77)	268.55 (22.55)
End – Day 33	Osmolality (mOsm.kg ⁻¹)	289.30 (5.50)	298.67 (3.86)	285.00 (4.73)	305.50 (5.64)
	Baseline CORT (ng mL ⁻¹)	9.77 (1.05)	12.27 (2.21)	11.23 (2.45)	20.36 (3.33)
	Stress-induced CORT (ng mL ⁻¹)	50.19 (11.53)	68.23 (9.99)	89.42 (17.22)	78.92 (12.40)
	ROMs (H ₂ O ₂ dL ⁻¹)	5.98 (1.40)	5.14 (1.55)	4.95 (0.79)	4.74 (0.84)
	OXY (μ mol HClO mL ⁻¹)	279.02 (25.39)	257.12 (18.98)	230.41 (18.05)	257.38 (24.08)

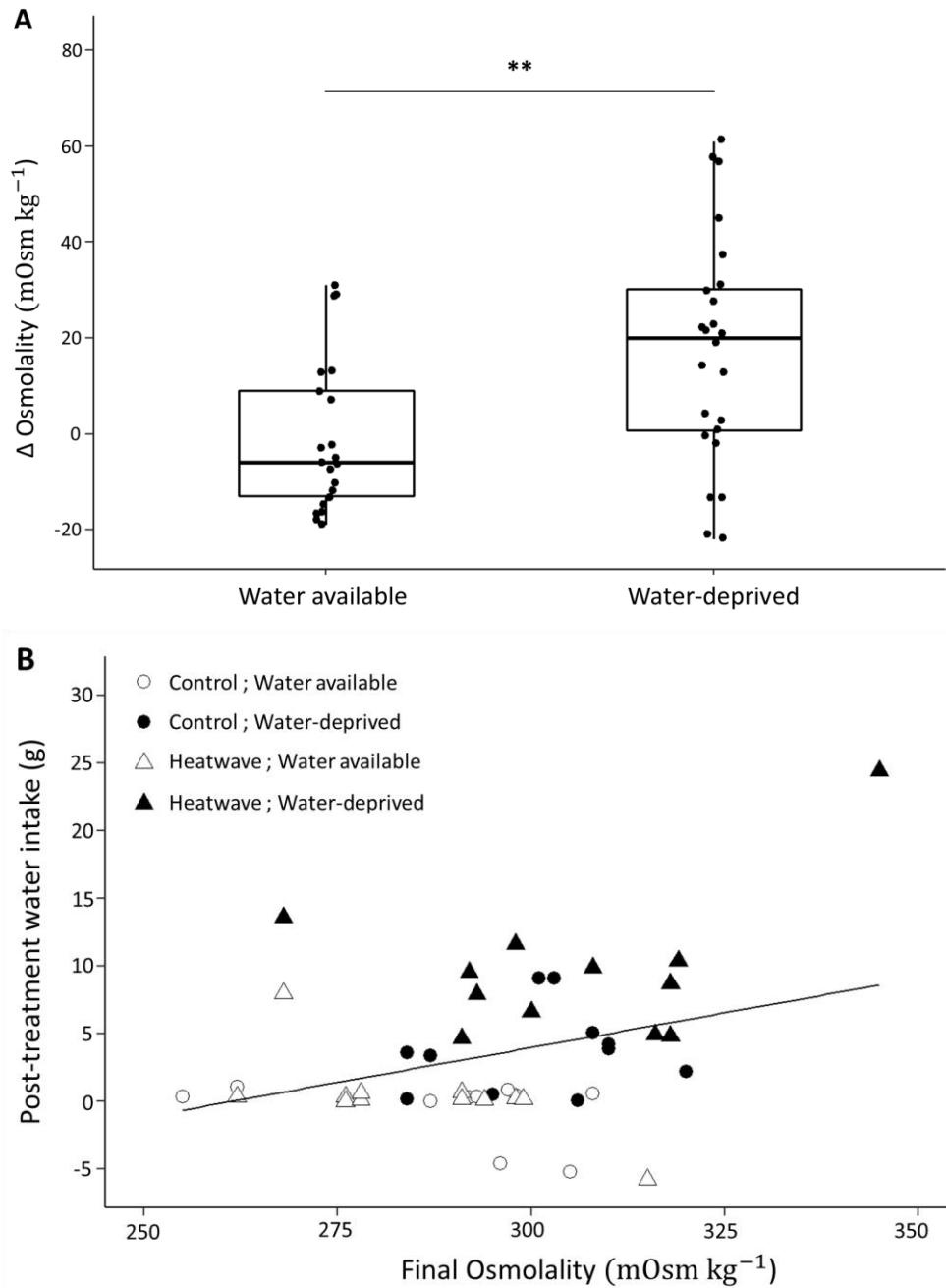


Figure 3. (A) Effect of water treatment on changes in plasma osmolality (mOsm kg^{-1}) in asp vipers. The top and bottom of the boxes represent the first and last quartiles, the horizontal line within the box represent the median and the whiskers represent the fifth and 95th percentiles. Points are individual data records. The ** signs indicate significant differences among treatment groups based on Tukey post-hoc tests of contrasts. (B) Relation between post-treatment water intake (g) and final plasma osmolality (mOsm kg^{-1} ; cold treatment: circles; hot treatment: triangles; water available: open symbols; water-deprived: filled symbols). The line represents the best regression curve.

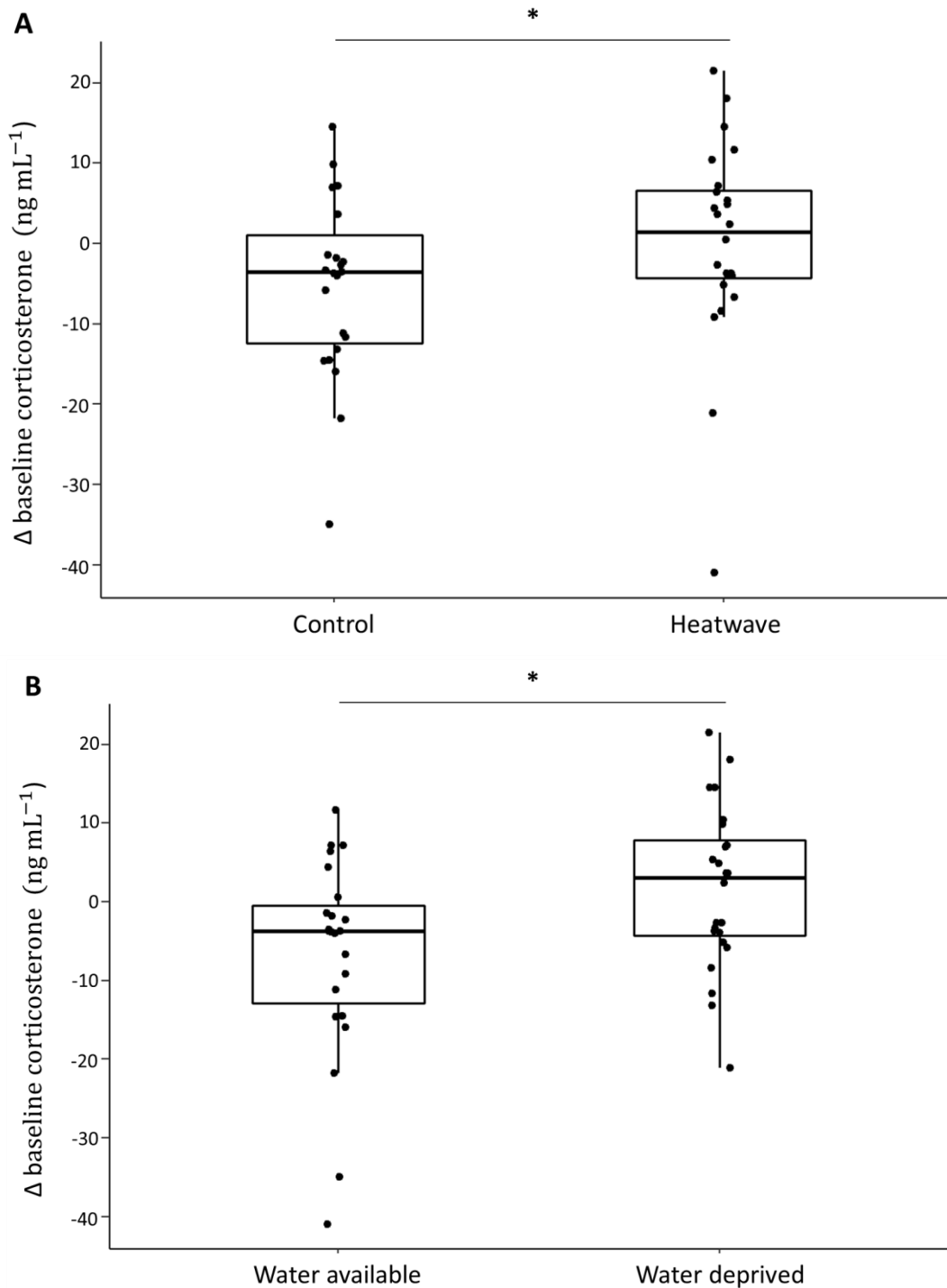


Figure 4. Additive effects of thermal and water treatment on baseline corticosterone plasma concentrations (ng mL⁻¹; **A** and **B**, respectively) in asp vipers. The top and bottom of the boxes represent the first and last quartiles, the horizontal line within the box represent the median and the whiskers represent the fifth and 95th percentiles. Points are individual data records. The * sign indicates significant differences among treatment groups based on Tukey post-hoc tests of contrasts.

Changes in resting metabolic rate

There was no initial difference in RMR between treatments (all $P > 0.05$, Table S1). As expected, $\dot{V}O_2$ scaled positively with BM ($F_{1,92} = 15.1, P < 0.001$). RMR was however not influenced by thermal treatment (Thermal treatment \times Time: $F_{1,92} = 1.2, P = 0.28$) or by water treatment (Water treatment \times Time: $F_{1,92} = 0.1, P = 0.72$; Table 2 and S6).

Table 2. Summary statistics of the resting metabolic rate ($\dot{V}O_2$) measured on individuals at three time points during the experimental period

Variable	Time of measurement	Experimental treatments			
		Control	Control	Heatwave	Heatwave
		Water available	Water-deprived	Water available	Water-deprived
		Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)
$\dot{V}O_2$	5 days prior to the experimental period	6.27 (0.67)	6.40 (0.75)	7.71 (1.28)	6.19 (0.68)
(ml.h ⁻¹)	Day 14	4.76 (0.48)	5.54 (0.79)	7.21 (1.36)	5.05 (0.52)
	Day 28	6.23 (0.93)	5.46 (0.80)	6.69 (1.49)	4.81 (0.52)

Correlations between variables

BM loss during the experiment was positively correlated with changes in baseline CORT ($F_{1,44} = 6.9, P = 0.01$, Fig. S2) but not with changes in plasma osmolality (marginal effect; $F_{1,42} = 3.9, P = 0.05$; Table S7). The baseline CORT levels were not correlated with plasma osmolality across both sampling sessions ($F_{1,44} = 2.2, P = 0.15$; Table S8). Water intake after the end of the experiment was positively correlated with final plasma osmolality ($F_{1,42} = 4.9, P = 0.03$, Fig. 3B), but not with changes in plasma osmolality during the experiment ($F_{1,42} = 1.4, P = 0.24$). It was also positively correlated with BM loss during the experiment ($F_{1,43} = 16.4, P < 0.001$; Table S7; Fig. S3). Water intake was not correlated with final baseline CORT ($F_{1,43} = 1.4, P = 0.24$) or with changes in baseline CORT ($F_{1,43} = 2.5, P = 0.12$).

Discussion

Wild organisms are facing more frequent and intense ECEs, which combine both high ambient temperatures and reduced water availability and may challenge their capacity to maintain homeostasis. Contrary to our predictions, we however found mostly additive effects of temperature and water treatment on mass loss and physiological stress. In turn, we found an interactive effect on drinking behavior, suggesting a synergistic effect on behavioral responses to dehydration.

Changes in BM, plasma osmolality and drinking behavior indicated that heatwave temperatures and water deprivation resulted in a significant physiological dehydration. Body mass loss throughout the treatment period was additively increased by heatwave temperature and water deprivation. Surprisingly, changes in plasma osmolality were affected only by water deprivation, and not by the heatwave treatment, contrary to recent findings in gravid lizards using a relatively similar experimental design (Brusch et al., 2020b). In addition, body mass loss was correlated with the increase in baseline CORT but not with the increase in plasma osmolality. Altogether, this suggests that the enhanced BM loss at higher temperatures likely reflected mostly changes in energy expenditure and catabolism to support the pace-of-life in a warmer environment instead of physiological dehydration *per se* (Burraco et al., 2020a; CaraDonna et al., 2018).

In vipers from the combined heatwave and water-deprived treatment, there was a sharp mass gain during the post-experimental re-hydration period, which suggests significant levels of dehydration-induced thirst following the joint manipulation of temperature and water availability (Dezetter et al., 2021c; Dupoué et al., 2014). To our knowledge, this study is the first to demonstrate an interactive effect of high temperature and water deprivation on drinking behavior, a central behavioral trait for water balance regulation, especially in snakes (Edwards et al., 2021; Lillywhite et al., 2019). This result suggests that the combined exposure to droughts and heatwaves in natural habitats of ectotherms (Rahmstorf & Coumou, 2011) can synergistically alter their hydroregulation behavior despite additive effects on hydration state. Exploratory analyses hint at potential explanations for this contradictory finding. Indeed, we observed that the post-treatment water intake was positively correlated with final plasma osmolality, but not with changes in plasma osmolality or with glucocorticoid levels. Thus, thirst was linearly related to physiological dehydration on

average (Fig. 3B). Yet, the water deprived snakes in the simulated heatwave treatment drank more than those from the control thermal treatment, which suggests that the combined effects of temperature and water deprivation generated non-additive changes in another critical physiological trait controlling drinking behavior (Edwards et al., 2021; Lillywhite et al., 2012). More studies are needed to disentangle the interactive effects of temperature and water availability on thirst.

We further found that heatwave temperatures and water deprivation additively increased the baseline CORT levels measured in snakes at their preferred body temperature. Higher baseline CORT levels in response to the heatwave treatment may reflect an altered physiological state and higher energy expenditure (DuRant et al., 2008; Jimeno et al., 2018). This contrasts with previous findings in ectotherms, in which lower baseline CORT levels at a higher environmental temperature are associated with a reduction in activity and interpreted as an energy-saving mechanism (Dupoué et al., 2018c; Jessop et al., 2016). Higher baseline CORT levels in response to dehydration can modulate water balance regulation through the mineralocorticoid actions of CORT (Brusch et al., 2020a; McCormick & Bradshaw, 2006). However, baseline CORT levels were not correlated with plasma osmolality. The baseline secretion of CORT, a mediator of energy reserve mobilization, could also lead to a higher protein catabolism, which releases bound water that can be re-allocated to sustain individual water requirements (Brusch et al., 2018). We also found that heatwave temperatures led to increased stress-induced CORT levels at a standard body temperature of 25°C, in congruence with the positive relationship often observed between stress-induced CORT and body temperature in other studies (Claunch et al., 2017; Racic et al., 2020). One potential interpretation is that exposure to higher temperatures triggered a more alert-state in snakes. As a result, vipers may be better able to rapidly increase their CORT secretion in response to an additional stressor when maintained at heatwaves temperatures. This interpretation is in line with the idea that warm environments may induce more active and bold behaviors sometimes correlated with the faster pace-of-life in warm environments (Goulet et al., 2018, 2017b). Unlike some previous studies (Dupoué et al., 2014; Moeller et al., 2017), we however found no effect of water deprivation on stress-induced CORT levels. This suggests that, contrary to heatwave temperature, water deprivation does not translate into an increased secretion of CORT when an additional stressor occurs (Brischoux et al., 2020). Although the reasons for this discrepancy between studies remain unclear, we note that the duration of the experiment

and dehydration levels may have not been strong enough to trigger such effects (e.g., dehydration lasted 33 days in our experiment vs. 50 days in Dupoué et al., 2014).

Contrary to our predictions, oxidative state was not influenced by heatwave temperature or water availability. More specifically, changes in plasma markers of oxidative damage (ROMs) and of non-enzymatic antioxidant capacity (OXY) were not affected by heatwave temperatures or water deprivation. This is surprising because heatwave temperatures led to higher baseline CORT levels and to increased BM loss, both suggesting higher catabolism that should produce oxidative damage (Costantini et al., 2011). Our results also contrast with the pattern of oxidative stress responses to acute exposure to high temperatures generally observed in experimental studies on vertebrates (Ritchie & Friesen, 2021). Costantini (2019) cautioned however that responses of oxidative stress markers are however often dependent on the kind of tissues and specific biological markers examined. For example, recent studies on reproduction effort in pregnant asp vipers and in adult European common lizards (*Zootoca vivipara*) found a general pattern of increased oxidative damage and up-regulation of antioxidant defenses in response to water deprivation, especially during pregnancy, using similar markers than those used in our study (Brusch et al., 2020b; Dupoué et al., 2020a; Stier et al., 2017). These and our results likely indicate that water deprivation effects on oxidative status are context dependent and possibly tied to reproductive costs (Metcalf and Monaghan, 2013). For example, the oxidative status of asp vipers might be more sensitive to physiological dehydration during pregnancy or over a longer time period for acclimation.

Similarly, our prediction that snakes would reduce their RMR as an acclimation response to both higher temperatures and water deprivation, limiting both energy expenditure and water loss (Muir et al., 2007; Riddell et al., 2018a), was not supported. In congruence with oxidative state, RMR neither increased in response to heatwave temperatures and water deprivation. Interestingly, we found persistent individual differences that may reflect individual physiological syndromes (Dezetter et al., 2021a). Energetics models suggest that the time to fully acclimate is longer for long-lived and large-bodied species, such as the asp viper, than for smaller ectotherms (Kingsolver & Huey, 2008; Rohr et al., 2018). Metabolic acclimation responses to ECEs in natural habitats may thus be constrained by the relatively short duration of these events

In conclusion, our results emphasize the independent effects of temperature and water availability on physiological responses to climate changes, but a potential synergetic effect when it comes to behavioral responses. These effects were found in minimally desiccant air conditions for asp vipers (i.e. WVPD of ~ -1 kPa; Dupoué et al., 2015b). Yet, summer droughts can also lead to much drier ambient conditions and will reduce the availability of moist habitats in the natural environment (Sutanto et al., 2020), which should further increase cutaneous and respiratory water loss rates (Dupoué et al., 2015b). Thus, ECEs in natural environments will involve the combined stressors of low air humidity, water shortages and high ambient temperatures and are likely to have greater impacts on organismal physiology than those predicted by this study (Rozen-Rechels et al., 2019; Todgham & Stillman, 2013). Using experimental treatments that better mimic the ECEs and the multidimensional changes in environmental conditions will provide novel insights in our understanding of the physiological responses of ectotherms. For example, ectotherms rely importantly on behavioral thermo-hydroregulation, such as micro-habitat selection, to control their heat budget and maintain their water balance (Guillon et al., 2014; Rozen-Rechels et al., 2020; Stahlschmidt et al., 2011). These behavioral responses are highly flexible and often occur at a quicker time scale than the one of physiological acclimation (Huey et al., 2015; Rozen-Rechels et al., 2020b, 2020a), which may allow organisms to buffer rapidly the short-term effects of ECEs on their physiological state. Further studies investigating organismal responses to climate change should investigate the potential for joint changes in behavioral and physiological strategies (Basson & Clusella-Trullas, 2015; Beever et al., 2017; Fuller et al., 2021; Rohr & Palmer, 2013).

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche under the ‘Aquatherm’ project (ANR-17-CE02-0013 to J.-F.L.G.), by the Conseil Régional de Nouvelle-Aquitaine under the ‘Aquistress’ project (2018-1R20214 to O.L.) and by the Conseil Général de Gironde under the ‘Climate Sentinels’ project (coordinators: Cistude Nature, Fanny Mallard). M. D. is currently supported by a doctoral grant from ED 227 Sorbonne University.

Ethical considerations

All experimentation procedures with animals listed in this study were approved by an independent ethical committee (Apafis#18149-2018122010137623_v2).

Acknowledgement

The authors thank Andréaz Dupoué for his helpful advices during the design of the respirometry system, Rodrigo Gavira who contributed to data acquisition, Charline Parenteau and Emmanuelle Seghrouchni for their help with the corticosterone assays, and Xavier Bonnet who provided 9 snakes from his captive colony. We also thank Sydney Hope for helpful comments on the English of the manuscript, and Sandrine Meylan for her constructive comments on an earlier draft of the manuscript. The CPER Econat is acknowledged for funding the osmometer.

Supplementary information

Closed-system respirometry

Individuals were placed in 2210 mL test chambers filled with outside air. The outside air was drawn into each test chamber using an air pump for duration 5 min where 99% of the air was renewed. The duration of each trial was set at 120 min to ensure sufficient O₂ suppression (0.5–1%) based on preliminary tests. Before the start of each trial, an air sample was collected from the outside air to quantify the baseline oxygen concentration. A second air sample was further collected from the test chamber at the end of each trial, and then analyzed to estimate snake oxygen consumption. Air samples were collected using two 140-ml syringes connected to the chambers via a three-ways stopcock. Air samples were pushed with an infusion pump (KDS 210, KD Scientific Inc, Holliston, USA) through Drierite to absorb moisture, and then sent at a controlled flow to a calibrated O₂ analyzer (FC10A, Sable Systems, Las Vegas, USA). Oxygen consumption was derived by subtracting final from baseline values, dividing by time (run duration) and accounting for the volume occupied by snakes.

Table S1. Best linear model used to confirm that there were no differences among groups at the beginning of the experiment.

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Initial body mass	Temperature	1,44	0.83	0.002	0.96
	Water	1,44	-2.56	0.03	0.88
Initial osmolality	Temperature	1,43	0.96	0.04	0.84
	Water	1,43	-3.97	0.69	0.41
Initial baseline CORT	Temperature	1,44	-0.49	0.03	0.87
	Water	1,44	-2.76	0.86	0.36
Initial stress-induced CORT	Temperature	1,44	-5.44	0.13	0.72
	Water	1,44	18.29	1.50	0.23
Initial ROMs	Temperature	1,44	1.28	1.04	0.31
	Water	1,44	-0.75	0.36	0.55
Initial OXY	Temperature	1,44	8.99	0.19	0.67
	Water	1,44	-10.37	0.25	0.62
Initial RMR	Temperature	1,44	0.22	0.09	0.75
	Water	1,44	0.01	0.0002	0.99

Table S2. Best mixed effect models to confirm that baseline corticosterone was not dependent on blood sample duration in each treatment.

Variables	Factor	df	Estimates	F	P	Variance components	
						σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Control & Water available							
Baseline CORT	Blood sample duration	1,10	-0.03	1.05	0.33	0.0007	10.13
Control & Water deprived							
Baseline CORT	Blood sample duration	1,11	0.02	2.84	0.12	4.59	5.31
Heatwave & Water available							
Baseline CORT	Blood sample duration	1,11	0.01	0.45	0.52	1.94	9.44
Heatwave & Water deprived							
Baseline CORT	Blood sample duration	1,11	0.02	1.15	0.30	5.41	9.20

Table S3. Best linear mixed effect model used to investigate the effects of thermal and water treatments on the body mass (g) of vipers throughout the experiment (N=47 individuals, n=517 observations). The best models had a linear decrease of body mass with time so time was included as a continuous covariate.

Variables	Factor	df	Estimates	F	P	Variance components	
						σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Body mass	Sex	1,514	-85.81	108.61	< 0.001	27.89	2.01
	Temperature	1,43	-0.57	0.005	0.94		
	Water	1,43	-4.14	0.26	0.61		
	Time	1,514	-0.13	77.46	< 0.001		
	Temperature × Time	1,514	-0.11	40.96	< 0.001		
	Water × Time	1,514	-0.15	83.57	< 0.001		

Table S4. Best linear model used to investigate the effects of thermal and water treatments on the post-treatment water intake (g). One individual was removed from this analysis because post-treatment water intake could not be assessed (defecated on Day34; from control and water-deprived group).

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,41	-0.01	1.03	0.31
	Temperature	1,41	0.87	0.32	0.57
	Water	1,41	4.07	6.70	0.01
	Temperature × Water	1,41	5.31	5.97	0.01

Table S5. Best linear models used to investigate the intra-individual changes in blood parameters in response to thermal and water treatments in 47 asp vipers. Plasma osmolality assays failed for two individuals, which were removed from the analysis on Δ osmolality (i.e. 1 individual from heatwave and water available group: initial value missing; 1 individual from control and water available group: final value missing).

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Δ osmolality	Initial plasma osmolality	1,41	-0.79	25.31	< 0.001
	Temperature	1,41	1.29	0.07	0.79
	Water	1,41	-15.74	10.02	0.002
Δ baseline CORT	Initial baseline CORT	1,42	-0.84	50.68	< 0.001
	Sex	1,42	5.63	5.69	0.02
	Temperature	1,42	5.03	4.82	0.03
	Water	1,42	6.43	7.75	0.008
Δ stress-induced CORT	Initial stress-induced CORT	1,43	-0.49	20.08	< 0.001
	Temperature	1,43	27.39	6.25	0.02
	Water	1,43	-5.77	0.27	0.61
Δ ROMs	Initial ROMs	1,42	-0.81	33.64	< 0.001
	Sex	1,42	-3.01	6.51	0.01
	Temperature	1,42	-1.01	1.36	0.25
	Water	1,42	-0.43	0.24	0.62
Δ OXY	Initial OXY	1,42	-1.07	46.37	< 0.001
	Sex	1,42	-76.71	12.19	0.001
	Temperature	1,42	-24.40	1.58	0.21
	Water	1,42	0.91	0.002	0.96

Table S6. Best linear mixed effect model used to investigate the response of RMR to thermal and water treatments throughout the experiment in 47 asp vipers (n=141 observations).

Variables	Factor	df	Estimates	F	P	Variance components	
						σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
log($\dot{V}O_2$)	Body mass	1,90	0.001	15.06	< 0.001	0.13	0.11
	Temperature	1,44	0.05	0.83	0.37		
	Water	1,44	0.01	0.04	0.83		
	Time	1,90	-0.02	0.93	0.33		
	Temperature \times Time	1,90	-0.02	1.18	0.28		
	Water \times Time	1,90	-0.01	0.12	0.72		

Table S7. Linear models used to investigate correlations between pairs of variables.

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,41	-0.01	0.41	0.52
	Δ osmolality	1,41	0.04	1.42	0.24
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,42	-0.01	0.22	0.64
	Final osmolality	1,42	0.10	4.99	0.03
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,43	0.01	0.49	0.48
	Δ baseline CORT	1,43	0.10	2.48	0.12
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,43	-0.01	0.14	0.70
	Final baseline CORT	1,43	0.11	1.42	0.24
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,43	-0.03	5.35	0.02
	Δ Body mass	1,43	-0.55	16.36	<0.001
Δ Body mass	Initial body mass	1,44	-0.04	7.67	0.008
	Δ baseline CORT	1,44	-0.15	6.95	0.01
Δ Body mass	Initial body mass	1,42	-0.04	7.99	0.007
	<u>Δ osmolality</u>	1,42	-0.07	3.95	<u>0.05</u>

Table S8. Linear mixed effect model used to investigate the relationship between baseline CORT levels and plasma osmolality across both sampling periods in 47 asp vipers.

Variables	Factor	df	Estimates	F	P	Variance components	
						σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Baseline CORT	Osmolality	1,44	0.05	2.19	0.15	3.57	8.88

Figure S1. Effect of thermal treatment on stress-induced corticosterone plasma concentrations (ng mL^{-1}). The top and bottom of the boxes represent the first and last quartiles, the horizontal line within the box represent the median and the whiskers represent the fifth and 95th percentiles. Points are individual data records. The * sign indicates significant differences among treatment groups based on Tukey post-hoc tests of contrasts.

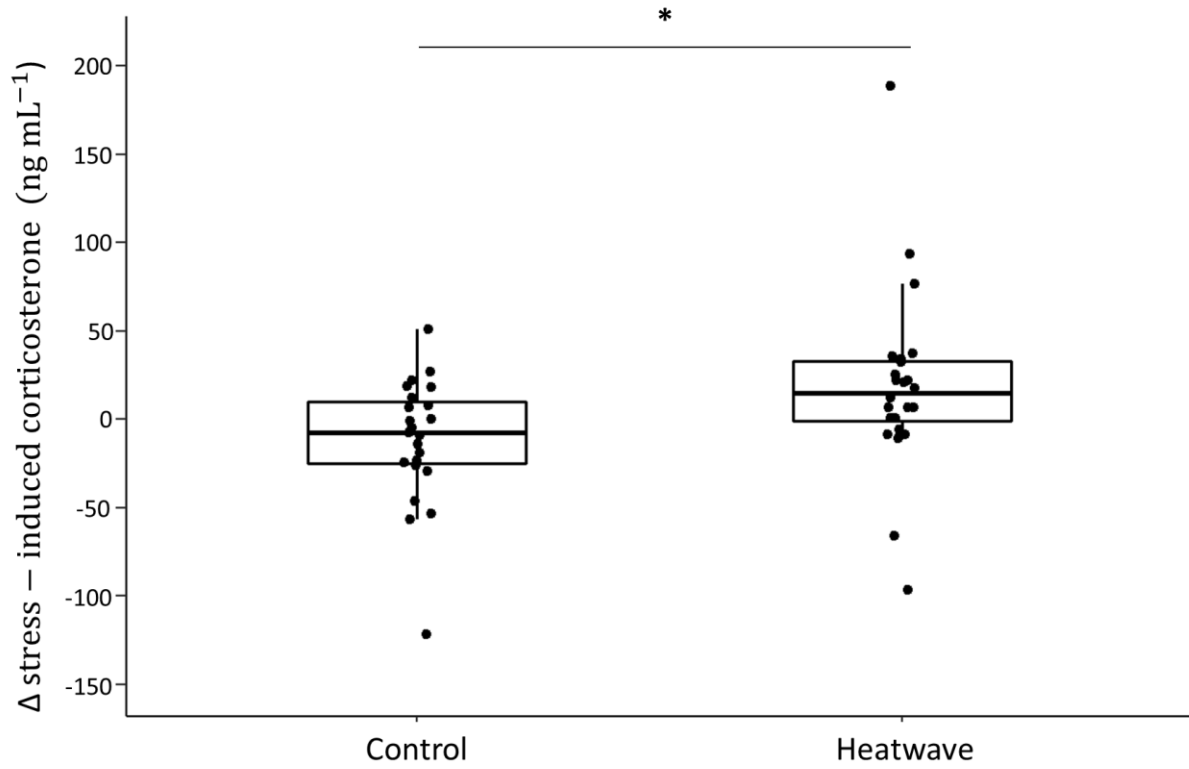


Figure S2. Correlation between body mass loss (g) and changes in baseline corticosterone ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) in all treatment groups (cold treatment: circle points; hot treatment: triangle points; water available: open points; water-deprived: filled points).

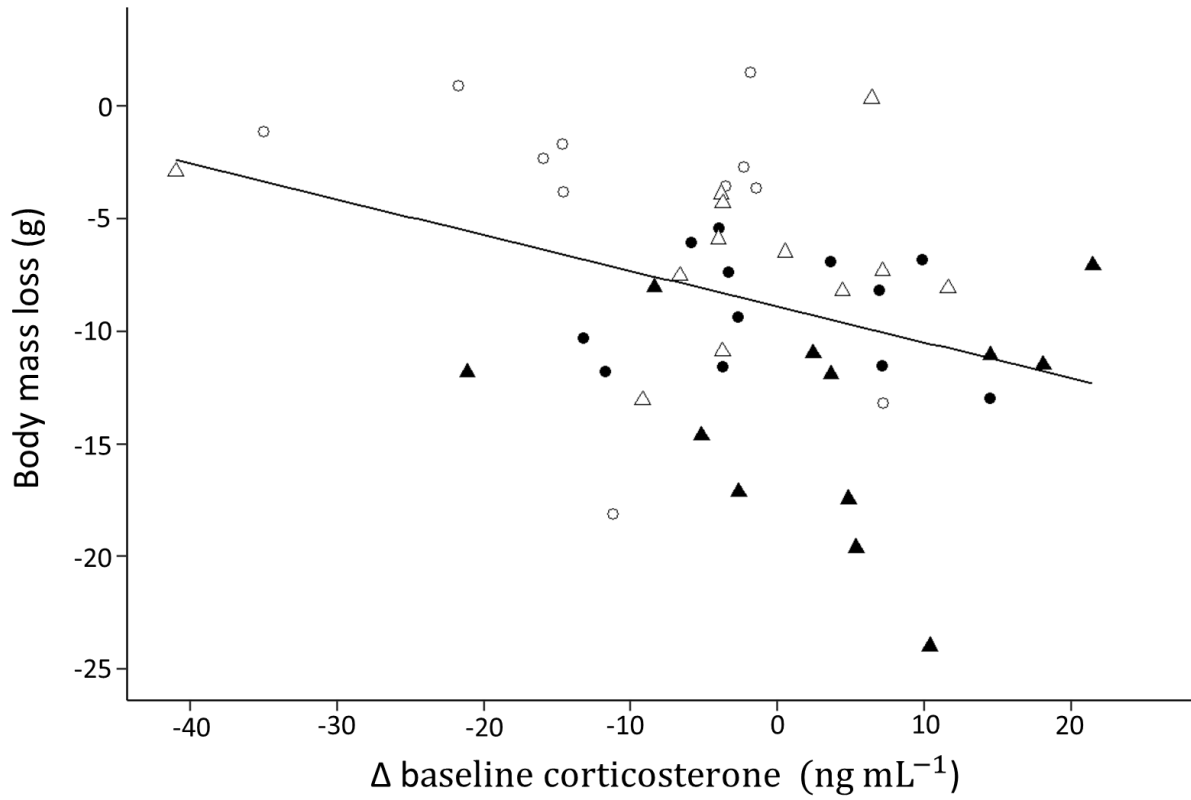
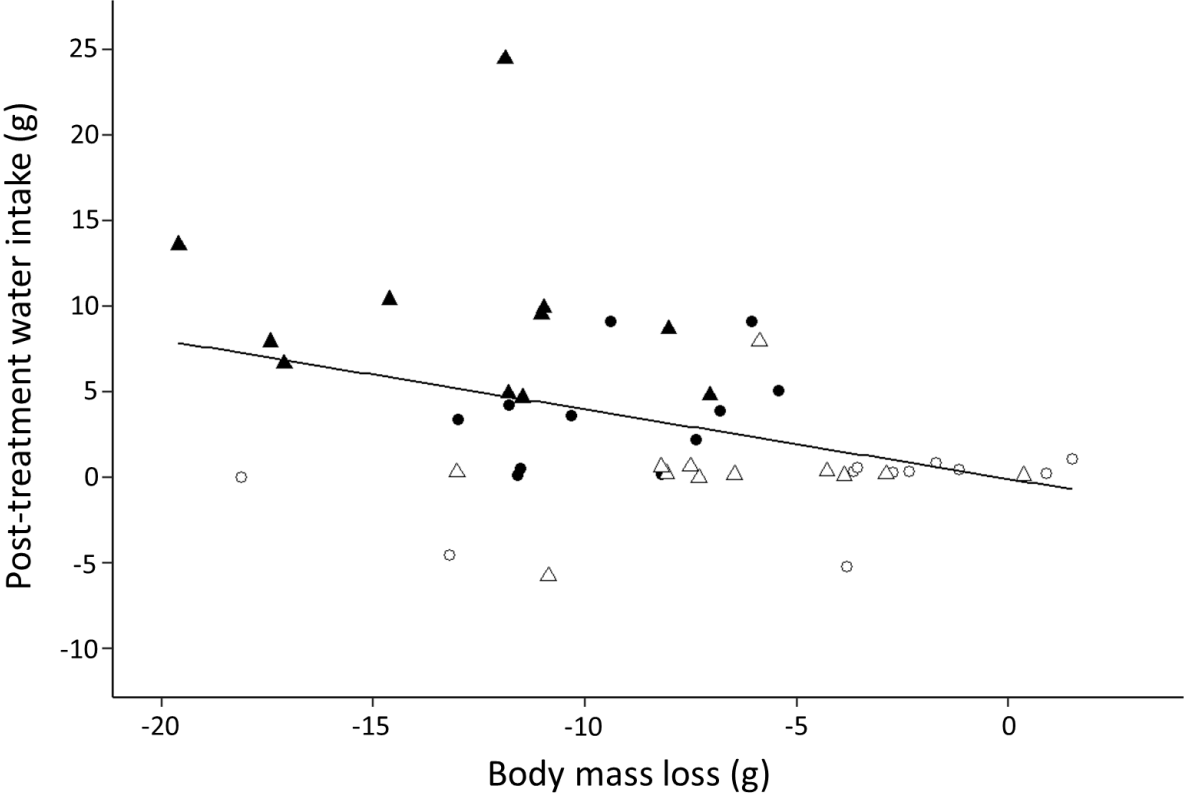


Figure S3. Correlation between post-treatment water intake (g) and body mass loss (g) through the experimental period in all treatment groups (cold treatment: circle points; hot treatment: triangle points; water available: open points; water-deprived: filled points).



II.3 Article 3

Running head: microclimate selection mitigates the effects of drought in an ectotherm

"Give me shelter": microclimate selection mitigates the physiological costs of drought in a terrestrial ectotherm

Mathias Dezetter^{1,2,*}, Jean François Le Galliard^{1,3}, Olivier Lourdais^{2,4}

¹ CNRS Sorbonne Université, UMR 7618, iEES Paris, Université Pierre et Marie Curie, Tours 44-45, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

² Centre d'étude biologique de Chizé CNRS, UMR 7372, 79360, Villiers en Bois, France

³ Ecole normale supérieure, PSL Research University, Département de biologie, CNRS, UMS 3194, Centre de recherche en écologie expérimentale et prédictive (CEREPEP-Ecotron IleDeFrance), 78 rue du château, 77140 Saint-Pierre-lès-Nemours, France

⁴ School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

* Correspondance :

Mathias Dezetter, CEBC UMR 7372 CNRS-ULR

79360 Villiers en Bois, FRANCE

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

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

E-mail: mathias.dezetter@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-5083-624X

In preparation for *Proceedings of the Royal Society B*:

Biological Sciences

Abstract

During extreme climate events, behavioural thermoregulation may provide a rapid response to avoid thermal stress and overheating. However, heat wave can also be combined with dry spells and limited water availability. Whether individuals can behaviourally mitigate drought constraints through micro-habitat selection remains largely unknown. Herein, we investigated the behavioural and physiological responses to air humidity and micro-habitat in a terrestrial ectotherm, the asp viper (*Vipera aspis*). We exposed individuals to a simulated heatwave with water deprivation during 23 days, and manipulated air water vapor density (wet air vs. dry air) and microclimate (wet shelter vs. dry shelter micro-habitat) in a two-by-two factorial design. We found that dry air conditions led to substantial physiological dehydration and muscle loss. However, individuals that were exposed to dry air but had access to a wet shelter used more often their shelters, which buffered the negative effects of water constraints on physiology (i.e., lower dehydration, mass and muscle loss). Our results provide the first experimental evidence that microclimate selection can mitigate the effects of a dry spell on hydration state in an ectotherm. These findings show that behavioral responses, usually only associated with thermoregulation, can also be applied to hydroregulation. This emphasizes the need for further studies to investigate organismal responses to climate change in a framework that integrates the behavior-physiology nexus and multiple stressors, including water constraints.

Keywords: microclimate selection; hydroregulation; behaviour; water; microclimate; multiple stressors

Introduction

Exposure to climate change-induced warming poses a major extinction threat to biodiversity because rising local temperatures force many terrestrial organisms to shift their range, alter the timing of their seasonal and daily activities, or spend more energy to maintain homeostasis (Riddell et al., 2019; Sinervo et al., 2010; Urban, 2015). Understanding these effects is complicated, however, by the fact that the degree of exposure to global warming depends both on microclimatic conditions (Pincebourde et al., 2016a; Potter et al., 2013b) and behavioural capacities to exploit these microclimatic conditions (Beever et al., 2017; Wong & Candolin, 2015). As a consequence, for some terrestrial organisms, climatic conditions at small spatial scales (i.e., those generated by the heterogeneous vegetation and soil layers) and the rapid and flexible behavioural responses of organisms to cope with microclimatic variability better predict their vulnerability to global warming than local climate trends (Beukema et al., 2021; Enriquez-Urzelai et al., 2020; Riddell et al., 2021). Thus, there is a common consensus that downscaling is needed to better understand the consequences of climate change and that one should better characterize how organisms respond to microclimatic heterogeneity to create their own climate niche (Sears et al., 2019; Woods et al., 2021; Zellweger et al., 2020).

In the context of global warming, the risk of overheating and associated sub-lethal or lethal costs are significantly reduced when an organism is capable of behavioural thermoregulation (Seebacher, 2005; Terrien et al., 2011). Behavioural thermoregulation allows organisms, especially terrestrial ectotherms, to exploit spatial variability in thermal conditions in order to maintain a constant and optimal body temperature despite temporal fluctuations in mean thermal conditions (reviewed in (Fuller et al., 2021; Angilletta, 2009; Rozen-Rechels et al., 2019). For example, terrestrial ectotherms typically live in a complex thermal landscape where they can change their posture and coloration (Black et al., 2019), seek shade (e.g., Mole et al., 2016; Pattinson & Smit, 2017), use burrows (e.g., Forget-Klein & Green, 2021; Moore et al., 2018; Tsunoda et al., 2018) or shift their daily activity patterns (e.g., Sinervo et al., 2010) to control heat gain, exploit cold and warm microclimates and ultimately avoid overheating risks. Given this, the most efficient thermoregulators should be better capable to maintain homeostasis even in a warming world (reviewed in Huey et al., 2012; Kearney et al., 2009). Yet, climate change does not only challenge body temperature regulation but also puts a strong pressure on osmoregulation (i.e., the homeostatic maintenance of salts and body

fluids balance) in terrestrial organisms (Kearney et al., 2018a; Peterman & Semlitsch, 2014; Riddell et al., 2019; Rozen-Rechels et al., 2019). For example, avoidance of overheating in desert endotherms involves thermoregulatory costs from evaporative cooling mechanisms, which implies that birds and mammals must actively seek or save water to maintain an optimal body temperature (Mitchell et al., 2018; Riddell et al., 2019; Riddell et al., 2021). Furthermore, in terrestrial ectotherms, trade-offs between thermoregulation and osmoregulation exist because evaporative water loss increases with body temperature and in the dry, wind exposed and sunny conditions typical of microhabitats used for basking (e.g., Anderson & Andrade, 2017; Dupoué et al., 2015b; Riddell et al., 2018). In addition, climate change often changes concurrently temperature, rainfall and moisture, especially during extreme climate events such as summer hot and dry spells (Dai, 2013; Trenberth et al., 2014; Ummenhofer & Meehl, 2017). Organisms can also buffer the physiological consequences of climate change for osmoregulation by means of behavioural hydroregulation, defined as the range of behavioural mechanisms that control water gains and water losses and help individuals maintain an optimal hydration state for their performance (Addo-Bediako et al., 2001; Pirtle et al., 2019; Rozen-Rechels et al., 2019). For example, reptiles living under water stress can maintain their water balance by reducing their behavioural activity (Davis & Denardo, 2010; Kearney et al., 2018) or by selecting cooler and moister microclimates (Dupoué et al., 2015b; Guillon et al., 2014; Pintor et al., 2016).

A wide range of hydroregulation behaviours has been observed in the wild, from moisture harvest in desert beetles, free-standing water seeking large mammals to soil moisture preferences in frogs (Rozen-Rechels et al., 2019; Wolcott & Wolcott, 2001), but, despite that, our knowledge of the buffering capacity of these behavioural hydroregulation mechanisms still remains limited (Pirtle et al., 2019; Rozen-Rechels et al., 2020). Behavioural hydroregulation is most obvious in wet-skin amphibians, because those species are often poor thermoregulators, are much less resistant to evaporative water loss than dry-skin ectotherms and are often more reliant on free-standing water and moist habitats to maintain an optimal water balance and complete their life cycle (Greenberg & Palen, 2021; Lertzman-Lepofsky et al., 2020; Nowakowski et al., 2018). Some amphibians can reduce cutaneous evaporative water loss by means of behavioural adjustments such as postural adjustments to reduce the water-exchange surface, mucus production or the selection of moister microhabitats (e.g., Lillywhite et al., 1997; Wolcott & Wolcott, 2001). There is evidence that several of these species perform an active behavioural hydroregulation to maintain an optimal hydration state

independently from thermoregulation (Mitchell & Bergmann, 2016), but whether their behavioural flexibility is sufficient to counter-act climate warming and extreme weather events remains unknown. Behavioural data are even more elusive for dry-skin ectotherms due to difficulties to disentangle hydroregulation and thermoregulation mechanisms (Pintor et al., 2016; Pirtle et al., 2019; Rozen-Rechels et al., 2019). Also, these species have a stronger resistance to evaporative water loss meaning that hydration state changes at a slower pace than body temperature and that behavioural hydroregulation would take place over longer time periods than thermoregulation (days or weeks versus hours or days, respectively). During a drought event, terrestrial organisms perceive moisture gradients through hygrosensing (Chown et al., 2011) and further rely on odours or other cues to locate free standing water (Serrano-Rojas & Pašukonis, 2021; Wood et al., 2021), such that changes in hydric conditions may trigger rapid changes in behaviours. On the other hand, behavioural hydroregulation might be controlled by the internal physiological state (i.e. hydration status), leading individuals for example to choose less desiccant microclimates as a water-saving strategy only when chronically stressed (Ladyman & Bradshaw, 2003; Rozen-Rechels et al., 2020).

Herein, we used an experimental design to characterize patterns and pace of hydroregulation behaviour in a dry-skin ectotherm, the asp viper (*Vipera aspis*), and assess the buffering capacity of hydroregulation behaviours for the optimal maintenance of hydration state when vipers must face an extreme drought event. The asp viper is an archetypal, slow moving snake species well-known for its very efficient thermoregulation behaviour combining basking activities and microclimate selection (Lorioux et al., 2013a; Lourdais et al., 2017). As a capital breeder and semi-arid adapted species, asp vipers can tolerate long periods of fast and water deprivation but this comes at the cost of lower body reserves, enhanced emaciation and physiological stress, and potential reduction in future fitness (Dupoué et al., 2015a; Dupoué & Lourdais, 2014a; Lorioux et al., 2016; Lourdais et al., 2002a). By employing an experimental design where the body temperature of vipers was tightly controlled, we were capable for the first time to study hydroregulation behaviours independently from body temperature regulation. We manipulated air moisture (wet versus dry air conditions) for three weeks to simulate weather conditions akin to those a summer dry spell. Water-deprived vipers were either allowed to hydroregulate by providing them with a wet shelter at the same temperature or not by providing them with a control shelter without damp substrate. We hypothesized that simulated drought will negatively impact osmoregulation and induce compensatory physiological responses such as mass and muscle loss (Brusch et al., 2018; Dupoué et al.,

2014) and a greater thirst reaction (Dezetter et al., 2021c; Dupoué et al., 2014; Edwards et al., 2021). At the same time, vipers should be able to mitigate these effects by behaviourally selecting wet microclimates that reduce evaporative water loss, especially when the simulated air is drier.

Material and Methods

Study species

The asp viper is a typical sit-and-wait foraging and capital breeding snake species distributed over southwestern Europe in relatively sunny and warm microhabitats (Lourdais et al., 2002b). This species is an active thermoregulator that maintain a high and relatively constant body temperature during daily activity period, notably adult females during gestation (Lorioux et al., 2013a; Lourdais et al., 2017). A functional trade-off exists between thermoregulatory needs and water loss in this species (Dupoué et al., 2015b): behavioral thermoregulation implies the use of warm microclimates, but both warmer temperatures and lower humidity increase cutaneous and respiratory water loss rates (Dupoué et al., 2015b; Guillon et al., 2014). Thus, microhabitat selection of warm and moist basking locations helps gravid females to mitigate the conflict between thermal needs and water loss (Lourdais et al., 2017). Access to water can be limited in natural habitats, especially during summer dry spells, which are increasing in frequency and intensity over the range distribution of this species (Spinoni et al., 2018). Asp vipers are tolerant to fast during several months (Lourdais et al., 2002a) and to water deprivation over multiple weeks (Dupoué et al., 2015a). Herein, we used 42 non-reproductive adults (27 females and 15 males) from a captive colony of asp vipers originating from western France and maintained at the Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, France.

Experimental design

Our experimental design consisted in a strictly defined manipulation of hydric conditions independently from air temperature. Thus, we used 4 controlled environment chambers (Vötsch VP 600, Balingen, Germany) allowing realistic simulations of daily fluctuations in air temperature and humidity. Asp vipers were deprived of water for three weeks, which corresponds to a moderate duration for a dry spell within the range distribution of this species (Perkins et al., 2012; Sutanto et al., 2020). The daily temperature cycle mimicked body temperature recorded during a typical heatwave that is a daytime temperature of 32°C for 14h

and a nighttime temperature of 26°C for 5h, with temperature either gradually increasing or decreasing for the remaining 5h (Colinet et al., 2015; Davy et al., 2017; Morash et al., 2018). We next manipulated air humidity (wet air vs. dry air) and microclimate (control shelter vs. wet shelter) using a balanced, two-by-two factorial design. First, we compared two contrasted water vapor pressure deficit (VPD) to expose individuals to either humid (VPD = 1.4 kPa in wet air) or more desiccant conditions (VPD = 3.1 kPa in dry air; Dupoué et al., 2015). To manipulate VPD, relative humidity (RH) was set at 60% (day) and 85% (night) for the wet air treatment; whereas RH was set at 25% (day) and 35% (night) for the dry air treatment. Second, we changed the heterogeneity of microclimates within the box of each viper by providing each individual with either a control or a wet shelter. Shelters consisted of small, custom made plastic containers (15cm diameter, 11cm height; one entrance of 3cm diameter on the side) filled with an artificial sponge and microfiber cloths. Once accustomed, vipers readily use these shelters in the laboratory. The sponge and microfiber cloths were changed every 3 days and were maintained dry in the control shelters but damp in the wet shelters in order to enhance air humidity. Thus, RH was high and constant (mean RH = 85%) inside the wet shelters, whereas it was similar to the ambient RH in the control shelters. Temperatures inside the shelters were similar to ambient temperatures. Note that we observed no condensation in the plastic shelters so drinking water from condensed water was deemed extremely unlikely.

Individual allocation and treatment

Individuals were housed individually in plastic boxes (35 x 20 x 17 cm) with one shelter, a sheet of newspaper as a substrate and a natural day light cycle (circa 12:12). Prior to the manipulation, we housed all individuals for one week in standard housing conditions inside the chambers with one control shelter for acclimation to general maintenance conditions and to the presence of a shelter. During this period, vipers had *ad-libitum* access to drinking water and were exposed to a standard climate (daily thermal cycle with 6h daytime at 30°C, 13h nighttime at 22°C, and mean VPD of -1.2 kPa). We did not feed the snakes in order to avoid confounding effects of digestion and energy intake on body mass (Stahlschmidt et al., 2015). Individuals were then randomly allocated in each treatment while ensuring a balanced sex ratio in each treatment. From Day 0 to Day 3, we provided a control shelter to all individuals in order to quantify baseline shelter use prior to the manipulation. From Day 3 to Day 20, we exposed individuals to one of the two types of microclimate treatment. From Day 20 to Day

23, we provided a wet shelter to all individuals in order to quantify wet shelter use at the end of the treatment. On Day 24, all individuals were provided with water *ad-libitum* and transferred to standard housing conditions to measure post-treatment water intake.

Variables collected and parameters measured

Microclimate selection over time

Every day from Day 0 to Day 23, we recorded with minimal disturbance the position of each individual 3 times per day during daytime (9:00, 13:00 and 17:00). Individual position in the box was categorized as either using the shelter or being outside. To analyze behavioral selection of microclimates, we calculated an individual score of shelter use from Day 3 to Day 20 (total number of times inside the shelter / 54 observations), and during each 3-day period (total number of times inside the shelter / 9 observations).

Changes in body mass and muscle condition

In the absence of food intake, body mass (BM) changes provide a good, noninvasive proxy of the whole body hydration state in squamate reptiles (Dupoué et al., 2014; Lillywhite et al., 2012). We therefore weighed (± 0.1 g) all individuals every 3 days to assess BM changes during the treatment period, and then weighed them again at the end of Day 24 to assess mass uptake and rehydration after the manipulation. From this, we calculated Δ BM as the difference between BM at Day 20 and at Day 0, which provides a proxy of cumulative dehydration during the manipulation. We also analyzed mass changes over each 3 days period during treatment (6 repetitions per individuals). Finally, post-treatment water was inferred from the difference between BM at Day 24 and Day 23.

Water deprivation also leads to change in the use of internal resources because bound water is a significant component of all body tissues that can be mobilized to support water demands during periods of water deprivation, especially wet protein mobilization from muscles (Brusch et al., 2018). In snakes, loss of skeletal muscles can support individual water demands during reproduction, but it is also costly and can alter performance (Brusch et al., 2018; Lориoux et al., 2016; Lourdais et al., 2013b; O. Lourdais et al., 2004). Tail width provides an accurate estimate of muscle dimension in snakes and therefore change in tail width can indicate loss of skeletal muscle (Lориoux et al., 2016). To quantify muscles loss during the treatment period, we thus measured tail width ($TW \pm 0.01$ mm, average from

triplicate) on Day 0 and on Day 20 using an electronic pressure-sensitive specimeter (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Japan) at the position of the sixth subcaudal scale. We calculated ΔTW as the difference between mean TW at Day 20 and Day 0.

Changes in plasma osmolality

We collected blood samples on Day 0 and Day 20 to measure changes in plasma osmolality, which measures the whole-body electrolyte and water balance in vertebrates (Peterson, 2002). We sampled individuals in a random order by sex and experimental treatments and collected 150 μL of blood through cardiocentesis, using a 1mL syringe and a heparinized 29-gauge needle. We immediately centrifuged the blood at 2000g, separated plasma from the red blood cells and stored the samples at -28°C until laboratory analysis. We determined plasma osmolality ($\pm 1 \text{ mOsm kg}^{-1}$) from 10 μL duplicates (intra-individual coefficient of variation: 0.36%) using a vapor pressure osmometer (model 5500, Wescor, Logan, UT, USA). We calculated $\Delta\text{Osmolality}$ as the difference between mean plasma osmolality before and after manipulation.

Statistical analyses

We conducted all analyses using the R software version 3.6.3 (R Core Team, 2020). We used linear models fitted with the *lm* function (*stats* package) and univariate linear mixed effects models fitted with the *lme* function (*nlme* package; Pinheiro et al., 2020). We performed backward elimination model selection starting from the full models. We checked that the residuals of our models fulfilled a Gaussian distribution using Shapiro-Wilk tests and that they had homogeneous variances across treatments. We further explored statistical differences between treatment groups using pairwise post-hoc Tukey tests (*emmeans*, package *emmeans* ; Lenth et al., 2019).

Microclimate selection

To investigate the effects of air humidity and micro-climate treatment on the behavioral response, we first built a linear model with the total shelter use score from Day 3 to Day 20 as the dependent variable, and sex, air humidity, microclimate treatment and the interaction between both treatments as explanatory factors. We used a similar model construction to analyze the baseline shelter use score (Day 0 to Day 3) and the wet shelter use score at the end of the treatment (Day 20 to Day 23). We further investigated repeated measures of shelter use

score according to treatments through time using a linear mixed effect model. We set the shelter use score per 3-day period as the dependent variable, sex as a fixed factor, and air humidity, microclimate treatment, time (3-day period) and their three-way interaction as explanatory variables. In this model, individual identity was included as a random, intercept term to control for non-independence of repeated measures on the same subjects and model average differences in shelter use among individuals.

Changes in body mass, muscle condition and plasma osmolality

First, we built independent linear models to confirm that there were no differences in BM, TW or plasma osmolality among groups at the beginning of the experiment. Models included the initial value as the dependent variable and air humidity, microclimate treatment, and their interaction as fixed effects. There were no differences in shelter use or physiological values (BM, TW, plasma osmolality) among treatments at the onset of the experiment (first period: Day 0 to Day 3, all $P > 0.05$, Table S1 & S2). To investigate the effects of the treatments on body mass loss over time, we used a mixed effect model for repeated measures with BM as the dependent variable, sex as a fixed factor, air humidity treatment, microclimate treatment, time (i.e. days on which individuals were weighed) and their three-way interaction as explanatory variables. In this model, individual identity was included as a random, intercept term.

We next built three independent linear models to investigate the effects of the treatments on total Δ BM, Δ TW and Δ Osmolality and post-treatment Δ BM. We included air humidity, microclimate treatment and their interaction as explanatory variables. We added sex as a fixed factor and the initial value as a linear covariate. We further examined whether Δ BM, Δ TW and post-treatment Δ BM were correlated with Δ Osmolality or final osmolality using linear regressions. To determine whether Δ Osmolality or final osmolality better explained physiological changes, we used the Akaike Information Criterion to compare models (*AIC*, package *stats*). We also investigated whether post-treatment Δ BM was correlated with total Δ BM during the manipulation using a similar model construction and comparison.

Shelter use and osmoregulation

To investigate the relationship between shelter use and body mass changes across individuals in the dry air treatment with access to wet shelter, we applied the methods from Pol and

Wright, 2009). We first calculated an individual-centered shelter use score at each 3-day period for each individual from the dry air and wet shelter treatment. We further built a linear mixed effect model with the change in body mass per 3-day period as the dependent variable and shelter use score together with individual-center shelter use score as explanatory variables. Individual identity was set as a random factor.

Results

Behavioral selection of microclimates

Shelter use from Day 3 to Day 20 was influenced by the interaction between air humidity and microclimate treatment ($F_{1,38} = 20.3, P < 0.001$). Supporting our prediction, only individuals maintained in dry air with a wet shelter used preferentially the shelter, while individuals from the other treatments almost never selected the shelter (Table 1). The shelter use score gradually increased over time in the dry air and wet microclimate treatment group, while it remained stable and low in all others groups (Air humidity \times Microclimate treatment \times Time: $F_{1,248} = 37.1, P < 0.001$; Fig. 1A). When individuals were provided with a wet shelter at the end of the treatment period (Day 20 to Day 23), shelter use was additively influenced by air humidity ($F_{1,39} = 14.4, P < 0.001$) and microclimate treatments ($F_{1,39} = 6.8, P = 0.01$). This was due to a behavioral shift in shelter use where vipers maintained in the control microclimate treatment rapidly increased their use of the shelter when it was turned wet (Fig. 1A).

Effects of air humidity and microclimate on morphology and osmolality

Vipers lost body mass during the experiment ($F_{1,290} = 1674.8, P < 0.001$). Air humidity and microclimate treatments interactively influenced BM loss over time (Air humidity \times Microclimate treatment \times Time: $F_{1,290} = 26.2, P < 0.001$). Vipers from the dry air and control microclimate lost BM at a higher rate than those maintained in other conditions (Fig. 1B). In the dry air treatments, vipers with access to a wet shelter lost BM at a slower rate than those with a control shelter. The total Δ BM over the experimental period followed the same pattern and was influenced by the interaction between both treatment types ($F_{1,37} = 4.5, P = 0.04$; Table 1). We found that within the dry air and wet shelter treatment, body mass loss per 3-day period was negatively correlated with individual-centered shelter use score ($F_{1,65} =$

26.1, $P < 0.001$). Higher selection of the wet shelter led to reduced body mass loss (Figure 2).

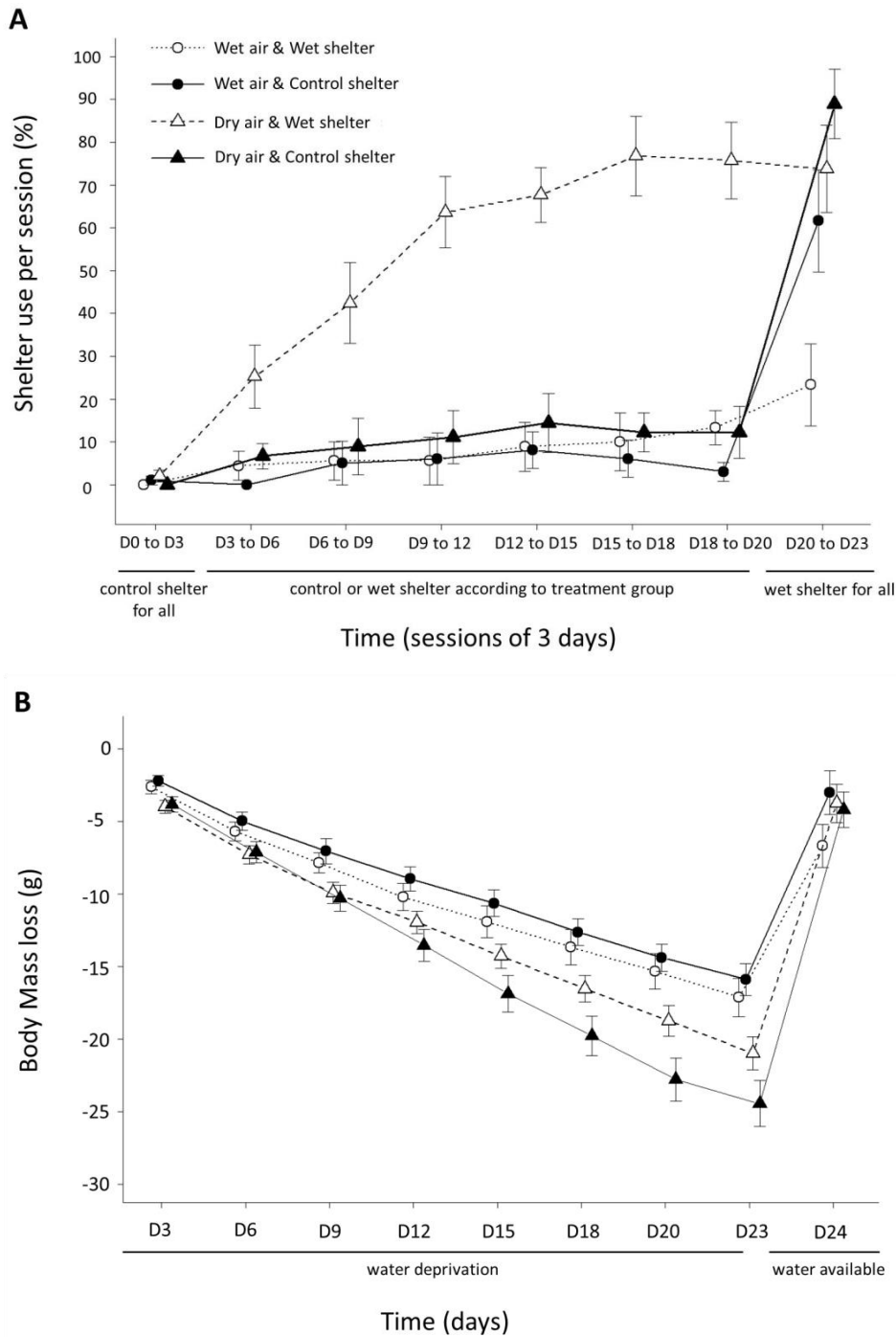


Figure 1. Effects of experimental conditions on microclimate selection and body mass loss. **(A)** Average shelter use score per session of 3 days (%) through time in each treatment group. Vipers had access to either a control or a wet shelter and were maintained in dry or wet air from Day3 to Day20. All individuals had access to a control shelter from Day0 to Day3, and to a wet shelter from Day20 to Day23. **(B)** Average body mass loss (g) loss through time in each treatment group. All individuals were deprived of drinking water from Day0 to Day 23. On Day24, all individuals were provided with drinking water *ad-libitum*. Errors bars represent ± 1 SE.

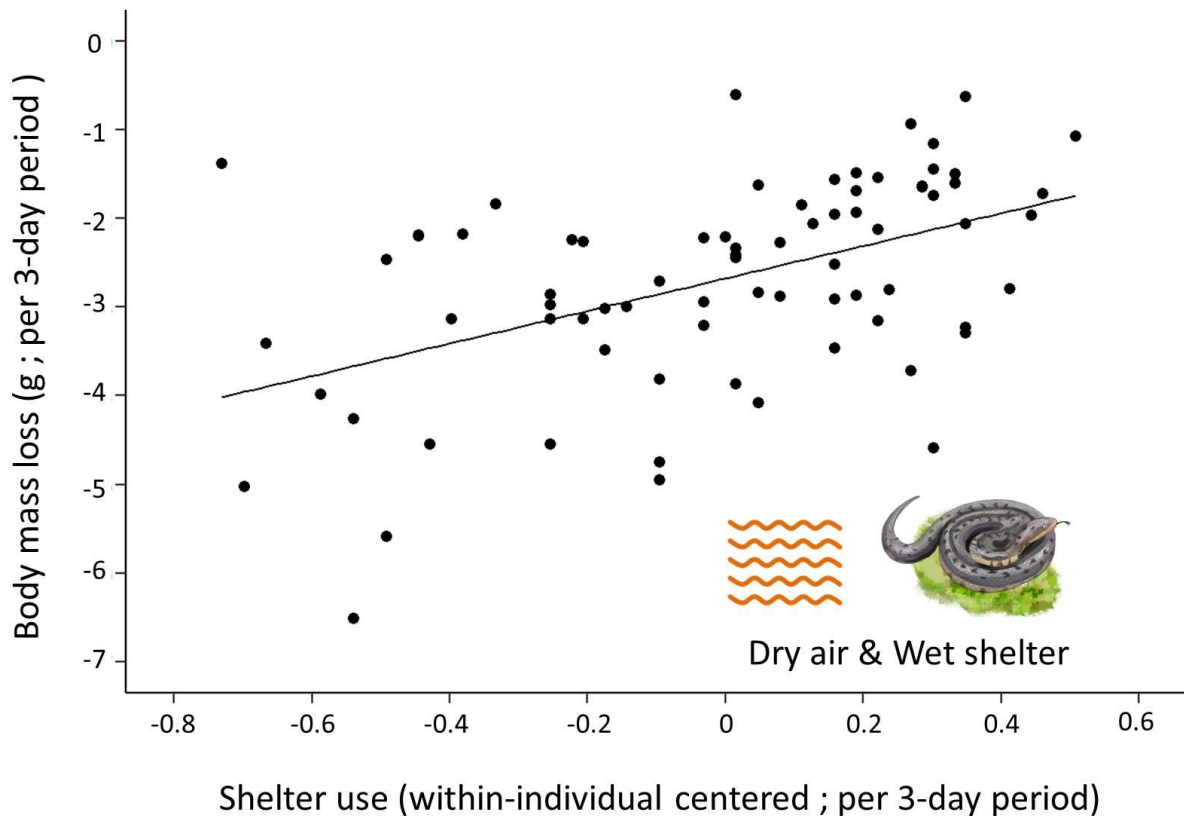


Figure 2: Correlation between body mass loss (g) and individual-centered shelter use score per 3-day period within the dry air and wet shelter group.

On the other hand, the tail width change ΔTW was additively influenced by air humidity ($F_{1,38} = 5.7, P = 0.02$) and microclimate treatments ($F_{1,38} = 5.6, P = 0.02$). Vipers had increased TW loss in dry air conditions and when they had access to a control shelter (Table 1; Fig. 3A).

The change in osmolality $\Delta Osmolality$ was influenced by sex ($F_{1,37} = 23.7, P < 0.001$), air humidity treatment ($F_{1,37} = 15.5, P < 0.001$) but only marginally by microclimate treatment ($F_{1,37} = 2.9, P = 0.09$). Individuals had a higher increase in osmolality in dry conditions, and tended to have a lower increase in osmolality when a wet shelter was available (Table 1). In addition, post-treatment water intake was additively influenced by air humidity ($F_{1,37} = 32.5, P < 0.001$) and microclimate treatments ($F_{1,37} = 8.7, P = 0.005$). Vipers exposed to dry air conditions and vipers with access to a control shelter drank more on Day 24 (Table 1; Fig. 3B).

Overall, BM loss was positively correlated with Δ Osmolality ($F_{1,39} = 55.9, P < 0.001$, Fig. 4A) and final osmolality ($F_{1,39} = 4.99, P < 0.001$), but most influenced by Δ Osmolality (Δ AIC > 2 ; Table S8). The TW loss was positively correlated with both Δ Osmolality ($F_{1,39} = 17.9, P < 0.001$, Fig. 4B) and final osmolality ($F_{1,39} = 19.2, P < 0.001$; Fig. S6), and models were equivalent (AIC < 2 ; Table S8). The post-treatment water intake was positively correlated with Δ Osmolality ($F_{1,39} = 66.0, P < 0.001$, Fig. 4C), final osmolality ($F_{1,39} = 80.0, P < 0.001$) and Δ BM ($F_{1,39} = 34.3, P < 0.001$), but most influenced by final osmolality (Δ AIC > 2 ; Table S8).

Individual variability

One male from the dry air and wet microclimate treatment almost never used the wet shelter (shelter use score of 10%). We thus performed complementary analyses excluding this individual when testing for the effects of treatments on morphology and osmolality (Table 1). We found similar qualitatively similar results for BM change, TW change and post-treatment water intake without this outlier, but not for change in plasma osmolality. Indeed, Δ Osmolality was significantly influenced by the interaction between air humidity and microclimate treatments ($F_{1,35} = 6.6, P = 0.01$) and by sex ($F_{1,35} = 23.5, P < 0.001$) without the “outlier”. Vipers maintained in dry air with a control shelter had a higher increase in plasma osmolality than the other three groups, whereas vipers in the dry air with a wet shelter had a lower increase in plasma osmolality similar to those of vipers in wet air treatments (Table 1).

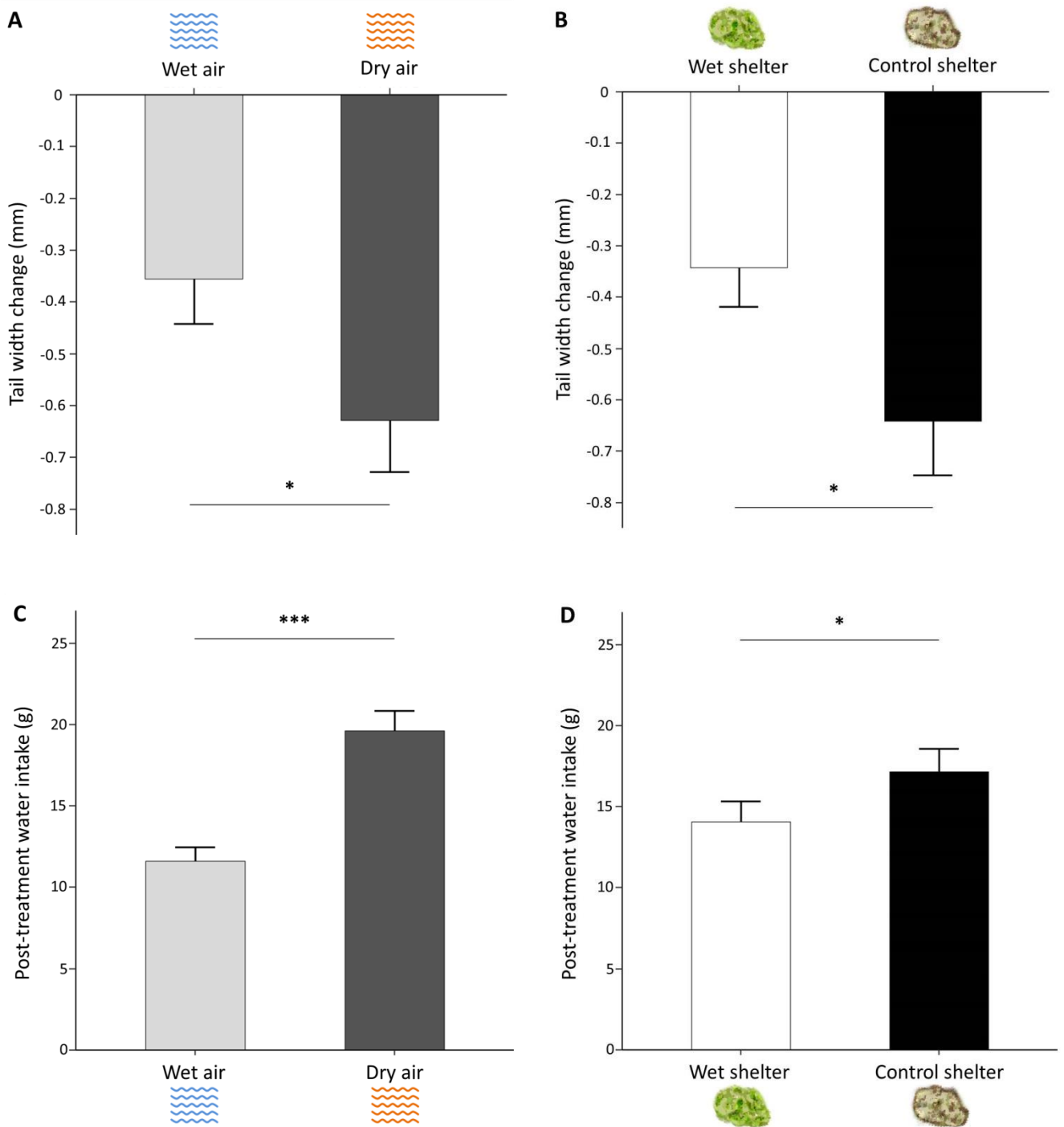


Figure 3. Additive effects of air condition and microclimate treatment on changes in tail width (mm) throughout the experiment (A; B) and on post-treatment water intake (g) following access to drinking water on Day24 (C; D). Errors bars represent ± 1 SE.

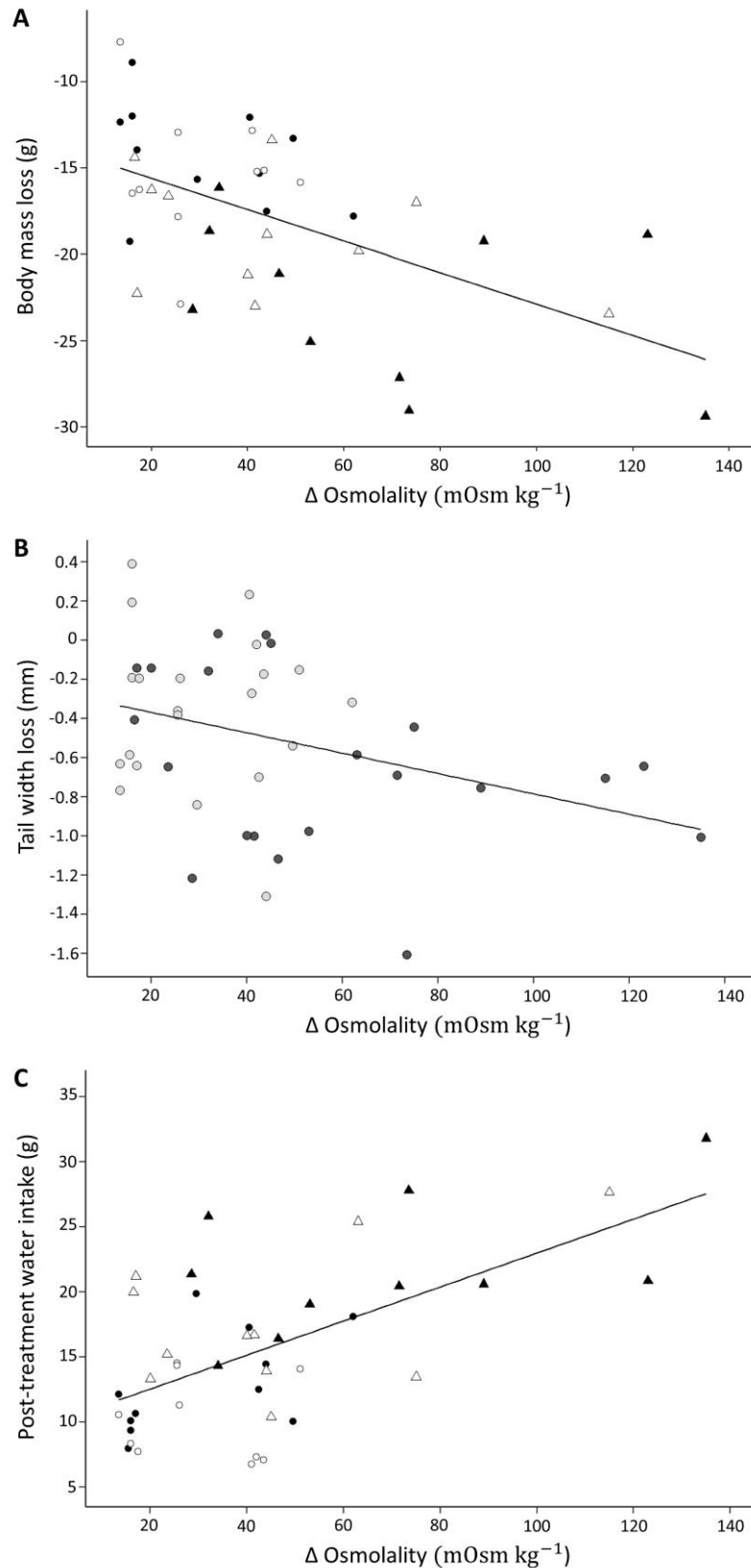


Figure 4. Correlation between BM loss (g, **A**), TW loss (mm, **B**), post-treatment water intake (g, **C**), and change in plasma osmolality (ng.mL^{-1}) in all treatment groups (Wet air: circle symbols; Dry air: triangle symbols; Wet shelter: open symbols; Control shelter: filled symbols). Regression line is included for significant relationship.

Table 1. Summary statistics of the parameters measured on individuals from each treatment group. Values written in *italic* are from the Dry air & Wet micro-habitat group when excluding the individual that almost never selected the micro-habitat (see details in statistical analysis section). Different superscripted letters are used to show significant differences between treatment groups for each variable.

Variables	Experimental treatments				
	Wet air		Dry air		
	Wet shelter (n=10)	Control shelter (n=11)	Wet shelter (n=11)	Control shelter (n=10)	
	Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)	Mean (\pm SE)	
Micro-habitat use (%)	7.96 (4.64) ^A	4.71 (3.48) ^A	58.58 (6.90) ^B	<i>63.33 (5.53)^B</i>	10.92 (3.57) ^A
Δ Body mass – Day20 (g)	-15.31 (1.23) ^A	-14.37 (0.93) ^A	-18.73 (1.05) ^{AB}	<i>-18.26 (1.04)^A</i>	-22.77 (1.49) ^B
Δ Plasma osmolality (mOsm.kg ⁻¹)	30.15 (4.17) ^A	31.45 (5.12) ^A	45.50 (8.96) ^{AB}	<i>38.55 (6.26)^A</i>	68.60 (11.87) ^B
Δ Tail width (mm)	-0.21 (0.09) ^A	-0.48 (0.13) ^{AB}	-0.46 (0.11) ^{AB}	<i>-0.43 (0.12)^{AB}</i>	-0.81 (0.15) ^B
Post-treatment water intake (g)	10.19 (1.01) ^A	12.94 (1.19) ^{AB}	17.63 (1.62) ^{BC}	<i>16.63 (1.40)^{BC}</i>	21.84 (1.66) ^C

Discussion

Microclimate preferences play a key role in determining organismal vulnerability to climate warming because they influence how individuals are exposed to climate changes and how they can avoid acute exposure to temperature extremes by a buffering effect of thermoregulation behavior, as shown in recent studies of the heat sensitivity of terrestrial organisms (Angilletta, 2009; Terrien et al., 2011). However, whether hydroregulation behavior allows organisms to avoid desiccation and maintain an optimal hydration state during extreme climate events has been understudied so far (Pirtle et al., 2019). Our results show that, when exposed to more desiccant conditions, individuals selected gradually more often the wet shelter and, therefore, buffered the negative effects of water deprivation on their physiological state. To our knowledge, this is the first experimental evidence that hydric preferences can mitigate the effects of a dry spell on hydration state in a terrestrial ectotherm.

Concurrent changes in morphology, plasma osmolality and post-treatment drinking behavior all indicated that the dry air conditions led to some degree of physiological dehydration and disturbed osmoregulation. In vipers deprived of food, whole body mass loss throughout the treatment period was higher in individuals exposed to dry air and these individuals also had the greatest increase in plasma osmolality, a clear marker of dehydration and chronic stress even though snakes can tolerate situations of hyperosmolality that could be fatal in other species (Brusch et al., 2020a; Lillywhite et al., 2012). In addition, muscle loss, as indicated by the change in tail width (Brusch et al., 2018; Lourdais et al., 2005) and post-treatment water intake were greater in individuals exposed to dry air compared to those exposed to wet air, and were correlated with physiological dehydration (i.e. final osmolality values). Altogether, this demonstrates that the dry air led to stronger levels of physiological dehydration and suggests compensatory responses in the form of higher levels of muscle catabolism to increase metabolic production of water (Brusch et al., 2018) and a stronger dehydration-induced thirst to increase free-standing water intake (Edwards et al., 2021; Lillywhite et al., 2019). Such dehydration and muscle loss can be costly (Anderson & Andrade, 2017; Lourdais et al., 2013). Therefore, this suggests that when combined with water deprivation, air humidity constraints can exacerbate organismal dehydration and alter performance, likely through increased water loss (Dupoué et al., 2015b). Altogether, these results emphasize that future studies should integrate multiple stressors (i.e. water availability and air humidity) in

their framework when investigating the effects of water constraints on organismal physiology (Rohr & Palmer, 2013; Todgham & Stillman, 2013).

We further found that, during the treatment period, vipers gradually preferred the wet shelter only when they were exposed to dry air conditions and whereas they tended to avoid the control shelter overall. In the treatment simulating a dry spell, microclimate selection gradually increased over time, reaching up to ~75% wet shelter use at the end of the treatment period. This pattern of increasing micro-habitat use mirrored the pattern of decreasing body mass over time, suggesting that micro-habitat use increased following a gradual shift in individual hydration status rather than as a direct behavioral response to water deprivation and a more desiccant air. Supporting this mechanism of state-dependent microclimate selection, we found that dehydrated vipers maintained in the dry spell treatment with a control shelter immediately shifted their microclimate preference towards the wet shelter at the end of the treatment period. Our results demonstrate that the constraints of dry air on internal hydration state influenced micro-habitat use in favor of wet micro-habitat selection, independently of tradeoffs with thermoregulation (Dupoué et al., 2015b; Ladyman & Bradshaw, 2003).

Supporting our predictions, microclimate preferences buffered the effects of dry air conditions on physiological dehydration. When a wet micro-habitat was available, individuals from the dry air treatment had on average lower body mass loss, tended to have a lower increase in plasma osmolality (the trend was significant when excluding one viper who was not responsive to wet shelter availability), and had a lower post-treatment water intake, which demonstrates that vipers had lower levels of dehydration compared to those with a control shelter. In addition, individuals with access to a wet micro-habitat also had lower TW loss (Fig.3B) compared to those with a dry micro-habitat, which suggests that they had a lesser need for physiological compensation (i.e. muscle mobilization) and lower costs of dehydration on individual performance (Anderson & Andrade, 2017; Lourdais et al., 2013). In addition, we found that within the dry air and wet shelter treatment, the more the individuals used the micro-habitat, the less they lost body mass. Behavioral selection of a moister microclimate thus use allowed individuals exposed to dry air to attenuate the effects of dry air on dehydration related BM loss. Altogether, our results demonstrate that the behavioural selection of a wet micro-habitat can mitigate the effects of desiccant conditions on organismal water balance.

Our study provides experimental evidence that individuals can behaviorally hydroregulate and avoid desiccant conditions by selecting wet micro-habitats, which, in turn, can buffer the physiological costs on organismal water balance. These findings demonstrate that micro-habitat selection, which is usually only associated with thermoregulation, can also be applied to hydroregulation. This emphasizes the need for further studies to investigate the organismal responses to ECEs in a framework that integrates both multiple stressors (Todgham & Stillman, 2013) and individual responses within a behavior-physiology nexus (Basson & Clusella-Trullas, 2015; Wingfield et al., 2017; Woods et al., 2015). The consideration of water constraints in relation to micro-habitat availability and individual micro-habitat selection will improve our understanding of organismal responses to climate change when used in predictive models (Kearney et al., 2018c; Moore et al., 2018; Riddell et al., 2019). These behavioral responses may allow organisms to cope with ECEs through short-term and flexible shifts in micro-habitat selection (Rozen-Rechels et al., 2020a), in contrast to physiological acclimation, which often takes place at longer time-scales and therefore has limited potential to buffer ectotherms from climate change (Gunderson & Stillman, 2015; Morley et al., 2019). Our results also have important implications for conservation biology because they suggest that the interaction between anthropogenic micro-habitat loss and ECEs may have exacerbated negative effects on organismal physiology and ultimately on species vulnerability to climate change (Gorissen et al., 2017; Moore et al., 2018). Management measures that favor heterogeneous habitats and humid micro-habitats may therefore help to mitigate the effects of climate change on ectotherms.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche under the ‘Aquatherm’ project (ANR-17-CE02-0013 to J.-F.L.G.), by the Conseil Régional de Nouvelle-Aquitaine under the ‘Aquastress’ project (2018-1R20214 to O.L.) and by the Conseil Général de Gironde under the ‘Climate Sentinels’ project (coordinators: Cistude Nature, Fanny Mallard). M. D. is currently supported by a doctoral grant from ED 227 Sorbonne University.

Ethical considerations

All experimentation procedures with animals listed in this study were approved by an independent ethical committee (Apafis#23238-2019121010574211_V3).

Authors' contributions

M.D., J.-F.L.G. and O.L. conceived the ideas and designed methodology. M.D. and O.L. carried all experimental procedures and collected the data. M.D. led the data analyses and writing of the manuscript together with J.-F.L.G. and O.L. and all authors contributed critically in result interpretation and manuscript writing. All authors gave final approval for publication.

Acknowledgement

The authors thank Rémi Ksas (Venom World) for providing the snakes for this experiment, and for his contribution through his ideas on humid microclimates, and Bruno Michaud for logistic support. We thank Andréaz Dupoué for his help with the laboratory analysis. We also thank Sydney Hope for helpful comments on the English of the manuscript.

Supplementary information

Table S1. Best linear model used to confirm that there were no differences among groups at the beginning of the experiment.

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Initial body mass	Air humidity	1,39	-0.56	0.001	0.97
	Microclimate treatment	1,39	0.38	0.0007	0.98
Initial tail width	Air humidity	1,39	-0.0003	0.00	0.99
	Microclimate treatment	1,39	-0.19	0.54	0.47
Initial osmolality	Air humidity	1,39	-4.48	1.88	0.18
	Microclimate treatment	1,39	-2.07	0.40	0.53

Table S2. Best linear model used to investigate the effect of air humidity and microclimate treatment on shelter use (%)

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Shelter use (Day0 to Day 3)	Air humidity	1,39	-0.50	0.31	0.58
	Microclimate treatment	1,39	0.50	0.31	0.58
Shelter use (Day 3 to Day20)	Air humidity	1,38	-6.21	0.79	0.38
	Microclimate treatment	1,38	47.66	46.85	<0.001
	Air humidity × Microclimate treatment	1,38	-44.41	20.34	<0.001
Shelter use (Day20 to Day23)	Air humidity	1,39	-38.83	14.45	<0.001
	Microclimate treatment	1,39	-26.71	6.84	0.01

Table S3. Best mixed effect model used to investigate the effect of air humidity and microclimate treatment on shelter use (%) through time (periods of 3 days, linear effect)

Variables	Factor	df	Estimates	F	P	Variance components	
						σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Shelter use	Air humidity	1,38	-0.005	0.004	0.94	0.13	0.13
	Microclimate treatment	1,38	-0.02	0.12	0.73		
	Time	1,248	0.01	5.84	0.02		
	Air humidity × Microclimate treatment	1,38	0.005	0.002	0.95		
	Air humidity × Time	1,248	-0.004	1.06	0.30		
	Microclimate treatment × Time	1,248	0.04	92.93	<0.001		
	Air WVPD × Microclimate treatment × Time	1,248	-0.03	37.12	<0.001		

Table S4. Best linear mixed effect model used to investigate the effects of air humidity and microclimate treatments on the body mass (g) of vipers throughout the experiment (N=42 individuals, n=336 observations). The best models had a linear decrease of body mass with time so time was included as a continuous covariate.

Variables	Factor	df	Estimates	F	P	Variance components	
						σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Body mass	Sex	1,37	-77.95	68.31	< 0.001	29.20	1.62
	Air WVPD	1,37	-0.50	0.002	0.97		
	Microclimate treatment	1,37	-0.37	0.0009	0.98		
	Time	1,290	-1.11	1674.78	< 0.001		
	Air WVPD × Microclimate treatment	1,37	-7.45	0.17	0.68		
	Air WVPD × Time	1,290	0.41	118.57	< 0.001		
	Microclimate treatment × Time	1,290	0.22	35.30	< 0.001		
	Air WVPD × Microclimate treatment × Time	1,290	-0.22	26.25	< 0.001		

Table S5. Best linear models used to investigate the effects of air humidity and microclimate treatments on physiological changes of vipers throughout the experiment (N=42 individuals).

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Δ Body mass (Day20)	Initial body mass	1,37	-0.01	0.66	0.42
	Air humidity	1,37	8.42	25.44	<0.001
	Microclimate treatment	1,37	4.07	5.95	0.02
	Air humidity × Microclimate treatment	1,37	-5.03	4.54	0.04
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,38	-0.84	0.006	0.94
	Air humidity	1,38	5.63	33.64	<0.001
	Microclimate treatment	1,38	5.03	6.09	0.02
Δ Tail width	<u>Initial Tail width</u>	1,38	-0.13	3.18	<u>0.08</u>
	Air humidity	1,38	0.29	5.74	0.02
	Microclimate treatment	1,38	0.29	5.61	0.02
Δ Osmolality	Initial osmolality	1,37	-0.35	1.26	0.27
	Sex	1,37	33.09	23.73	<0.001
	Air humidity	1,37	-26.19	15.49	<0.001
	<u>Microclimate treatment</u>	1,37	-11.29	2.98	<u>0.09</u>

Table S6. Best linear models used in complementary analyses excluding one individual that almost never used the shelter in the dry air & wet shelter group (shelter use: 10%). This models allow to better investigate how microclimate selection affected physiological changes (N=41 individuals).

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Δ Body mass (Day20)	Initial body mass	1,36	-0.01	1.20	0.28
	Air humidity	1,36	8.43	26.34	<0.001
	Microclimate treatment	1,36	4.64	7.56	0.01
	Air humidity \times Microclimate treatment	1,36	-5.59	5.66	0.02
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,37	0.008	0.27	0.60
	Air humidity	1,37	-7.67	32.55	<0.001
	Microclimate treatment	1,37	-3.97	8.72	0.005
Δ Tail width	<u>Initial Tail width</u>	1,37	-0.14	3.50	<u>0.07</u>
	Air humidity	1,37	0.27	4.97	0.03
	Microclimate treatment	1,37	0.30	6.01	0.02
Δ Osmolality	<u>Initial osmolality</u>	1,35	-0.53	3.63	<u>0.06</u>
	Sex	1,35	29.26	23.55	<0.001
	Air humidity	1,35	-39.00	23.10	<0.001
	Microclimate treatment	1,35	-29.34	12.62	0.001
	Air humidity \times Microclimate treatment	1,35	29.32	6.57	0.01

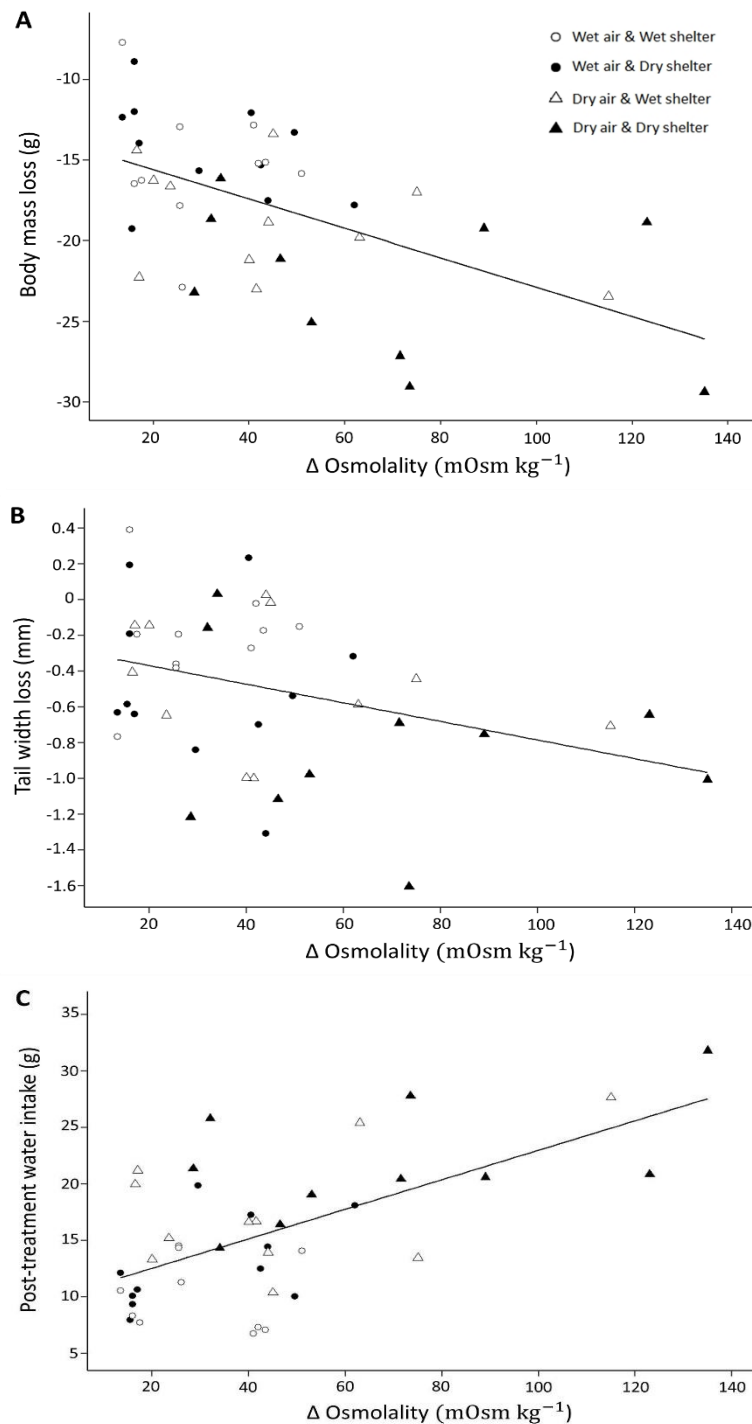
Table S7. Best linear models used to investigate correlations between pairs of variables

Variable	Factor	df	Estimates	F	P
Δ Body mass (Day20)	Initial body mass	1,39	-0.07	28.18	<0.001
	Δ Osmolality	1,39	-0.16	55.91	<0.001
Δ Body mass (Day20)	Initial body mass	1,39	-0.05	0.22	<0.001
	Final osmolality	1,39	-0.13	4.99	<0.001
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,39	0.08	25.83	<0.001
	Δ Osmolality	1,39	0.21	66.02	<0.001
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,39	0.07	24.42	<0.001
	Final osmolality	1,39	0.19	80.01	<0.001
Post-treatment water intake	Initial body mass	1,39	0.01	0.20	0.66
	Δ Body mass (Day20)	1,39	0.15	34.34	<0.001
Δ Tail width	Initial tail width	1,39	-0.30	15.69	<0.001
	Δ Osmolality	1,39	-0.01	17.87	<0.001
Δ Tail width	Initial tail width	1,39	0.07	14.30	<0.001
	Final osmolality	1,39	0.002	19.25	<0.001

Table S8. AIC model comparison between linear models used to investigate correlations between pairs of variables

Variable	Model	df	AIC
Δ Body mass (Day20)	~ Initial body mass + Δ Osmolality	4	222.51
	~ Initial body mass + Final osmolality	4	228.79
Post-treatment water intake	~ Initial body mass + Δ Osmolality	4	238.16
	~ Initial body mass + Final osmolality	4	232.91
	~ Initial body mass + Δ Body mass (Day20)	4	253.24
Δ Tail width	~ Initial body mass + Δ Osmolality	4	38.55
	~ Initial body mass + Final osmolality	4	37.54

Figure S1: Correlation between BM loss (g, **A**), TW loss (mm, **B**), post-treatment water intake (g, **C**), and change in plasma osmolality (mOsm/kg) during the experiment in all treatment groups (Wet air: circle symbols; Dry air: triangle symbols; Wet shelter: open symbols; Dry shelter: filled symbols). Regression line is included for significant relationships.



Chapitre III – Effets des contraintes hydriques pendant la reproduction



Femelle *Vipera berus* et ses nouveau-nés peu après la mise-bas en captivité © Mathias Dezetter

III.1 Résumé du chapitre

L'objectif de ce chapitre est de quantifier les effets des contraintes hydriques pendant la reproduction. **Une première hypothèse est que la privation d'eau durant la gestation devrait avoir des effets négatifs sur la physiologie maternelle, sur le succès reproducteur et/ou sur le phénotype des nouveau-nés.** Au cours de la gestation, ces effets devraient être corrélés avec la fécondité en raison des besoins hydriques cumulés de chaque embryon (Lourdais et al., 2017, 2015). **Je fais également l'hypothèse que des contraintes hydriques pendant les premières semaines de croissance devraient impacter négativement la trajectoire phénotypique des nouveau-nés.** J'ai conçu deux expériences au cours desquelles j'ai simulé de courtes périodes de sécheresse (privation de l'accès à l'eau de boisson) sur des vipères péliades gestantes et leur descendance.

Une première expérience (**Article 4**) m'a permis de tester les effets d'une période de sécheresse en début de gestation sur la physiologie maternelle et le développement embryonnaire. J'ai testé les prédictions suivantes : (1) la privation d'eau devrait conduire à une déshydratation marquée des femelles gestantes et à un stress physiologique ; (2) des ajustements physiologiques et comportementaux devraient prendre place face à ces contraintes incluant la mobilisation des réserves musculaires pour assurer les besoins hydriques des embryons et une diminution des préférences thermiques pour limiter les pertes hydriques ; (3) l'intensité des effets négatifs sur la physiologie et des compensations devrait être corrélés à la fécondité.

Une seconde expérience (**Expérimentation 5**) m'a permis de tester les effets de courtes périodes de contraintes hydriques en fin de gestation et au cours des premières semaines de vie des nouveau-nés sur le succès reproducteur, le phénotype des nouveau-nés et les trajectoires développementales des jeunes. J'ai testé les prédictions suivantes : (1) les contraintes hydriques prénatales devraient impacter négativement le succès reproducteur et conduire à des effets transgénérationnels négatifs sur le phénotype des nouveau-nés et leur trajectoire de croissance ; (2) les contraintes hydriques post-natales devraient impacter négativement le développement des nouveau-nés et réduire leur croissance corporelle.

Les résultats de l'**Article 4 (Figure X)** indiquent une forte sensibilité hydrique tôt dans la gestation : une courte privation de l'accès à l'eau en début de gestation a conduit à des effets

négatifs sur la physiologie maternelle (déshydratation, mobilisation énergétique et des réserves musculaires, et stress physiologique) et a induit une augmentation de la mortalité embryonnaire malgré le maintien des transferts en eau vers les embryons. Ces effets sont corrélés au nombre d'embryons, suggérant des coûts hydriques additifs liés au développement de chaque embryon. Au contraire, les résultats de l'**Expérimentation 5 (Figure 35)** indiquent que les contraintes hydriques en fin de gestation n'ont pas impacté le succès reproducteur ou le phénotype des nouveau-nés à la naissance, mais ont induit une croissance supérieure au cours des deux premières semaines de vie. Les contraintes hydriques post-natales ont quant à elle négativement impacté la croissance de la taille corporelle et des mâchoires des nouveau-nés, altérant potentiellement leur trajectoire future et leurs performances individuelles. Ces résultats soutiennent notre hypothèse de la sensibilité hydrique au cours de la gestation et suggèrent l'importance de considérer les effets des sécheresses sur la reproduction : altération de la physiologie maternelle, du succès reproducteur et de la croissance des nouveau-nés. Cependant, la privation d'eau en fin de gestation n'a pas affecté le succès reproducteur alors que nous avons prédit des effets plus marqués en fin de gestation en raison de l'augmentation des besoins hydriques des embryons au cours de leur croissance. Les conséquences démographiques de ces effets pourraient induire le déclin de populations exposées aux sécheresses plus fréquentes et plus intenses avec le changement climatique.

Dans ce chapitre, les résultats sont présentés sous la forme d'un article rédigé en anglais et publié dans *Conservation Physiology* (**Article 4**), et sous la forme de résultats préliminaires en français pour l'**Expérimentation 5**. L'**Article 4** est présenté dans cette section dans un format facilitant la lecture.

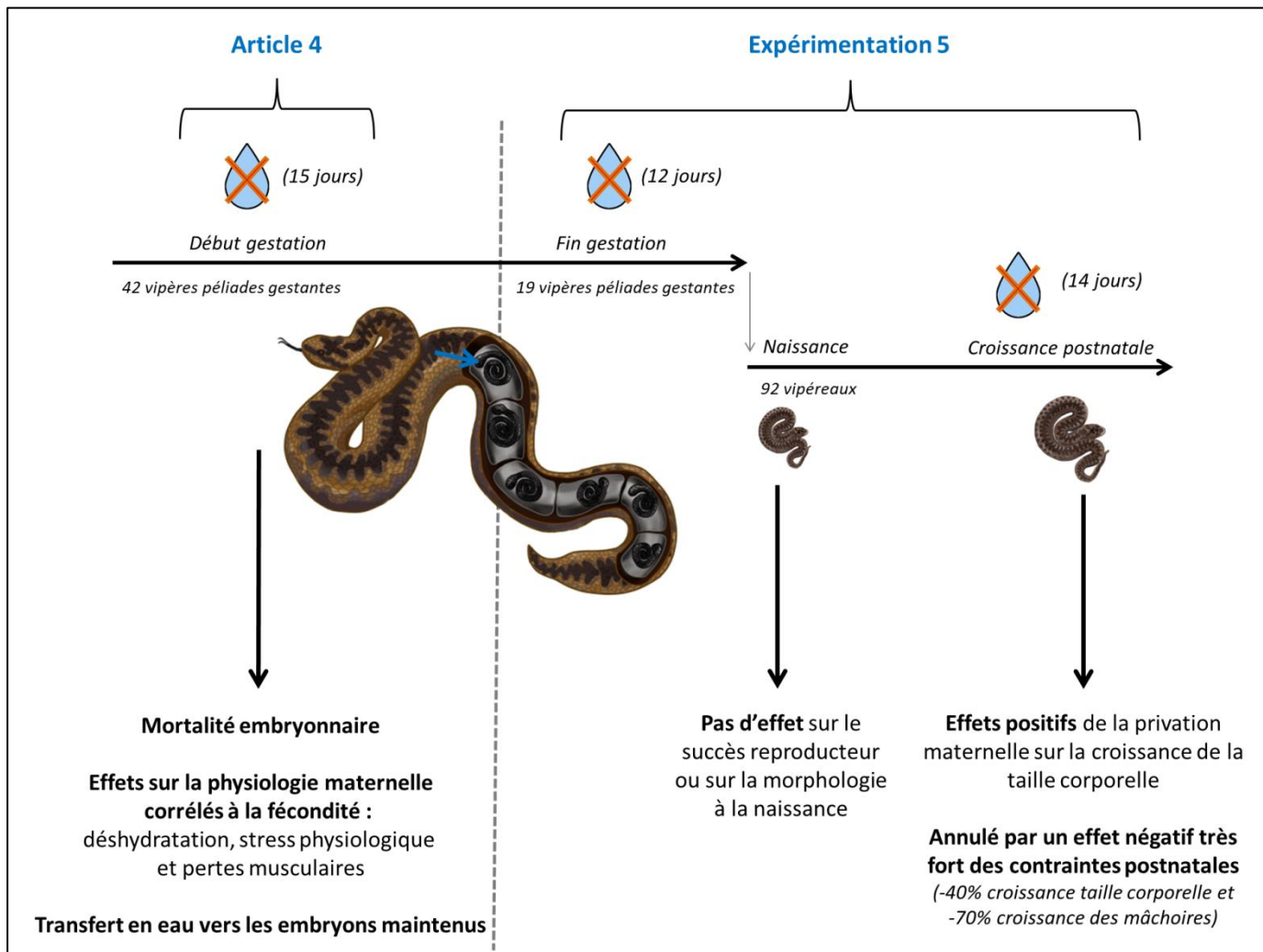


Figure 35 : Synthèse des résultats de l'Article 4 et de l'Expérimentation 5.

III.2 Article 4

Running head: effects of water deprivation during reproduction in a boreal ectotherm

Water deprivation compromises maternal physiology and reproductive success in a cold and wet adapted snake

Vipera berus

Mathias Dezetter^{1,2,*}, Jean François Le Galliard^{1,3}, Gaëtan Guiller⁴, Michaël Guillon², Mathieu Leroux-Coyau¹, Sandrine Meylan^{1,5}, François Brischoux², Frédéric Angelier², Olivier Lourdais^{2,6}

¹ Sorbonne University, CNRS, IRD, INRA, Institut d'écologie et des sciences de l'environnement (iEES Paris), 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 5, France

² Centre d'étude biologique de Chizé CNRS, UMR 7372, 79360, Villiers en Bois, France

³ Ecole normale supérieure, PSL University, Département de biologie, CNRS, UMS 3194, Centre de recherche en écologie expérimentale et prédictive (CEREEP-Ecotron IleDeFrance), 11 chemin de Busseau, 77140 Saint-Pierre-lès-Nemours, France

⁴ Le Grand Momesson, 44130 Bouvron, France

⁵ INSPE de Paris, Université Sorbonne, 10 rue Molitor, 75016 Paris, France

⁶ School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

* Correspondance :

Mathias Dezetter, CEBC UMR 7372 CNRS-ULR

79360 Villiers en Bois, FRANCE

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

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

E-mail: mathias.dezetter@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-5083-624X

Lay summary

We experimentally investigated the consequences of a short water deprivation during pregnancy in a cold- and wet-adapted boreal ectotherm. We show that water deprivation altered both maternal physiology and reproductive success, providing evidence that drought-induced dehydration and stress may lead to population declines in boreal ectotherms.

Accepted in *Conservation Physiology*

Abstract

Droughts are becoming more intense and frequent with climate change. These extreme weather events can lead to mass mortality and reproduction failure, and therefore cause population declines. Understanding how the reproductive physiology of organisms is affected by water shortages will help clarify whether females can adjust their reproductive strategy to dry conditions or may fail to reproduce and survive. In this study, we investigated the consequences of a short period of water deprivation (2 weeks) during early pregnancy on the physiology and behavior of a cold and wet-adapted ectotherm (*Vipera berus*). We also examined water allocation to developing embryos and embryonic survival. Water-deprived females exhibited significant dehydration, physiological stress and loss of muscle mass. These effects of water deprivation on water balance and muscle loss were correlated with the number of developing embryos. While water-deprived females maintained water transfer to embryos at the expense of their own maintenance, water deprivation also led to embryonic mortality. Overall, water deprivation amplifies the reproductive costs of water allocation to support embryonic development. The deleterious impacts of water deprivation on female current reproductive performance and on potential survival and future reproduction could lead to severe population declines in this species.

Keywords: dehydration, fecundity, reproduction, trade-off, water deprivation

Introduction

Understanding the effects of water shortage on the conservation status of terrestrial and semi-terrestrial animals is crucial since droughts are becoming more frequent and intense in some parts of the world with climate change (Cook et al., 2014; Trenberth et al., 2014a). Droughts have direct physiological effects on organisms, such as an increased risk of lethal dehydration, that can cause mass mortality events and rapid population declines in birds, mammals and amphibians (Albright et al., 2017; McMenamin et al., 2008; Tsuji et al., 2018) with potential impacts on trophic networks and communities (DuBose et al., 2019; McCreedy & Riper, 2015). However, the sub-lethal effects of water shortage on the physiology and life history of terrestrial animals remain relatively underexplored relative to the indirect effects mediated by trophic interactions (Amorim et al., 2015; Sperry & Weatherhead, 2008). Documenting and quantifying physiological effects of water shortage will help us to understand and predict population responses to recurrent droughts in wild animals.

One sensitive and crucial life history stage that droughts can affect is reproduction. Indeed, droughts can alter reproduction through indirect effects involving changes in species interactions and habitat features (del Cacho et al., 2013; McCreedy & Riper, 2015; McMenamin et al., 2008), most notably through bottom-up effects on the food available to females before and during the reproductive period (Amorim et al., 2015; Smith et al., 2019; Sperry & Weatherhead, 2008). In addition, a very limited number of studies suggest that individual dehydration and physiological stress caused by droughts can have direct negative effects on reproductive performance in mammals, birds and reptiles independently from food availability (Nelson, 1993; Zani & Stein, 2018). For example, income breeding lizards exposed to drought conditions have a lower body condition and reproductive success, which may cause recruitment failures even in the absence of food shortage (Cruz-McDonnell & Wolf, 2016; Zani & Stein, 2018). However, the extent to which such effects on reproduction are common or rare, and the extent to which reproductive females can mitigate these effects, remains largely unknown.

When water availability is limited during reproduction, a conflict exists between water allocation to offspring growth and development versus the allocation of water to the self-maintenance of the mother, which is similar to the well-known parent-offspring conflict for nutrients and energy (Crespi & Semeniuk, 2004; Kölliker et al., 2015). This allocation

conflict should translate into a water-based fecundity trade-off, where females producing more or larger offspring should face greater water demands during gravidity or pregnancy and also during post-natal growth in species with parental care that involves a stronger water expenditure (e.g. due to direct water provisioning to the offspring or increased water loss; Degen et al., 2004; Tieleman et al., 2003). Despite this allocation conflict, maintenance of homeostasis in situations of low water availability during reproduction might still be possible because females may cope with drought conditions through a variety of physiological and behavioral compensatory mechanisms (Ricklefs & Wikelski, 2002; Wingfield et al., 2011). However, drought should be especially challenging for many viviparous species given the water needs of embryos *in utero* during late gestation and the longer length of the gestation period relative to oviparous species with precocial young (Furness et al., 2015). Quantifying drivers and consequences of water-based reproductive trade-offs will help clarify whether females can compensate and adjust their reproductive strategy in response to drought conditions, or may fail to reproduce and survive (Cruz-McDonnell & Wolf, 2016; Martin & Mouton, 2020).

Terrestrial squamate reptiles can allocate considerable amounts of water to sustain offspring development *in utero* (Brusch et al., 2018; Lourdais et al., 2017, 2015). Their reproduction and demography can be directly influenced by drought and rainfall regimes in the wild (Capehart et al., 2016; Marquis et al., 2008; Winne et al., 2010). Even in cold and mesic environments where water is generally a less limited resource, these species may be critically dependent upon permanent access to free standing water to sustain the hydric costs of reproduction. First, squamate reptiles from more mesic and colder environments generally have higher basal metabolic rates, a lower cutaneous resistance to evaporative water loss (Cox & Cox, 2015) and a lower resistance to desiccation (Hertz et al., 1979; Sexton & Heatwole, 1968), which may expose them to a greater risk of dehydration when water shortage occurs (Guillon et al., 2014; Lourdais et al., 2013a). Second, squamate reptiles inhabiting boreal or high altitude habitats often have a viviparous reproduction mode (Foucart et al., 2018; Li et al., 2009), which may increase their vulnerability to water shortages during reproduction (Dupoué et al., 2020c; Jara et al., 2019; Pincheira-Donoso et al., 2013).

The European adder (*Vipera berus*) is a widespread Euro-Siberian snake adapted to cold- and wet-adapted environments. This viviparous species is a capital breeder that invest large amounts of energy and water into reproduction, which is characterized by a long gestation

time (2 to 4 months), a high reproductive effort (average relative clutch mass of 45% maternal body mass; see Madsen & Shine, 1993) and a low breeding frequency associated with a relatively high longevity (Bauwens & Claus, 2019a). Manipulative studies have already investigated the effects of water deprivation on the reproduction of a closely-related viper species living in semi-arid and warm climates (asp viper, *Vipera aspis*, see Dupoué et al., 2016, 2015; Stier et al., 2017). However, this topic has not been studied so far in this cold- and wet-adapted viper. The European adders have higher evaporative water loss rates, select more humid microhabitats, and thus are more vulnerable to water shortage than the congeneric asp viper (Guillon et al., 2014; Lourdais et al., 2013a). Within the European distribution of the species, drought frequency and severity is increasing, notably in Western European populations and during the summer season when female are pregnant (Spinoni et al., 2018). Investigating how water shortages affect European adders during reproduction is therefore crucial to predict how the already declining and threatened populations of adders (Gardner, 2019) will react to further threats caused by climate change. Here, we used a laboratory experiment to simulate a relatively short period of water deprivation (15 days) at the onset of pregnancy and analyze effects on the physiology, behavior and reproductive biology of female adders. We experimentally manipulated access to drinking water at early stages of pregnancy, and further examined intra-individual changes in muscle width, physiological state and embryonic development. In line with our scenario of a water-based fecundity trade-off, we hypothesized that water restriction would produce negative effects on female physiology and reproduction, especially in more fecund females. Building from recent knowledge in other snake species, we specifically predicted that (1) water deprivation should result in female dehydration and thus increased plasma osmolality (Dupoué et al., 2015a), increased baseline plasma corticosterone levels, increased oxidative stress and higher body mass loss (Dupoué et al., 2016; Stier et al., 2017); (2) water-deprived females might engage in protein catabolism (increased structural muscle loss) and maintain water transfer to the eggs in order to support the water requirements of their embryos during development (Brusch et al., 2018); (3) water-deprived females should lower their thermal preference to behaviorally reduce their evaporative water loss rates (Ladyman & Bradshaw, 2003); and (4) the intensity of these physiological and behavioral responses to water deprivation should be positively correlated with the number of developing embryos, reflecting the additive water constraints of fecundity (Lourdais et al., 2017).

Material and Methods

Study species

The European adder (*Vipera berus*) is a small viviparous snake widely distributed within the Palearctic region (Ursenbacher et al., 2006). Like most vipers, European adders rely on sporadic feeding events for energy intake and capital breeding to fuel reproduction. Females accumulate significant amounts of energy prior to breeding and breed intermittently (Bauwens & Claus, 2019a). In our study area located in western France, ovulation occurs in early June and parturition occurs from mid-August to late September depending on summer climate conditions. During pregnancy, food intake is often reduced or absent due to behavioral trade-offs with thermoregulation and physical constraints associated with the abdominal space needed for embryo development during gestation (Bauwens & Claus, 2019b). The energetic costs of reproduction can lead to female emaciation and substantial mortality rates (Bauwens & Claus, 2019a). In addition, this boreal species exhibits higher water loss rates and uses more humid microhabitats than congeneric species from semi-arid environments (Guillon et al., 2014). It is thus more likely to be vulnerable to water shortage, especially during reproduction when females display high metabolic rates, actively bask to maintain elevated thermal preferences and generally have high evaporative water loss rates (Lourdais et al., 2013a).

Capture and housing conditions

In May 2019, we captured 43 female adders from neighboring sites in western France within the Ille-et-Vilaine district, Brittany. We assessed the reproductive status of females in the field by direct visual inspection and palpation. Once the snakes were brought to the laboratory, we used high-resolution ultrasonography (Sonosite microMaxx, Inc., Bothell, WA, USA) to confirm the reproductive status. All reproductive females were then measured (snout-vent-length, SVL ± 0.5 cm), weighed (body mass, BM ± 0.1 g) and housed in outdoor enclosures for two weeks (located at the Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, Villiers-en-Bois, France) prior to laboratory manipulations. Each enclosure was equipped with an artificial shelter, water was provided ad-libitum, and the vegetation provided a mosaic of basking sites and shelters. During this period, we fed the vipers twice with laboratory mice. After two weeks in the enclosures, we transferred all individuals to laboratory cages (56×41×14 cm) where they were individually housed during two additional weeks to habituate to laboratory conditions before the experiment started. Room temperature was held

constant at 17°C. Each cage was equipped with a 22W-heating strip at one end to create a thermal gradient from ca. 20°C on the cold side to ca. 40°C on the warm side. Heat was provided for 6h per day. All cages were equipped with an artificial shelter and water was provided ad-libitum. Vipers were not given food during these 2 weeks and remained fasting throughout the experiment, similar to natural conditions during pregnancy (Bauwens & Claus, 2019b).

Assessment of reproductive effort and pregnancy stage

Before the start of the manipulation, we used high-resolution ultrasonography to quantify the number of developing embryos for each female. Because we did not keep the females until parturition, we could not measure the total litter mass to account for offspring size, and we rather used the number of developing embryos as a proxy of reproductive effort. At this early developmental stage, we were able to distinguish viable embryos from non-viable embryonic units by the presence of a clearly visible embryo in ultrasonography (black ovoid shape in the upper part of the embryonic unit). We estimated embryonic stage by measuring the size of embryos, evaluating the remaining vitellus, and assessing embryonic traits, using reference tables (Hubert & Dufaure, 1968) available for a closely related species (*Vipera aspis*; see Lorigou et al., 2013b). Ovulation is associated with skin shedding that provides a reliable index for the onset of gestation (Lorigou et al., 2013b). We thus determined this ovulatory ecdysis date of each viper by checking individuals during the housing period prior to the start of the experiment. Together with ultrasonography, this allowed us to control for pre-experimental differences in reproductive effort and breeding phenology prior to the start of our laboratory experiment.

Experimental treatment

Individuals were randomly assigned to the control ($n = 22$) or water-deprived ($n = 21$) hydric treatment. For the water-deprived group, drinking water was removed for 15 days, which is grossly similar to the mild, chronic summer droughts repeatedly occurring over the last decade in western France. At the end of the treatment period, water-deprived snakes were provided water ad-libitum immediately after blood-sampling (see below). Water-deprived and control individuals did not differ in BM or SVL at the beginning of the experiment (linear models, *lm*, package *stats*; initial BM, Treatment: $F_{1,41} = 0.1, P = 0.78$; SVL, Treatment: $F_{1,41} = 0.04, P = 0.84$). The experimental treatment occurred during early

pregnancy for all individuals (onset of treatment: 18.4 ± 8.2 % of developmental time; end of treatment: 38.4 ± 8.2 % of developmental time). The estimated embryonic stage at the onset of the experimental treatment was 20-21 (ovulated eggs with ovoid shape and distinguishable embryos) and it reached 36-37 at the end (embryos exhibit a typical spiral body shape, see Hubert and Dufaure, 1968). During the experiment, housing conditions remained the same as described above. After the end of the experimental procedure all individuals were fed and monitored. After two weeks they were released at their original capture site to minimize captivity duration and stress in this sensitive species (Gardner, 2019). Procedures were performed in accordance with laws relative to the capture, transport, and experimental use of *Vipera berus* (DREAL, CERFA number 13616*01) and approved by an independent ethical committee (Apafis #2019061722517180_v3).

Body mass and muscle condition

In the absence of food intake, BM changes provide a reliable estimator of hydration state in squamate reptiles (Dupoué et al., 2014). We thus weighed all individuals every 4 days ($BM \pm 0.01g$) throughout the experiment. At the end of the treatment period, we assessed the mass recovery associated with the water intake by weighing all individuals the day after subsequent access to water ad-libitum. Individuals were not fed before these measurements. In vipers, the energy allocation into reproduction can lead to significant emaciation with the mobilization of both fat reserves and muscle protein (Dupoué & Lourdais, 2014). During pregnancy, the loss of structural muscles is linked to fecundity-dependent resource allocation (Lorioux et al., 2016; Lourdais et al., 2013b). Water deprivation increases the mobilization of structural protein and the associated release of bound water, which represent ca. 75% of the mass of skeletal muscles (Brusch et al., 2018). The width of the tail further provides an accurate estimate of muscle dimensions in snakes and is a proxy for changes in muscular mass induced (Lorioux et al., 2016). We measured the width of the base of the tail using an electronic pressure-sensitive specimeter (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Japan) at the position of the sixth subcaudal scale. Tail width ($TW \pm 0.01$ mm) was repeatedly measured (in triplicate) right after each blood sampling (see below) and mean TW was calculated each time.

Blood parameters

We collected a blood sample from each individual two days before the start and on the last day of the experimental treatment, where females were sampled in a random order. We

immediately collected blood upon removing the female from her cage (mean blood sample duration 4.4 ± 2.0 min) in order to measure baseline corticosterone (CORT) levels (Romero & Wikelski, 2001). We recorded body temperature at the time of blood sampling using an infrared thermometer (Raytek Raynger MX2) at a standard distance and angle (300mm and 45° , therefore covering a 6mm area) with a constant emissivity coefficient (0.95). Body temperature was measured right before the blood samples when snakes were undisturbed within their thermogradient. This method gives close estimates of cloacal temperature measurements in vipers without the negative side effects of handling stress (Shine et al., 2002b). We collected blood samples (150 μ L) through cardiocentesis using a 1 mL syringe and a heparinized 29-gauge needle. Immediately after sampling, we allocated a small amount of blood into two 10 μ L micro-capillary tubes and centrifuged them. We measured hematocrit (Hct; length of red blood cells/ length of total sample) in duplicate for each blood sample. Next, for each sample, we transferred the remaining blood into Eppendorf tubes (0.5 mL) and centrifuged them for 3 minutes at 2000 x g. Plasma was stored at -28°C until laboratory analyses. We measured plasma osmolality from 10 μ L aliquots using a vapor pressure osmometer (± 3 mOsm kg^{-1} ; Vapro2, Elitech group). We determined plasma CORT concentrations (ng mL^{-1}) following a well-established radioimmunoassay protocol (see Dupoué et al., 2016 for details). Samples were run in three assays (intra-assay variation: 7.58%, inter-assay variation: 8.84%). We examined the oxidative status of females by measuring the concentration of reactive oxidative metabolites (ROMs) as an index of oxidative damage (Costantini, 2016), and antioxidant capacity (OXY) as an index of defense (Costantini, 2011b). We used d-ROMs colorimetric kits (MC003, Diacron International, Italy) to evaluate the activity of organic hyperoxides, and OXY-absorbent test kits (MC435, Diacron International Italy) to assess the non-enzymatic ability of diluted plasma samples (1:100) to neutralize an oxidant attack from hypochlorous acid. We determined intra-plate coefficients of variations in ROMs (1.2%) and OXY (2.7%) using a pooled plasma sample three times in each 96-well plate (one plate for ROMs, one for OXY).

Thermoregulation

To assess changes in thermoregulatory behavior, we collected body temperature (T_b) of the snakes once at the beginning and once at the end of the water deprivation period. All measurements were conducted during the daytime activity period (11:30 to 15:00), and we measured T_b (in triplicate) 4 times, at 30 minutes intervals, while the vipers had access to a

20-40°C thermal gradient within their cages. We collected surface T_b with an infrared thermometer following the method described above.

Embryonic water intake and survival

To determine the effect of the hydric treatment on embryonic development, water transfer to embryos, and on the survival of embryos, we monitored several embryonic traits using high-resolution ultrasonography (see Lorigou et al., 2013). We performed ultrasonography on Day 0, Day 13, and one week after the end of the water deprivation period. At each time point, we estimated embryonic stages using reference tables (Hubert & Dufaure, 1968). Vipers are lecithotrophic organisms (i.e. allocation of energy to the offspring by the mother is completed prior to ovulation, into the developing follicles), changes in embryonic units volumes during pregnancy are mostly driven by embryonic water intake (Dupoué et al., 2015a; Stewart, 2013). To evaluate water transfer to the embryos, we thus monitored the volume of embryonic units following a previously established method (see Dupoué et al., 2015). We collected ultrasonography images in the sagittal view of the most cranial and most caudal embryonic units. Then, we measured the height, length, and bicone (form) of the embryonic unit, and followed the method described in Maritz & Douglas (1994) to estimate embryonic unit volumes (cm^3). We quantified embryonic mortality by counting living embryos at the onset and at the end of the treatment period. At the end of the treatment period, we could clearly distinguish living from dead embryos by the presence of a heartbeat and body movements.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R software version 3.6.3 (R Core Team, 2020). To investigate how viper morphology (BM, TW), physiology (plasma osmolality, hematocrit, baseline CORT, ROMs, OXY) and body temperature (T_b) were affected by experimental conditions, we used univariate linear mixed effects models fitted with the *lme* function of the *nlme* package (Pinheiro J et al., 2020). For each univariate model, treatment group (control or water-deprived), session (effect of time), females' reproductive effort (number of living embryos at the onset of the treatment period) and their interaction were included as fixed factors. Individual identity was treated as a random effect. We dropped all non-significant interactions from these models using marginal *F* tests (*anova*, package *stats*). We further used pairwise post-hoc Tukey tests (*emmeans*, package *emmeans*) to investigate statistical differences between treatment groups at each measurement time (session). We made sure that

the residuals of our models did not significantly differ from a normal distribution (Shapiro-Wilk test, all $P > 0.05$) and ensured that all models met the assumptions of homoscedastic and normal residuals using diagnostic plots.

To assess the effect of the experiment on the pattern of BM loss, BM was the dependent variable, initial BM was included as a linear covariate, and treatment, session and their interaction were include as fixed factors. To investigate how hydric treatment and reproductive effort were related to the water intake subsequent to the end of the water deprivation (Δ BM between day 15 and day 16, see Fig.1A), we built a linear model (*lm*, package *stats*) with post-treatment water intake as the dependent variable, initial BM as a linear covariate, and hydric treatment, reproductive effort, and their interaction as fixed factors. We removed one female (reproductive effort = 12 living embryos) from this analysis because she reached a reversible humane endpoint and had to be manually rehydrated. We added blood sample duration and body temperature as fixed factors when testing for the effects on baseline CORT. We also log-transformed CORT to meet the assumptions of homoscedastic and normal residuals.

To further investigate the correlations between physiological variables, we performed independent linear regressions between pairs of traits. First, we built linear regressions with post-treatment water intake as the dependent variable and physiological response traits as a fixed factor (either Δ osmolality, Δ CORT or Δ ROMs where Δ indicates the intra-individual change during the experiment). Second, we built linear regressions with either Δ CORT or Δ ROMs as the dependent variable and Δ osmolality as the fixed factor. Lastly, we built linear regressions between changes in tail width and either Δ CORT, Δ osmolality or Δ ROMs as the fixed factor.

To determine the effects of water deprivation on embryonic development, we treated embryonic unit volume and embryonic stages as the dependent variables in two separate models, with hydric treatment, days since ovulation, and their interaction as fixed factors. Embryonic unit position (i.e. cranial or caudal) and reproductive effort were treated as fixed factors when testing for the effects on embryonic unit volume. We further used a generalized linear model (*glm*, family *quasibinomial*, package *stats*) to investigate the effects of water deprivation on embryonic mortality with hydric treatment as a fixed factor. We used the family *quasibinomial* rather than *binomial* because our model was slightly over-dispersed (ϕ

= 2.96). In order to determine if individual reproductive effort and physiological response traits (Δ osmolality, Δ Hct, Δ CORT, Δ ROMs, Δ OXY) best predicted variation in embryonic mortality, we built 6 independent generalized linear models where each of these variables was included as a covariate. We next compared all models using a quasi-AIC (package *AICcmodavg*) model selection approach.

Results

Maternal morphology

We observed a significant BM loss throughout the experiment (Session: $F_{3,123} = 226.8, P < 0.001$) and BM loss was dependent on the initial BM (positive slope, $F_{1,39} = 3927.0, P < 0.001$) and hydric treatment (Treatment: $F_{1,39} = 9.8, P = 0.003$, Treatment \times Session: $F_{3,123} = 87.4, P < 0.001$). Water deprivation induced a higher rate of BM loss in pregnant females (post hoc; $P < 0.05$; Fig.1A). During the post-treatment water intake, water-deprived individuals abundantly drank water and rapidly gained mass to attain a BM that was similar on average to that of control snakes (post hoc test on last BM value; $P = 0.188$; Fig.1A). We also found that post-treatment water intake was dependent on the initial BM ($F_{1,37} = 6.2, P = 0.02$) and the interaction between hydric treatment and reproductive effort (Treatment \times Reproductive effort: $F_{1,37} = 5.4, P = 0.02$). Within the water-deprived group, mass gain during the re-hydration was positively related to the number of live embryos (Fig.2A).

In addition, the tail width (TW) of water-deprived females decreased more than in control individuals on average (Treatment \times Session: $F_{1,39} = 4.4, P = 0.04$, Fig.1B). The change in TW was also influenced by reproductive effort (Reproductive effort: $F_{1,39} = 4.4, P = 0.04$) and a three-way interaction between treatment, time and reproductive effort (Treatment \times Session \times Reproductive effort: $F_{1,39} = 8.8, P = 0.005$). The TW loss was positively related to the number of live embryos within the water-deprived group but not in the control group (Fig.2B).

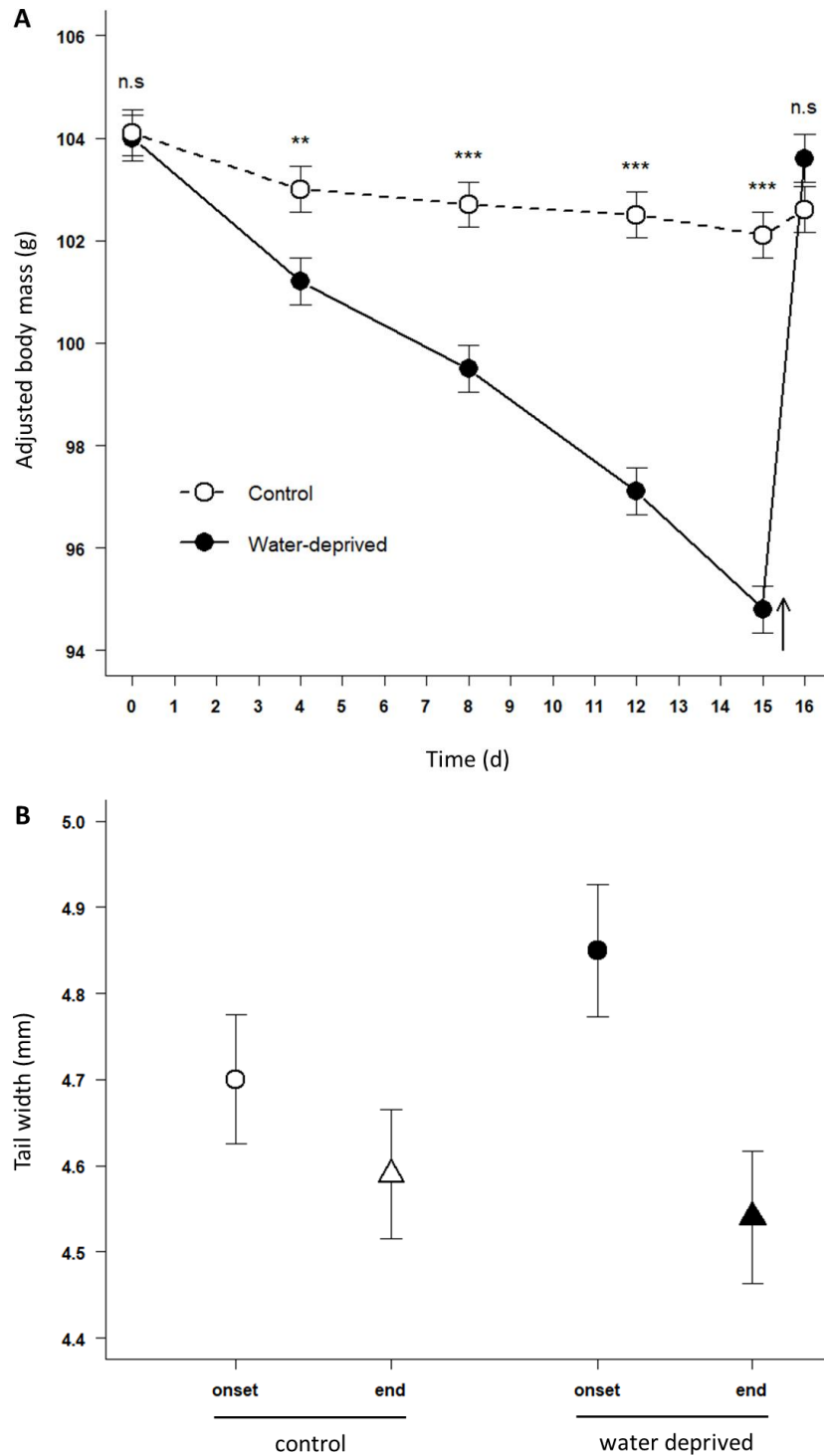


Figure 1. (A) Effect of the hydric treatment on body mass (mean \pm SE, control individuals: open circles, dashed line and water-deprived individuals: filled circles, full lines). Body mass values were adjusted to initial body mass. Arrows indicate the end of the dehydration period, and subsequent access to water ad-libitum for water-deprived females. Significant differences from post-hoc tests between control and water-deprived females are symbolized: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; n.s. nonsignificant. (B) Effect of water deprivation on changes in tail width (mm) of pregnant female adders. Open dots represent means (\pm SE) for control females, and filled dots represent means (\pm SE) for water-deprived females. Circles represent values at the onset of the experimental period and triangles represent values at the end.

Maternal physiology and thermal preferences

Plasma osmolality increased in water-deprived pregnant females throughout the experiment while there was no significant change in the control group (Treatment \times Session: $F_{1,40} = 145.3, P < 0.001$; Table1, Fig.3A). On the contrary, Hematocrit was not influenced by the hydric treatment ($F_{1,40}=0.003, P=0.96$), the session ($F_{1,41}=1.0, P=0.32$), their interaction ($F_{1,41}=1.3, P=0.25$), or reproductive effort ($F_{1,40}=0.4, P=0.50$). Baseline CORT was influenced by the interaction between treatment group and time (Treatment \times Session: $F_{1,32} = 5.3, P = 0.03$), increased slightly with the duration of the blood sample ($F_{1,32} = 4.4, P = 0.04$), and also increased with the body temperature during blood sampling ($F_{1,32} = 8.3, P = 0.006$). Baseline CORT levels did not differ between treatment groups at the onset of the manipulation (post hoc; $P = 0.38$), but were slightly higher in the water-deprived group at the end of treatment (post hoc; $P = 0.04$; Table1; Fig.3B).

Oxidative damage (ROMs) was also significantly influenced by the interaction between hydric treatment and time (Treatment \times Session: $F_{1,40} = 5.7, P = 0.02$). Plasma ROMs increased in the water-deprived group throughout the experiment, whereas plasma ROMs of the control group did not change (Table1; Fig.3C). In contrast, the non-enzymatic antioxidant capacity remained relatively constant during the study (plasma OXY; Table1; Fig.3D). The plasma OXY was not influenced by the hydric treatment ($F_{1,39}=1.7, P=0.21$), the session ($F_{1,40}=0.3, P=0.60$), their interaction ($F_{1,40}=0.1, P=0.77$), or reproductive effort ($F_{1,39}=0.5, P=0.48$). We also found no effect of water deprivation on female T_b (Treatment \times Session: $F_{1,251} = 0.1, P = 0.72$; Table1).

Post-treatment water intake was positively correlated with intra-individual changes in plasma osmolality ($F_{1,40}=181.7, P < 0.001$) and in ROMs ($F_{1,40}=33.5, P=0.007$), but not with changes in baseline CORT ($F_{1,33}=1.2, P=0.28$). Δ ROMs was positively correlated with Δ osmolality ($F_{1,41}=4.9, P=0.03$) but not with Δ CORT ($F_{1,34}=1.7, P=0.19$). TW loss during the treatment period was positively correlated with both Δ osmolality ($F_{1,41}=11.6, P=0.001$) and Δ CORT ($F_{1,34}=6.9, P=0.01$), but not with Δ ROMs ($F_{1,41}=1.6, P=0.22$) (see supplementary information).

Table 1. Summary statistics of the physiological parameters measured on pregnant European adders from control and water-deprived groups at the onset and at the end of water deprivation.

		Hydric treatments		
		Control	Water-deprived	
		(n=22)	(n=21)	
	Variables	Mean (\pm s.e.m.)	Mean (\pm s.e.m.)	Post-hoc
Onset	Osmolality (mOsm.kg ⁻¹)	318 (2.21)	319 (2.26)	P = 0.77
	Hematocrit (%)	24.2 (0.82)	24.3 (0.84)	P = 0.96
	Baseline CORT (ng mL ⁻¹)	177 (14.50)	169 (14.70)	P = 0.38
	ROMs (H ₂ O ₂ dL ⁻¹)	3.75 (0.23)	3.13 (0.24)	P = 0.07
	OXY (μ mol HClO mL ⁻¹)	193 (11.0)	176 (11.3)	P = 0.28
	<i>T_b</i> (°C)	31.6 (0.34)	30.8 (0.34)	P = 0.10
End	Osmolality (mOsm.kg ⁻¹)	320 (2.21)	363 (2.26)	P < 0.001
	Hematocrit (%)	23.5 (0.82)	24.7 (0.84)	P = 0.31
	Baseline CORT (ng mL ⁻¹)	199 (14.30)	251 (14.00)	P = 0.04
	ROMs (H ₂ O ₂ dL ⁻¹)	3.56 (0.23)	3.64 (0.24)	P = 0.81
	OXY (μ mol HClO mL ⁻¹)	186 (11.0)	174 (11.3)	P = 0.45
	<i>T_b</i> (°C)	32.0 (0.34)	31.6 (0.35)	P = 0.44

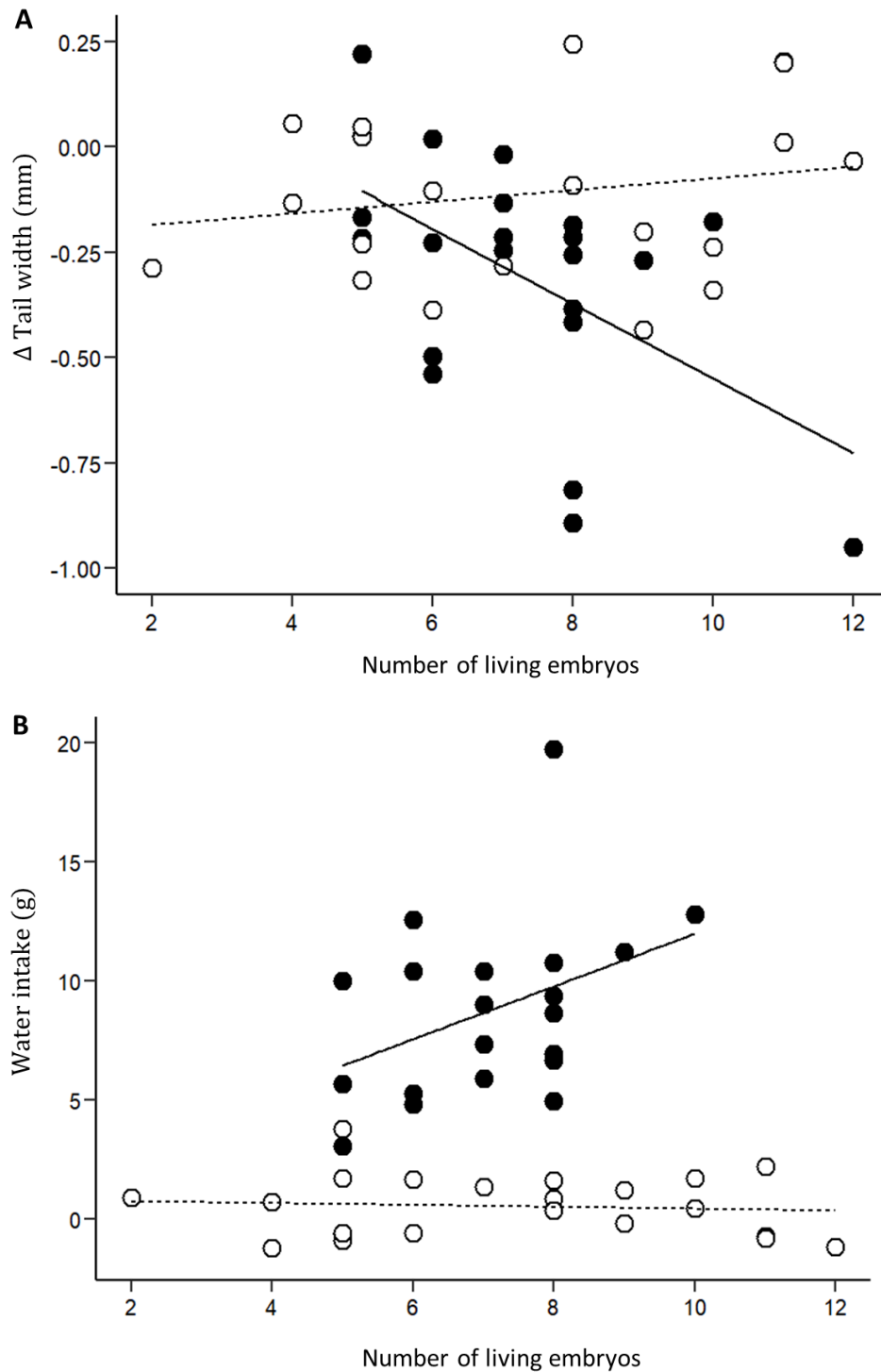


Figure 2. Influence of reproductive effort on (A) changes in tail width (mm) during the experiment and on (B) water intake (g) following access to drinking water at the end of the experiment. Open circles are females from control group and filled circles are females from water-deprived group. Trend lines are included for significant relationships. One female (reproductive effort = 12 living embryos) was removed from the water intake analysis (B) because she had to be rehydrated manually.

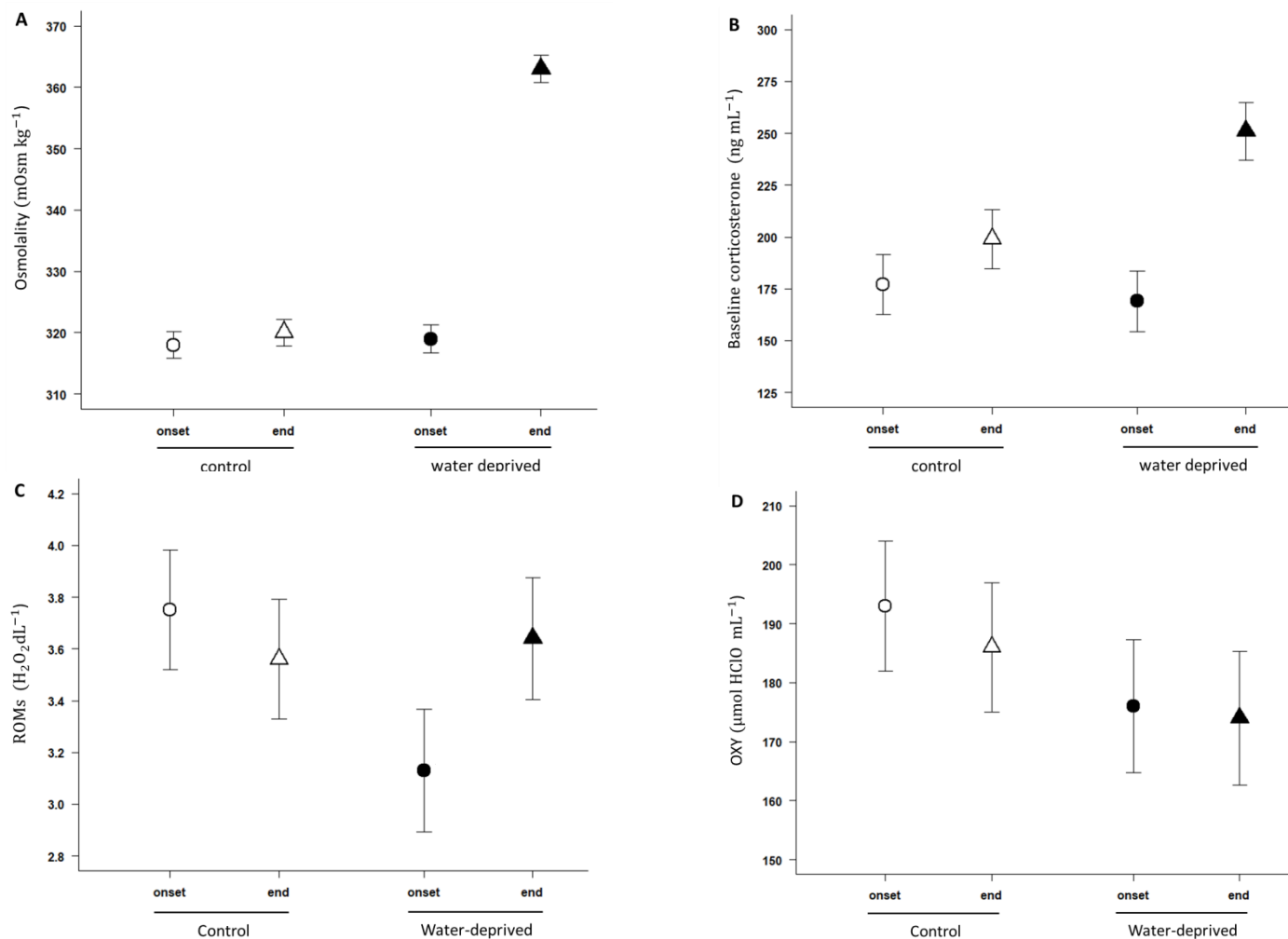


Figure 3. Effect of water deprivation on (A) plasma osmolality (mOsm kg^{-1}), (B) corticosterone plasma concentrations (ng mL^{-1}) and plasma (C) reactive oxygen metabolites (ROMs, $\text{mg H}_2\text{O}_2 \text{dL}^{-1}$) and (D) total antioxidant capacity (OXY, HClO mL^{-1}). Open dots represent means (\pm SE) for control females, and filled dots represent means (\pm SE) for water-deprived females. Circles represent values at the onset of the experimental period and triangles represent values at the end. (A) Plasma osmolality, (B) corticosterone plasma concentrations and (C) reactive oxygen metabolites increased in the water-deprived group whereas it did not change in the control group. (D) Total antioxidant capacity was not influenced by hydric treatment.

Effects on water transfer to the embryos and embryonic survival

Embryonic unit volume was not influenced by hydric treatment ($F_{1,40} = 0.0, P = 0.86$) nor by the interaction between hydric treatment or number of days since ovulation ($F_{1,198} = 0.9, P = 0.34$) and by reproductive effort ($F_{1,40} = 1.3, P = 0.25$). However, embryonic unit volume was affected by embryonic unit position ($F_{1,198} = 9.9, P = 0.002$) and number of days since ovulation ($F_{1,198} = 67.8, P < 0.001$). Volume increased with the number of days since ovulation, and embryonic units in a posterior position had greater volumes than embryonic units in an anterior position. The embryonic stage was also not affected by hydric treatment ($F_{1,41} = 2.6, P = 0.11$) or its interaction with the number days since ovulation ($F_{1,193} = 3.1, P = 0.07$), but it naturally increased with the number of days since ovulation ($F_{1,193} = 319.2, P < 0.001$).

We found a significant main effect of hydric treatment on embryonic mortality throughout the experimental period ($X^2 = 4.6, P = 0.03$). On average, water-deprived females lost 33.9% ($\pm 6.2\%$) of their embryos, while control individuals lost 15.9% ($\pm 6.1\%$) of their embryos. The best model explaining variation in embryonic mortality included Δ CORT as a fixed factor (see supplementary information): a stronger increase in baseline CORT throughout the experiment was related to a higher embryonic mortality ($X^2 = 6.9, P = 0.008$). When building a model with both hydric treatment and Δ CORT as fixed factors, the main treatment effect was no longer significant whereas the effect of Δ CORT remained significant (Treatment: $X^2 = 0.8, P = 0.36$, Δ CORT: $X^2 = 5.1, P = 0.02$).

Discussion

Investigating how water shortage influences reproduction is crucial to predict how natural populations of terrestrial animals may respond to the increasing frequency and severity of droughts independently from changes in the habitat and in trophic interactions (Cruz-McDonnell & Wolf, 2016; Martin & Mouton, 2020). Our study shows that short-term water deprivation during pregnancy compromises maternal physiology (increased dehydration and glucocorticoids levels) and directly impairs reproductive performance (increased embryonic mortality) in a cold-adapted, viviparous ectotherm. In the water restricted group, females with more developing embryos faced a more pronounced dehydration and showed evidence of a more pronounced loss of muscle mass, providing strong evidence of increased water demands due to embryos during pregnancy. We hypothesize that the combined cost of water

deprivation on female reproductive performance, as shown here, and possibly also on female survival, could lead to severe population declines in this species.

Water deprivation increases the physiological costs of reproduction

The sharp increase in plasma osmolality during the two weeks experiment from normosmotic values (320 mOsm.kg⁻¹) to hyperosmotic values in water-deprived females (360 mOsm.kg⁻¹) and the fact that water-deprived females immediately drank when re-exposed to water, strongly suggest that female adders were significantly dehydrated (Dupoué et al., 2015a, 2014; Moeller et al., 2013). Such a level of body dehydration can affect individual performance and lead to significant physiological and fitness costs (Lorenzon et al., 1999; Moeller et al., 2013). We found no effect of water deprivation on changes in hematocrit, which is consistent with a previous study in asp vipers (Dupoué et al., 2015a). One potential explanation is that hematocrit remained low despite severe dehydration to sustain the optimal blood fluidity needed for maternal-fetal O₂ transfer during gestation.

In accordance with our initial predictions, water-deprived females exhibited a significant dehydration (increased plasma osmolality), some degree of physiological stress (increased baseline CORT and ROMs) and an increased body mass loss. They also exhibited greater loss of their tail musculature (assessed by a decrease in the tail width) than control females. The increase in baseline CORT in water-deprived females was likely a classical stress response (Brusch et al., 2020a; Dupoué et al., 2016) and might be involved in some downstream changes in energetic pathways, such as the higher protein catabolism and muscle wasting following chronic water restriction (Brusch et al., 2018; Lориoux et al., 2016; Lourdais et al., 2013b). This scenario was further supported by the facts that changes in tail musculature were correlated with the increase in baseline CORT and in plasma osmolality. We also found that water deprivation led to an increase in plasma ROMs without significant changes in plasma antioxidant concentrations. The resulting imbalance between oxidative damage and antioxidant capacity is likely to further augment the physiological costs of reproduction (Metcalf & Monaghan, 2013; Speakman & Garratt, 2014). The increase in ROMs was positively correlated with both post-treatment water intake and the increase in plasma osmolality.

This pattern adds to a growing number of studies showing that dehydration can alter maternal oxidative status. For example, female *Vipera aspis*, a congeneric south-European species, exhibit an oxidative shielding response when they are exposed to a water deprivation using a similar manipulative design (Stier et al., 2017). In sharp contrast, female European adders were not able to protect themselves from oxidative damage, suggesting that mechanisms involved in the regulation of the oxidative balance are potentially more sensitive to water deprivation in this boreal species. Further, the severe BM loss, TW loss and physiological stress that we observed in water-deprived females is likely to indicate an altered individual condition and quality, which may reduce their future survival (Lorioux et al., 2016; Lourdais et al., 2013b). The loss of body condition and energetic reserves is also expected to alter future reproduction and can represent a substantial cost of reproduction for this capital breeder (Bauwens and Claus, 2019a; Winne et al., 2006). Taken together, our results suggest that chronic water deprivation during early pregnancy may lead to severe physiological costs that are likely to negatively impact female survival and future reproduction. However, water-deprived snakes in natural conditions may behaviorally hydroregulate by selecting micro-habitats with a higher humidity, which could possibly buffer the detrimental effects of droughts (Guillon et al., 2014; Pintor et al., 2016; Rozen-Rechels et al., 2020). These behavioral responses will depend on the availability of humid micro-habitats, which can be reduced by human activity and climate change (Gorissen et al., 2017). Further conservation studies are required to investigate how European adders may compensate for drought-induced effects through hydroregulation and how habitats may act as a buffer against ecological consequences of climate change.

Water deprivation alters reproductive performance

Previous studies in snakes ascribed the impact of drought on reproduction to indirect effects on food resources rather than to direct effects of water shortage *per se* (Rose & Todd, 2017; Smith et al., 2019; Sperry & Weatherhead, 2008). Instead, our study demonstrates that water deprivation early in gestation can directly cause higher embryonic mortality. Similar conclusions were reached in recent studies where droughts led to reproductive failure in a rattlesnake and a lizard species (Capehart et al., 2016; Zani & Stein, 2018). These studies hypothesized that water shortage decreased clutch sizes via resorption of follicles and increased abortion. Water is an important “resource” to support embryonic development, notably for somatic growth, since water is critically needed to convert yolk reserves into

embryonic tissues (Brace & Cheung, 2014; Lourdais et al., 2015; Thompson & Speake, 2002). It is likely that water-deprived females in our study thus failed to meet the minimum water requirements of their developing embryos. In addition, our results suggest that a potential causal link between Δ CORT and embryonic mortality was underlying the main treatment effect. We note that embryonic water requirements are likely to be higher during late gestation since water demands of embryos increase exponentially following the pattern of somatic growth (Lourdais et al., 2017, 2015). Therefore, we predict even stronger effects on reproductive failures when female adders face a severe drought during late gestation.

Water-based fecundity tradeoff and parent-offspring conflict for water

Female fecundity was a significant predictor for two response traits. First, the water uptake during the re-hydration phase was positively correlated with the number of developing embryos, suggesting that thirst was proportional to reproductive effort. Second, the loss of muscles of water-deprived females was positively correlated with the number of embryos, suggesting that muscle catabolism during water deprivation was also proportional to reproductive effort. This suggests greater responses to water restriction in more fecund females, which is consistent with previous findings of water-based reproductive trade-offs in vipers (Dupoué et al., 2015a; Lourdais et al., 2015). Water availability therefore generates significant constraint on reproductive effort and optimal fecundity, similar to energy constraints caused by food restriction. Further, limited water availability should increase the conflict between maintenance of maternal water balance (linked with female survival and future reproduction) and allocation of water to developing embryos (linked with current reproductive event and offspring fitness) during reproduction in vipers (Dupoué et al., 2015a). Herein, we found that water-deprived females maintained water transfer to their developing embryos at a similar rate to that of control females because embryonic unit volume was not influenced by water restriction. One possibility is that water-deprived females were able to maintain water transfer into eggs and support the development of the surviving embryos because they stopped investing in embryos that died. In addition, we found a correlation between tail width loss and the number of developing embryos, thus suggesting that muscle catabolism is a compensatory physiological response to support the water demand of the surviving embryos (Brusch et al., 2018).

The capital breeder concept usually focuses on energetic resources, but can also be applied in terms of water resources, as female muscular reserves may provide an internal water resource to be invested into reproduction (Brusch et al., 2018). It is therefore possible that selective pressures favor an increased muscle mass to support both energy and water demand for future reproduction. Our results suggest that despite embryonic mortality, females compromised their water balance and, therefore, their physiological health to support the demands of their surviving embryos (Brusch et al., 2018; Dupoué et al., 2015a). Water deprivation could further influence the development of surviving embryos and ultimately impact the offspring phenotypes at birth and later in life (Brusch et al., 2019; Dupoué et al., 2016). In two viviparous squamate (*Vipera aspis* and *Zootoca vivipara*), Dupoué et al., 2019 demonstrated that water deprivation can trigger some sex reversal mechanisms during the early embryonic development without affecting embryonic survival. Herein, we cannot elucidate if water-deprivation led to similar changes in the sex ratio of the litter or other characteristics of the offspring at birth. Further studies investigating transgenerational effects of water-deprivation during gestation and parent-offspring conflicts for water would strengthen our understanding of how drought can impact reproduction and offspring phenotypes. Water-deprived females did not lower their body temperature in order to reduce evaporative water loss rates and mitigate some of the consequences of water deprivation. On average, body temperatures (31-32°C, Table1) were slightly below the preferred body temperature of female adders during pregnancy when measured independently from water availability (33-34°C in adult females, Herczeg et al., 2007; Lourdais et al., 2013a). Body temperatures were similar on average in control and water-deprived females, which suggests that body temperature were tightly regulated to meet the thermal requirements of embryos during early pregnancy independently from water availability (Lorioux et al., 2013b). In addition, maintaining elevated body temperatures despite water restriction can also prevent an extension of the pregnancy duration and likely induce greater physiological costs of reproduction for females.

Implications for the conservation of European adders

Our laboratory manipulation indicates that the reproduction of the European adder, a boreal viper, is highly sensitive to water deprivation and, therefore, that droughts may lead to population declines in this species. In particular, droughts are likely to cause reduced recruitment (Capehart et al., 2016; Zani & Stein, 2018) and may further induce long-lasting demographic effects on adult survival and future reproduction because of the physiological

costs of water deprivation for pregnant females (Cruz-McDonnell & Wolf, 2016; Zani & Stein, 2018). Recruitment may not immediately rebound during years following droughts, especially since water deprivation can deplete muscular reserves in this capital breeder, and a higher post-breeding mortality may follow chronic summer droughts during gestation (Bauwens & Claus, 2019a). The effects of droughts on reproduction are likely to be stage-dependent, where water-deprivation in early stages (vitellogenesis) may lead to reduced investment into reproduction (i.e. resorptions of follicles; Capehart et al., 2016; Zani and Stein, 2018) while in later stages (pregnancy) it may lead to greater physiological costs for the females (Lourdais et al., 2017, 2015) and to embryonic mortality. These ecological consequences are likely to be even stronger if the demographic costs of water shortage are higher for larger females with more embryos. Independently of changes in food availability or their habitat, European adder populations are therefore likely to experience drought-induced declines.

Physiological and reproductive consequences of our laboratory-based short water-deprivation are possibly exacerbated by captivity and handling stress. At the same time, we simulated a short period of water deprivation whereas it is predicted that droughts can be more intense in the wild spanning periods ranging from days to months (Cook et al., 2014; Trenberth et al., 2014a). Intense and long droughts in natural populations are likely to have greater impacts on female physiology and reproduction than in our laboratory study. By the end of 21st century, both western Europe and northern Scandinavia are predicted to face an outstanding increase in drought frequency and severity, notably from spring to late summer when adders reproduce (Spinoni et al., 2018). The species may therefore face population declines not only in the southern margins of its European distribution where the climate is warming rapidly, but also within its northern distribution in Scandinavia and Western Europe where droughts will become more frequent. This is likely to challenge the capacity of the species to track the predicted northward shift of its range distribution in warmer climates (Hickling et al., 2005). In order to anticipate such population declines, our results suggest that corticosterone and plasma osmolality assays might offer reliable biological indicators of the hydric status of vipers and could therefore be useful to assess population vulnerability. In addition, management measures that focus on the conservation of wetlands and humid microhabitats may help mitigate the effects of droughts on European adder populations.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche under the ‘Aquatherm’ project (ANR-17-CE02-0013 to J.-F.L.G. and O.L.), Region Nouvelle-Aquitaine under the ‘Aquastress’ project (2018-1R20214 to O.L.) and the departmental council of Gironde under the ‘Climate Sentinels’ project (coordinators: Cistude Nature, Fanny Mallard). M. D. is supported by a doctoral grant from ED 227 Sorbonne University.

Authors’ contributions

M.D., O.L. and J.-F.L.G. conceived the ideas and designed methodology. M.D., O.L, G.G. and M.G. captured snakes, contributed to experimental procedures and collected the data. F.A., S.M., M.L.-C. and F.B. led the laboratory analysis on blood samples and contributed in result interpretation. M.D. led the data analyses together with O.L. and J.-F.L.G. M.D. led the writing of the manuscript and all authors contributed critically in result interpretation and manuscript writing. All authors gave final approval for publication.

Acknowledgement

The authors thank Donatien François for help with snake captures, Annelise Roustaing and Romane Schaeffer who contributed to data acquisition and care of vipers, Charline Parenteau and Emmanuelle Seghrouchni for their help with the corticosterone assay, and Robin Viton and Elsa Daniaud for logistic support. The authors thank Sydney Hope for helpful comments on the English of the manuscript.

Supplementary information

Table S1. Best statistical models describing effects of water deprivation treatment on maternal body mass and tail width. Individual identity was treated as a random factor and variance components were calculated for inter-individual (σ_{ind}^2) and intra-individual variation (σ_{resid}^2).

Variable	Factor	df	F	P	Variance components	
					σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Body mass	Initial body mass	1,39	3926.98	<0.001	1.71	0.85
	Treatment	1,39	9.83	0.003		
	Time	3,123	226.82	<0.001		
	Fecundity	1,39	4.37	0.04		
	Treatment × Time	3,123	87.43	<0.001		
Tail width	Treatment	1,39	0.09	0.76	0.31	0.16
	Time	1,39	2.36	0.13		
	Fecundity	1,39	4.43	0.04		
	Treatment × Time	1,39	4.40	0.04		
	Treatment × Fecundity	1,39	0.49	0.48		
	Time × Fecundity	1,39	0.44	0.44		
	Treatment × Time × Fecundity	1,39	8.77	0.005		

Table S2. Best statistical model describing effects of water deprivation treatment on post-treatment water intake.

Variable	Factor	df	F	P
Post-treatment water intake	Initial body mass	1	6.16	0.01
	Treatment	1	0.06	0.80
	Fecundity	1	2.73	0.11
	Treatment × Fecundity	1	5.39	0.02

Table S3. Best statistical models describing effects of water deprivation treatment on maternal physiology. Individual identity was treated as a random factor and variance components were calculated for inter-individual (σ_{ind}^2) and intra-individual variation (σ_{resid}^2).

Variables	Factor	df	F	P	Variance components	
					σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Osmolality	Treatment	1,39	8.09	0.007	6.47	8.09
	Time	1,41	1.13	0.29		
	Fecundity	1,39	1.52	0.22		
	Treatment × Time	1,41	145.57	<0.001		
	Treatment × Fecundity	1,39	9.55	0.004		
Hematocrit	Treatment	1,40	0.002	0.96	3.08	2.29
	Time	1,41	1.02	0.32		
	Fecundity	1,40	0.47	0.49		
	Treatment × Time	1,41	1.33	0.25		
Log(CORT)	Treatment	1,39	0.78	0.38	0.15	0.30
	Time	1,32	1.07	0.31		
	Fecundity	1,39	1.58	0.21		
	Blood sample duration	1,32	4.41	0.04		
	Blood sample T_b	1,32	8.33	0.007		
	Treatment × Time	1,32	5.26	0.03		
ROMs	Treatment	1,40	3.55	0.06	0.89	0.61
	Time	1,41	1.15	0.29		
	Fecundity	1,40	2.11	0.15		
	Treatment × Time	1,41	7.03	0.01		
OXY	Treatment	1,40	1.19	0.28	26.52	44.26
	Time	1,41	0.28	0.60		
	Fecundity	1,40	0.34	0.56		
	Treatment × Time	1,41	0.08	0.78		
T_b	Treatment	1,36	2.86	0.09	1.10	1.98
	Time	1,255	1.65	0.20		
	Fecundity	1,255	6.05	0.01		
	Treatment × Time	1,255	0.97	0.32		

List of acronyms: CORT = baseline plasma corticosterone concentration; ROMs = concentration of reactive oxidative metabolites; OXY = antioxidant capacity; T_b = body temperature

Table S4. Statistical models used to examine the effects of water deprivation treatment on embryonic development. Individual identity was treated as a random factor and variance components were calculated for inter-individual (σ_{ind}^2) and intra-individual variation (σ_{resid}^2).

Variables	Factor	df	F	P	Variance components	
					σ_{ind}^2	σ_{resid}^2
Embryonic stage	Treatment	1,41	2.58	0.11	3.03	4.80
	Time since ovulation	1,193	319.25	<0.001		
	Treatment \times Time since ovulation	1,193	3.15	0.07		
Embryonic unit volume	Treatment	1,40	0.03	0.87	0.80	1.14
	Time since ovulation	1,198	67.85	<0.001		
	Fecundity	1,40	1.35	0.25		
	Embryonic unit position	1,198	9.88	0.002		
	Treatment \times Time since ovulation	1,198	0.91	0.34		

Table S5. Statistical models used to investigate the correlation between intra-change in different variables during the treatment period

Variables	Factor	df	F	P	R²
Post-treatment water intake	Intercept	1	0.16	0.69	
	Δ osmolality	1	181.71	< 0.001	0.82
Post-treatment water intake	Intercept	1	14.80	< 0.001	
	Δ CORT	1	1.19	0.28	0.03
Post-treatment water intake	Intercept	1	33.47	< 0.001	
	Δ ROMs	1	7.83	0.007	0.16
Δ CORT	Intercept	1	2.43	0.13	
	Δ osmolality	1	1.75	0.19	0.11
Δ ROMs	Intercept	1	0.60	0.44	
	Δ osmolality	1	4.88	0.03	0.11
Δ Tail width	Intercept	1	11.86	0.001	
	Δ CORT	1	6.96	0.01	0.17
Δ Tail width	Intercept	1	3.25	0.07	
	Δ osmolality	1	11.56	0.001	0.22
Δ Tail width	Intercept	1	24.78	< 0.001	
	Δ ROMs	1	1.56	0.22	0.04

List of acronyms: CORT = baseline plasma corticosterone concentration; ROMs = concentration of reactive oxidative metabolites

Table S6. Statistical models used to investigate if intra-individual changes in physiological variables or fecundity influenced embryonic mortality.

Model number	Factor	df	X ²	P
1	Treatment	1	4.63	0.03
2	Δ CORT	1	6.93	0.008
3	Treatment	1	0.84	0.36
	Δ CORT	1	5.14	0.02
4	Fecundity	1	0.002	0.96
5	Δ osmolality	1	0.13	0.72
6	Δ Hematocrit	1	0.10	0.74
7	Δ ROMs	1	2.25	0.13
8	Δ OXY	1	0.002	0.96

List of acronyms: CORT = baseline plasma corticosterone concentration; ROMs = concentration of reactive oxidative metabolites; OXY = antioxidant capacity

Table S7. QAICc-based model selection comparing the influence of fecundity and intra-individual changes in physiological variables on embryonic mortality.

Model	k	QAICc	Δ QAICc	wi	Q LogLik
Δ CORT	3	52.48	0.00	0.98	- 22.85
Δ ROMs	3	61.93	9.45	0.01	- 27.64
Δ Osmolality	3	63.92	11.44	0.00	- 28.64
Δ Hematocrit	3	63.65	11.46	0.00	- 28.65
Fecundity	3	64.05	11.57	0.00	- 28.70
Δ OXY	3	64.05	11.57	0.00	- 28.70

List of acronyms: CORT = baseline plasma corticosterone concentration; ROMs = concentration of reactive oxidative metabolites; OXY = antioxidant capacity

Figure S1: Ultrasound imaging at the beginning of the treatment period (developmental stage 20-21) of (A) a viable embryonic unit with a typical ovoid shape; (B) a clearly visible embryo (black circular shape within the embryonic unit); (C) unviable embryonic units with circular shape and no visible embryo; and (D) at the end of the treatment period (developmental stage 36-37) of a living embryo with a typical spiral body shape.

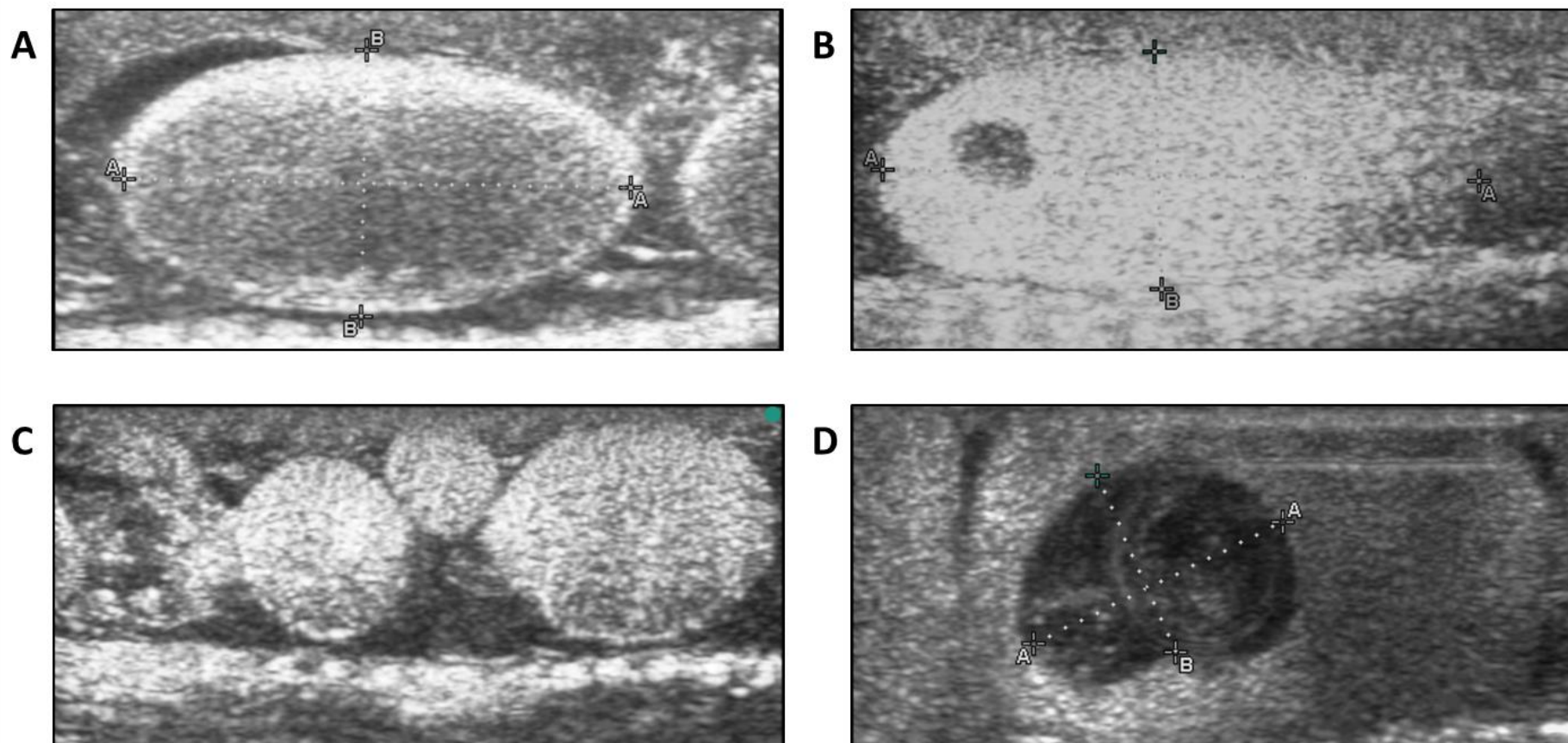


Figure S2: Correlation between (A) water intake (g) and intra-individual change in plasma osmolality (mOsm kg^{-1}), and (B) between water intake (g) and intra-individual change in reactive oxygen metabolites (ROMs, $\text{mg H}_2\text{O}_2 \text{dL}^{-1}$)

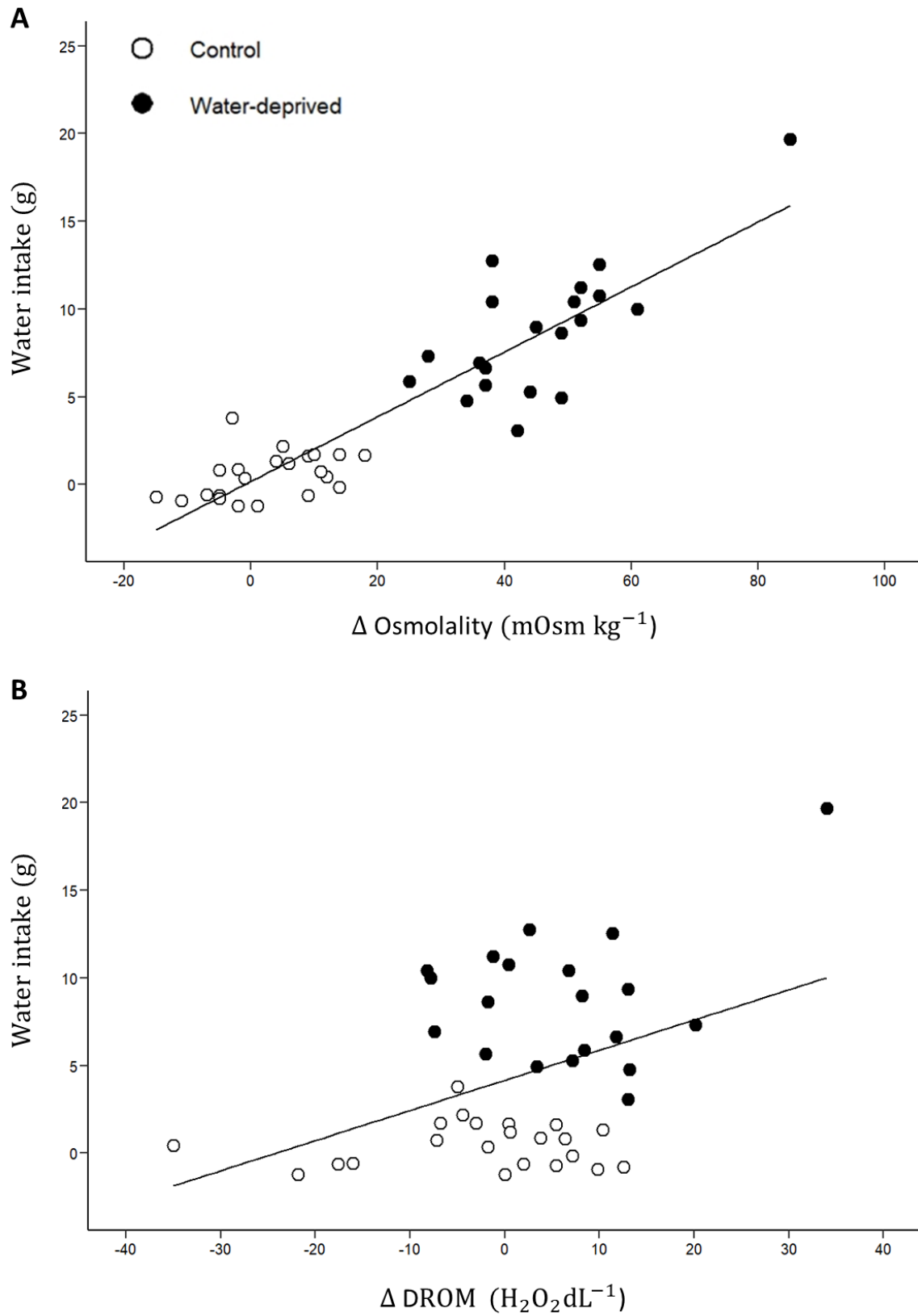


Figure S3: Correlation between intra-individual changes in reactive oxygen metabolites (ROMs, $\text{mg H}_2\text{O}_2 \text{ dL}^{-1}$) and in plasma osmolality (mOsm kg^{-1})

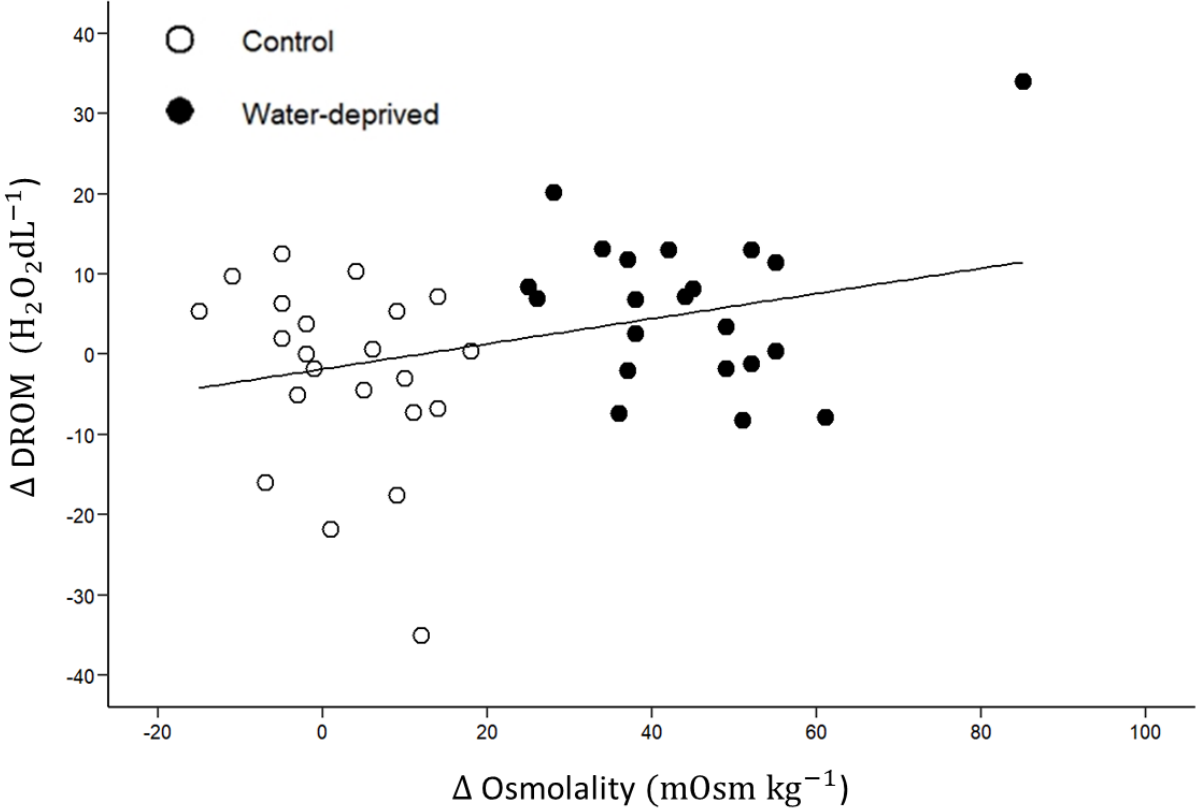
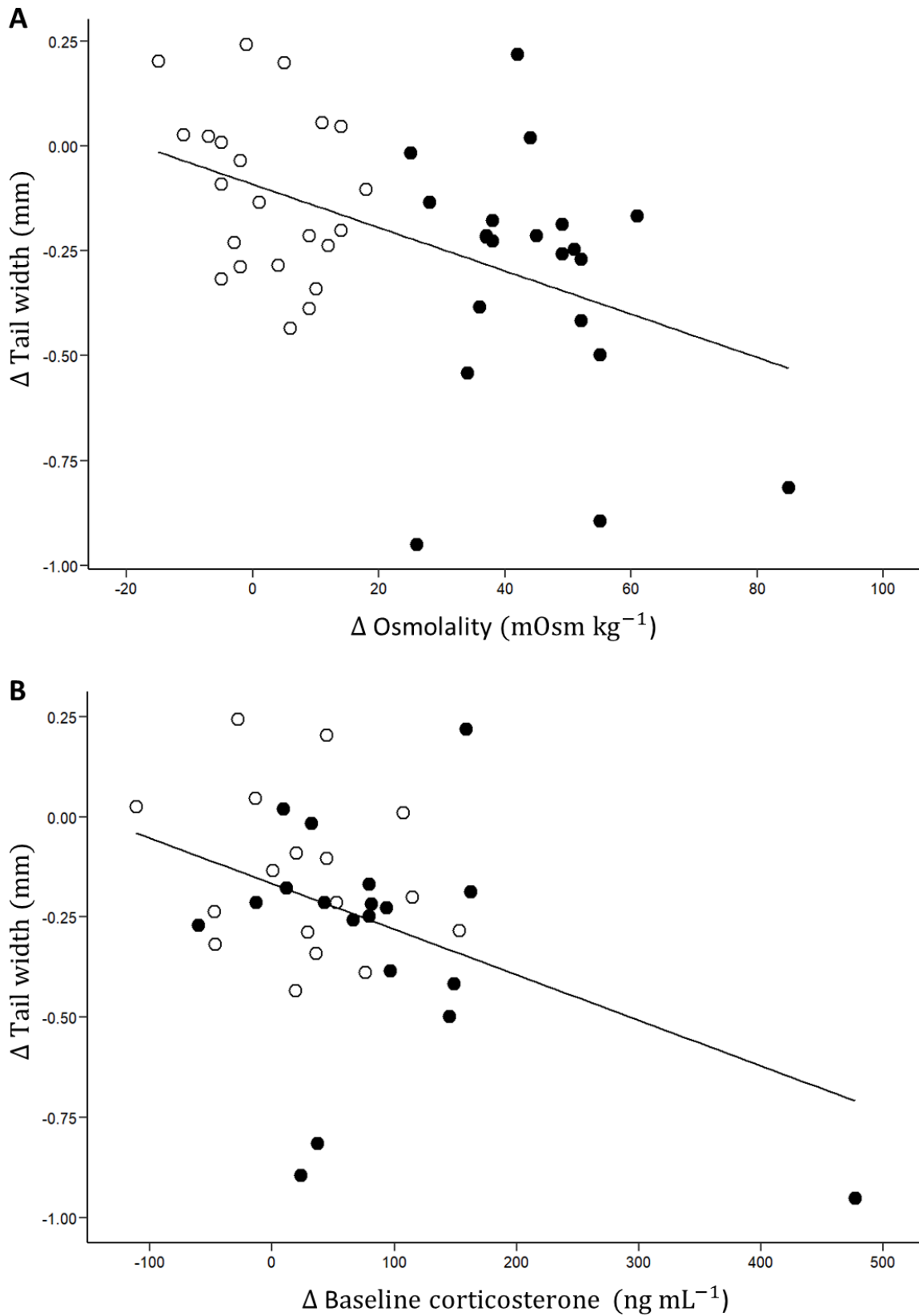


Figure S4: Correlation between (A) intra-individual changes in tail width (mm) and in plasma osmolality (mOsm kg^{-1}) and (B) between intra-individual changes in tail width (mm) and in corticosterone plasma concentrations (ng mL^{-1})



III.3 Expérimentation 5 - Effets des contraintes hydriques prénatales et postnatales sur la morphologie et la croissance de nouveau-nés *Vipera berus*

Cette section présente des résultats préliminaires en français. Les analyses statistiques sont en cours de finalisation. Le choix de présentation est donc de se focaliser sur une présentation graphique des explorations de données plutôt que sur les tests statistiques complets et finalisés. Cette expérience a été réalisée dans le contexte de la crise sanitaire en 2020 (voir préambule du manuscrit).

Contexte

Les travaux précédents de ce chapitre ([Article 4](#)) ont démontré des effets négatifs d'une courte période de privation d'eau en début de gestation sur le maintien de l'homéostasie chez la femelle gestante et sur son succès reproducteur. En fin de gestation, les besoins hydriques des embryons augmentent en lien avec la croissance somatique des embryons et une augmentation des pertes hydriques cutanées et respiratoires des mères (Lourdais et al., 2017, 2015). Je fais donc l'hypothèse d'effets prononcés des contraintes hydriques tard dans la gestation sur le phénotype à la naissance et sur la croissance post-natale des nouveau-nés. Les premières semaines de vie des vipéreaux sont déterminantes pour leur valeur sélective dans les régions tempérées. Les jeunes serpents ne se nourrissent pas avant l'hiver mais mobilisent les réserves acquises au cours du développement embryonnaire pour initier leur croissance en taille corporelle et cette croissance initiale, notamment celle des mâchoires est déterminante pour leurs performances individuelles futures (Dupoué et al., 2016; Forsman, 1994; Lorioux et al., 2013b). Je fais l'hypothèse que des contraintes hydriques au cours de cette phase de croissance postnatale devraient conduire à des effets négatifs sur les nouveau-nés en altérant leur croissance postnatale. Je teste les prédictions suivantes : (1) les femelles privées d'eau devraient avoir un succès reproducteur réduit et des vipéreaux de plus petite taille (taille corporelle et mâchoire), et à la croissance post-natale réduite et (2) les contraintes hydriques post-natales devraient limiter la capacité des vipéreaux à mobiliser leurs réserves pour la croissance et donc conduire à une croissance post-natale moindre (taille corporelle et mâchoire).

Matériel et méthodes

Design expérimental

Nous avons exposé des vipères péliades en fin de gestation à une courte période (12 jours) de privation de l'accès à l'eau de boisson (eau *ad-libitum* n = 9 vs. privation d'eau n = 10) en fin de gestation, et nous avons manipulé les conditions hydriques post-natales de leur nouveau-nés durant leurs deux premières semaines de croissance en enceintes climatiques (eau *ad-libitum* & air humide n = 47 vs. privation d'eau & air sec n = 45 ; cycle thermique caniculaire imposé pour tous les individus ; **Figure 36**).

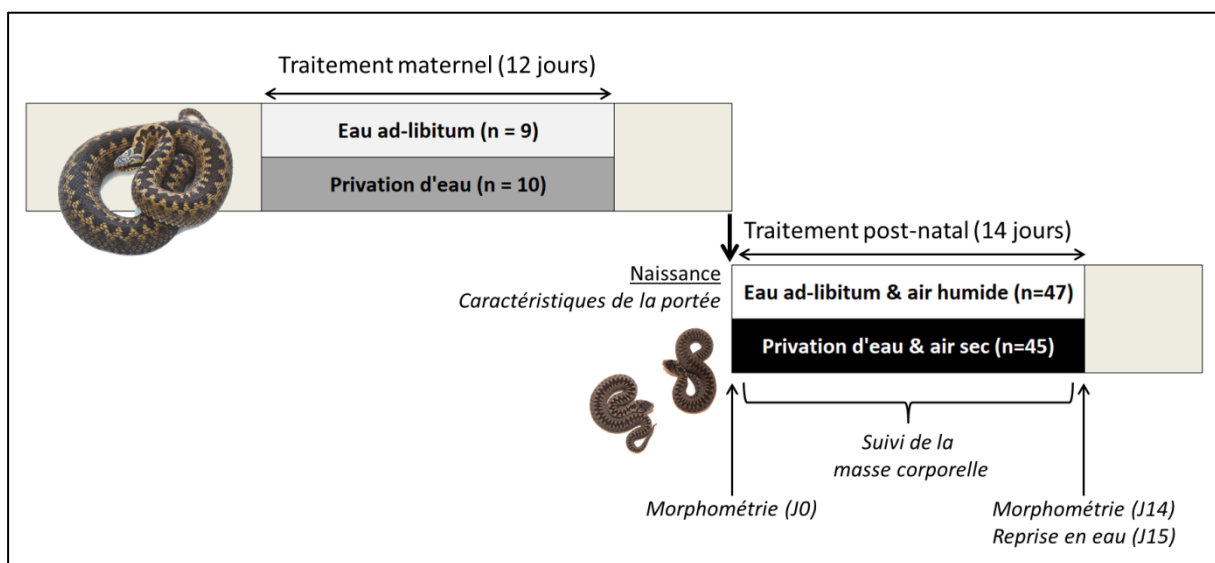


Figure 36 : Design expérimental de l'**Expérimentation 5**.

Traitement maternel

Nous avons capturé 19 vipères gestantes en Bretagne au cours des mois de mai et juin 2020. Les conditions de maintenance pré-expérimentale (semi-captivité en enclos extérieur) et au cours du traitement expérimental (meubles expérimentaux avec accès à un gradient thermique) ont été similaires à celles présentées dans l'**Article 4**. Le statut reproducteur et le nombre d'embryons de chaque femelle a été vérifié par échographie. Le stade de développement a également été estimé à partir des dimensions et des caractéristiques morphologiques des embryons afin d'imposer le traitement en fin de gestation (stades 41-42) pour toutes les femelles gestantes. Le traitement a duré pendant 12 jours consécutifs avec soit de l'eau de boisson *ad-libitum* (n = 9) soit une privation de l'accès à l'eau de boisson (n = 10).

Traitement post-natal

Le lendemain de leur naissance, les vipéreaux ont été exposés pendant 14 jours à une manipulation des conditions post-natales avec soit eau *ad-libitum* et air humide (n = 47) soit privation d'eau et air sec (n = 45). Les vipéreaux ont été maintenus individuellement dans des cages en plastiques au sein des enceintes climatiques. Un cycle thermique caniculaire a été imposé et deux régimes d'hygrométrie ont été simulés avec soit un air humide soit un air sec (voir **Table 1**).

Table 1 : Conditions thermiques et hydriques imposées au sein des traitements post-natals.

	Traitement post-natal	
	Eau ad-libitum et air humide	Privation d'eau et air sec
Accès à l'eau de boisson	<i>ad-libitum</i>	privation de l'accès à l'eau
Température moyenne	26.4°C	26.4°C
Humidité relative moyenne	75 %	50 %
Déficit de pression de vapeur d'eau moyen	0.9 kPa	1.7 kPa
Durée du jour	8 h	8 h
Température diurne	30°C	30°C
Déficit de pression de vapeur d'eau diurne	1.1 kPa	2.1 kPa
Durée de la nuit	13 h	13 h
Température nocturne	24°C	24°C
Déficit de pression de vapeur d'eau nocturne	0.7 kPa	1.5 kPa
Durée transition jour/nuit	3 h	3 h

Variables mesurées

Nous avons identifié les caractéristiques de chaque portée à la naissance (nombre de vipéreaux, sexe ratio, état des nouveau-nés : vivant, mort-né ou avorté (i.e. mortalité au cours du développement)). A la naissance, nous avons mesuré les nouveau-nés arrivés à terme de leur développement (vivants et mort-nés) au niveau de leur taille museau cloaque (± 0.1 cm) en triplicats en utilisant une règle graduée mais aussi au niveau de la taille des mâchoires en triplicats à l'aide d'un pied à coulisse électronique (± 0.01 mm). Un indice de condition

corporelle a été calculé pour chaque individu (résidus de la régression linéaire entre log(masse corporelle) et log(taille museau-cloaque)). Les vipéreaux ont été pesés tous les 2 jours au cours de leur exposition au traitement post-natal, puis 24h après la fin du traitement pour quantifier la reprise en eau liée au comportement de boisson. Pour calculer la croissance précoce, les vipéreaux ont été mesurés à la fin du traitement post-natal (Jour 14).

Analyses et résultats préliminaires

Effets du traitement maternel sur la reproduction

Des modèles linéaires simples indiquent que les caractéristiques des portées (nombre de nouveau-nés vivants, mort-nés ou avortés ; sexe ratio ; voir **Table 2**) n'ont pas été impactés par le traitement maternel contrairement aux effets détectés sur le succès de reproduction en début de gestation dans l'[Article 4](#).

Table 2 : Caractéristiques des portées à la naissance en fonction du traitement maternel.

Traitement maternel	Caractéristiques des portées (moyenne ± SE)				
	Nouveau-nés vivants	Nouveau-nés mort-nés	Nouveau-nés avortés	Proportion de mâles vivants	Proportion de mâles (vivants et mort-nés)
Eau <i>ad-libitum</i>	4.9 ± 0.6	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.42 ± 0.10	0.38 ± 0.08
Privation d'eau	4.8 ± 0.7	0.6 ± 0.4	0.7 ± 0.3	0.57 ± 0.09	0.49 ± 0.07

Une première analyse avec des modèles linéaires mixtes (pour tenir compte des mesures répétées sur la même portée) indiquent que la morphologie des nouveau-nés arrivés à terme de leur développement n'est pas non plus différente en fonction du traitement maternel (**Table 3** ; la taille de la mère et le nombre d'embryons total par portée ont été utilisés comme covariables dans les analyses).

Table 3 : Morphologie des nouveau-nés à la naissance en fonction du traitement maternel.

Traitement maternel	Morphométrie des nouveau-nés à la naissance (moyenne \pm SE)			
	Masse corporelle (g)	Taille museau-cloaque (cm)	Taille de la mâchoire (mm)	Indice de condition corporelle
Eau <i>ad-libitum</i>	4.5 \pm 0.2	14.8 \pm 0.3	12.9 \pm 0.1	0.02 \pm 0.03
Privation d'eau	4.2 \pm 0.2	14.6 \pm 0.2	12.8 \pm 0.1	-0.02 \pm 0.03

Effets des traitements maternels et postnatals sur la croissance des nouveau-nés

L'évolution des pertes de masse des vipéreaux au cours du temps indique que les vipéreaux exposés aux contraintes hydriques (privation d'eau et air sec) ont été déshydratés (pertes de masse supérieures au groupe contrôle) au cours des 2 semaines traitement post-natal (J0 à J14), puis qu'après la fin du traitement ils ont atteint leur masse corporelle initiale via un comportement de boisson plus marqué (**Figure 37**). La masse perdue par les vipéreaux dans le traitement contraint équivaut à environ 25% de la masse initiale et est donc très significative.

Une première analyse préliminaire de la croissance de la taille corporelle museau-cloaque et de la taille des mâchoires a été réalisée en utilisant des modèles linéaires mixtes. La croissance en mm par jour (taille corporelle ou mâchoire) a été utilisée en variable dépendante, et le sexe, le traitement pré-natal et le traitement post-natal ainsi que leurs interactions triples ont été utilisés en facteurs fixes. La taille de la mère et le nombre d'embryons ont été utilisés en covariables. L'indice de condition corporelle a été utilisé en covariable pour l'analyse de la croissance de la taille museau-cloaque, et la taille des mâchoires à la naissance pour l'analyse de la croissance des mâchoires. Une sélection de modèles par élimination des interactions et covariables non-significatives a été effectuée à partir des modèles complets.

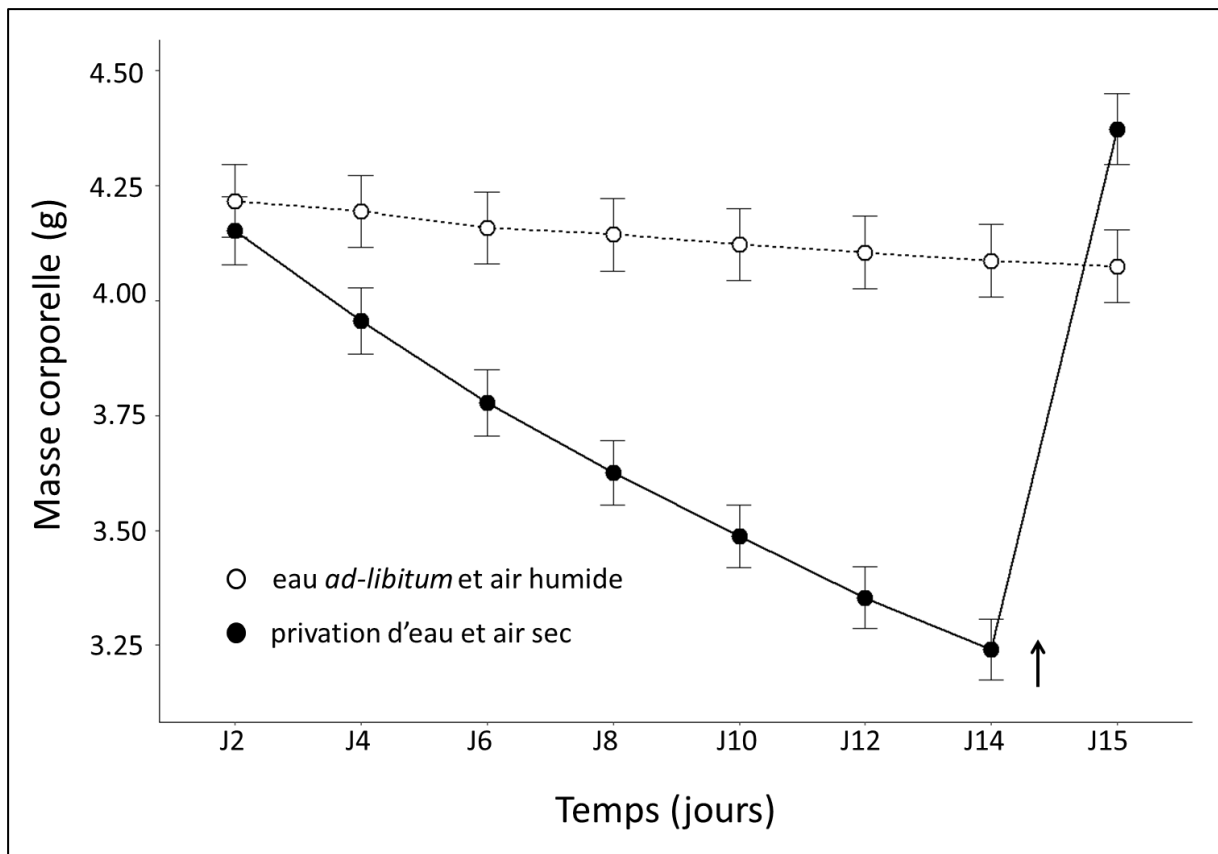


Figure 37 : Masse corporelle (g) des nouveau-nés au cours du temps en fonction du traitement post-natal (cercles blancs = eau ad-libitum et air humide ; cercles noir = privation d'eau et air sec). La flèche correspond à la fin du traitement expérimental et à l'accès à l'eau ad-libitum pour tous les individus.

Ces premières analyses indiquent des effets additifs du traitement maternel et post-natal sur la croissance en taille des vipéreaux avec une croissance supérieure des vipéreaux exposés aux contraintes hydriques pendant leur développement embryonnaire (**Figure 38.A**), mais une croissance très significativement inférieure des vipéreaux exposés aux contraintes hydriques post-natales (**Figure 38.C**). La croissance des mâchoires n'a pas été influencée par le traitement maternel (**Figure 38.B**) mais a été influencée par le traitement post-natal avec une croissance très significativement réduite pour les vipéreaux exposés aux contraintes hydriques (**Figure 38.D**)

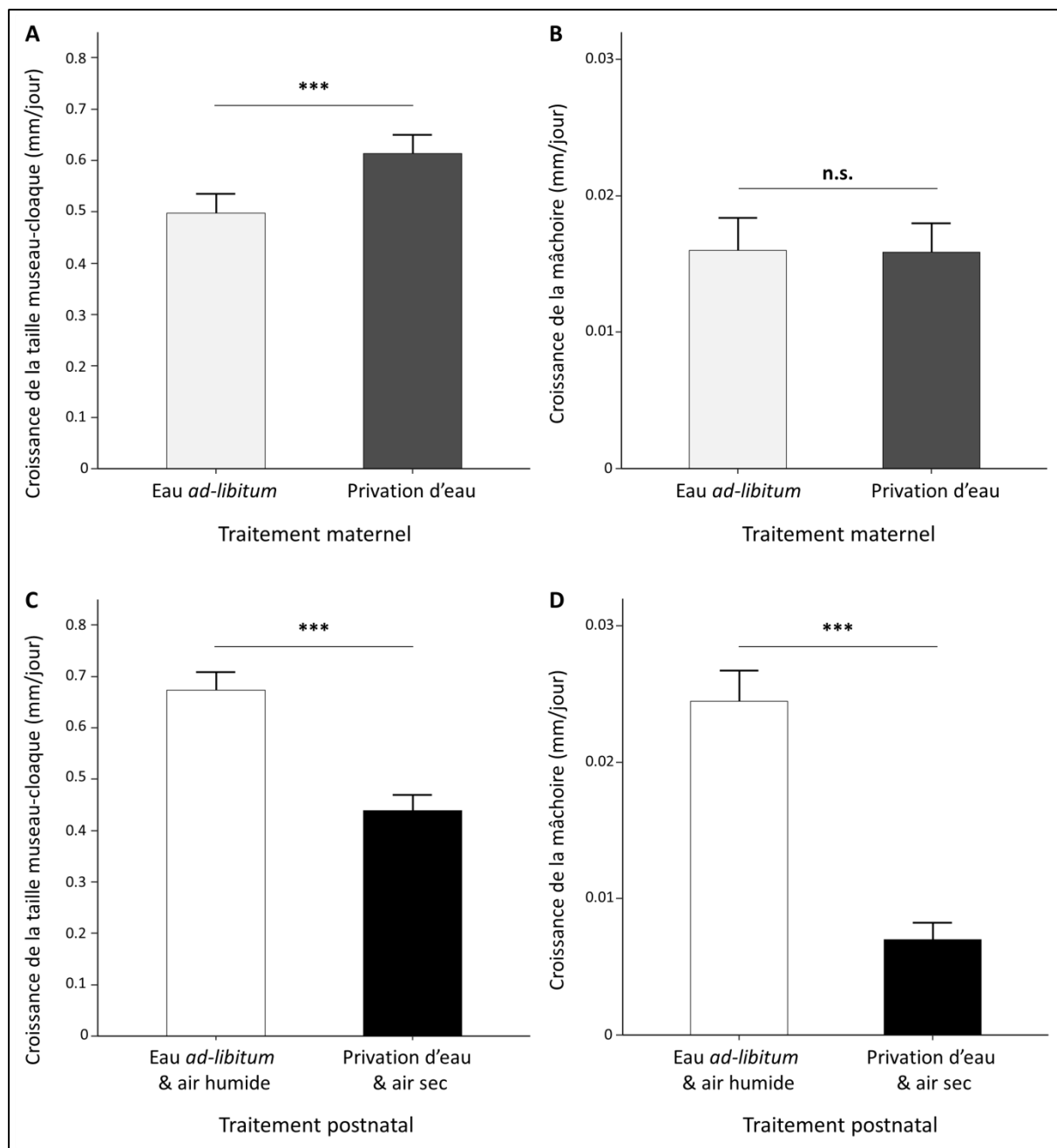


Figure 38 : Effets du traitement maternel et du traitement postnatal sur la croissance de la taille museau-cloaque (mm/jour) et la croissance des mâchoires (mm/jour).

Discussion

Ces résultats suggèrent que contrairement à nos prédictions, les contraintes hydriques en fin de gestation n'ont pas impacté le succès reproducteur ou le phénotype des nouveau-nés à la naissance (sexe ratio ; morphologie) malgré une sévérité de la restriction hydrique semblable en intensité et durée à celle pratiquée en début de gestation ([Article 4](#)). Cependant, les contraintes hydriques en fin de gestation ont induit un effet transgénérationnel avec une croissance supérieure (taille corporelle) des nouveau-nés au cours de leurs deux premières

semaines de vie. En accord avec nos prédictions, les contraintes hydriques au cours des premières semaines de vie ont réduit très fortement la croissance de la taille corporelle et de la taille des mâchoires, mais ces effets n'ont pas interagi avec ceux des conditions maternelles comme on aurait pu s'y attendre si les effets maternels « anticipent » les conditions de croissance des nouveau-nés (Marshall et al., 2007; Uller et al., 2013).

L'effet transgénérationnel observé sur la croissance des nouveau-nés confirme des résultats similaires chez des vipères aspics exposées à une privation d'eau en milieu de gestation (Dupoué et al., 2016). Les effets observés sur la croissance étaient alors corrélés avec la déshydratation (augmentation de l'osmolalité plasmatique) et les taux basaux de corticostérone des femelles privés d'eau suggérant une médiation physiologique maternelle de la hausse de la croissance du nouveau-né après sa naissance. Les quantités de réserve disponibles pour la croissance de l'embryon sont normalement déterminées à la vitellogenèse chez les espèces vivipares lécitotrophes comme les deux vipères de cette thèse (Stewart, 2013; Thompson & Speake, 2002). Les conditions de gestation ne sont donc pas censées influencer l'allocation dans les ressources énergétiques disponibles pour le développement embryonnaire. Il est toutefois possible qu'une croissance supérieure des nouveau-nés après la naissance résulte d'une acquisition et d'une mobilisation supérieure des ressources (maternelles et déjà transférées dans les jeunes) chez les vipéreaux issus de femelles déshydratés et présentant des taux de corticostérone élevés (Dupoué et al., 2016). Les effets parentaux peuvent en effet être induits par les niveaux de glucocorticoïdes maternels, de manière d'autant plus marquée chez les espèces vivipares (MacLeod et al., 2021). Une explication proposée par Dupoué et al. (2016) est que la croissance supérieure serait avantageuse en termes de performances individuelles (la taille influence notamment la locomotion, la dispersion, et les capacités de défenses anti-prédateur) et pourrait partiellement compenser les effets négatifs futurs d'un environnement contraint en terme d'accès à l'eau.

Les nouveau-nés exposés à des contraintes hydriques durant leurs premières semaines de vie présentent une croissance très réduite de leur taille corporelle (-40%) et de la taille de leur mâchoire (-70%) démontrant que la privation d'eau limite considérablement la croissance des jeunes juste après la naissance dans les conditions environnementales les plus desséchantes. Ces effets sur la croissance des nouveau-nés sont susceptibles d'altérer les performances individuelles et notamment les premières prises alimentaires, avec des effets probables sur leurs trajectoires développementales et à terme sur la valeur sélective des nouveau-nés

(Forsman, 1994; Forsman & Lindell, 1993; Lorient et al., 2013b). Une explication possible est que de fortes contraintes hydriques postnatales placent les nouveau-nés dans une situation de survie contraignant fortement la mobilisation des réserves énergétiques acquises durant le développement embryonnaire au profit de la survie et du maintien de l'homéostasie plutôt que vers la croissance.

L'ensemble de ces résultats suggère l'importance de considérer l'effet des contraintes hydriques au cours de la reproduction et en début de vie sur le phénotype des nouveau-nés et leurs trajectoires développementales. L'**Article 4** suggère que les sécheresses plus intenses et plus fréquentes tôt dans l'été pourraient compromettre la démographie des populations en induisant des effets négatifs sur le succès reproducteur et sur la physiologie des femelles les plus fécondes. L'**Expérimentation 5** démontre quant à elle des effets transgénérationnels positifs sur la croissance des nouveau-nés des événements climatiques extrêmes tard dans l'été, mais qui sont largement annulés par des effets fortement négatifs des contraintes hydriques post-natales sur la croissance des vipéreaux, pouvant potentiellement limiter leurs performances et à terme leur survie.

Discussion et perspectives



Femelle *Vipera berus* gestante en nature utilisant un microclimat chaud et humide. Cette photographie illustre le comportement de thermo-hydrorégulation et la sélection de microclimats favorables. © Mathias Dezetter

Synthèse des apports de la thèse

Comprendre et prédire les réponses des populations face à ces changements nécessite (1) de clarifier la sensibilité physiologique des individus face aux stressseurs climatiques, notamment au cours de la reproduction (Bozinovic & Pörtner, 2015; Chown & Gaston, 2016; Pörtner & Farrell, 2008), mais également (2) d'identifier la capacité des individus à ajuster de manière plastique leur physiologie et leur comportement face aux variations environnementales (Basson & Clusella-Trullas, 2015; Enriquez-Urzelai et al., 2020; Gunderson et al., 2016). Alors que la sensibilité thermique des ectothermes a concentré l'attention des études écologiques, les réponses face aux contraintes hydriques demeurent moins étudiées (Herrando-Pérez et al., 2020; Pirtle et al., 2019). L'objectif principal de ma thèse a donc été de clarifier les interactions et les mécanismes reliant les régulations des balances thermique et hydrique, et de documenter les réponses physiologiques et comportementales des individus face à des conditions climatiques plus chaudes et plus sèches.

Les expérimentations menées au cours de ma thèse permettent de tester mes 3 hypothèses principales en renseignant les effets des contraintes thermiques et hydriques sur la physiologie, le comportement et la reproduction (**Figure 39**).

Mes travaux de thèse ont des implications générales importantes pour la compréhension de la thermo-hydrorégulation des ectothermes terrestres et les mécanismes impliqués. Mes données apportent également une contribution significative en écophysiologie de la conservation et en termes de gestion des habitats et micro-habitats.

Je discute ensuite des implications de mes résultats et des perspectives de recherche associées.

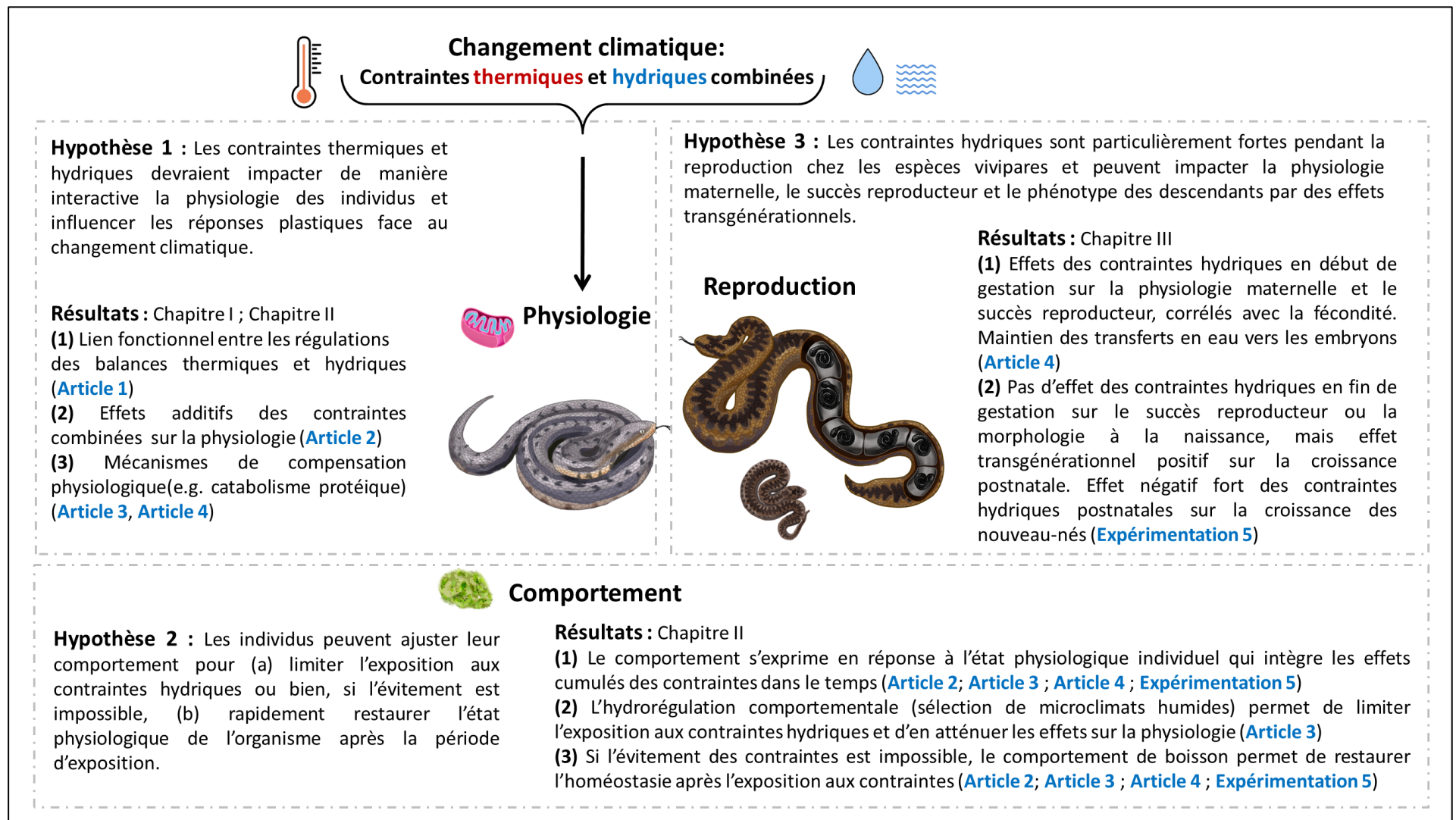


Figure 39 : Synthèse des apports de ma thèse en lien avec mes 3 hypothèses principales.

1. Influence des contraintes abiotiques sur la physiologie :

a) Réponses à long-terme et co-variation entre les traits

Les résultats de l'[Article 1](#) clarifient la compréhension des réponses de plasticité physiologique à long terme face aux variations de température.

Premièrement, ils démontrent la capacité des individus à ajuster de manière flexible leur taux métabolique en réponse aux conditions thermiques. La diminution du métabolisme face aux températures élevées a permis aux individus de réduire leurs dépenses énergétiques, et donc les coûts associés à la maintenance de l'organisme (« compensation négative » Clarke, 2006; Norin et al., 2014; Seebacher et al., 2010). Cette réduction peut être particulièrement avantageuse pour des espèces au rythme de vie lent comme les vipères que j'ai étudiées, car le métabolisme au repos constitue une part importante des dépenses énergétiques chez ces espèces. Une réduction de ces dépenses de maintenance peut permettre une allocation d'énergie plus importante vers d'autres fonctions comme l'activité ou la reproduction (Careau et al., 2008; Mathot & Dingemanse, 2015). La flexibilité de ce trait physiologique en réponse aux variations de température, même après une exposition développementale chronique à des conditions thermiques, peut constituer aussi un avantage face aux fluctuations environnementales à long terme associées au changement climatique et aux changements saisonniers (Little & Seebacher, 2016; Piersma & Gils, 2011; Seebacher et al., 2015). Des effets sur le métabolisme ont cependant persisté 2 mois après le changement des conditions thermiques, suggérant des pas de temps d'ajustement de l'ordre de plusieurs semaines. De la même manière, nous n'avons pas observé d'ajustement plastique des taux métabolique à court terme (1 mois) face aux températures élevées ou à la privation de l'accès à l'eau de boisson dans l'[Article 2](#). Une réduction plastique du métabolisme pourrait pourtant permettre de réduire de manière conjointe les dépenses énergétiques et les pertes hydriques (Muir et al., 2007; Woods & Smith, 2010). Ces résultats indiquent que le pas de temps des réponses d'acclimatation (de l'ordre des mois) chez ces espèces longévives pourrait contraindre la capacité des organismes à ajuster rapidement leur métabolisme face aux événements extrêmes (Gunderson & Stillman, 2015). Ma thèse apporte des éléments de compréhension sur la flexibilité des réponses d'acclimatation du métabolisme et sur les pas de temps associés chez les ectothermes longévifs, mais on peut faire l'hypothèse que la temporalité de ces réponses dépende des stratégies d'histoire de vie et de la saisonnalité à laquelle les espèces sont exposées (Kuyucu & Chown, 2021; Noakes & McKechnie, 2020). Cela ouvre des

perspectives de recherche pour mieux comprendre la temporalité de la plasticité physiologique chez les ectothermes et en clarifier les déterminants associés.

Deuxièmement, mes résultats démontrent que les conditions thermiques au cours du développement peuvent induire une plasticité développementale irréversible des pertes hydriques. Les ajustements ont notamment permis une réduction des pertes hydriques journalières des individus exposés aux cycles thermiques chauds et froids. Ce résultat indique le rôle de la température comme un indice environnemental à l'origine d'ajustements plastiques des pertes hydriques (Riddell et al., 2019). Dans les habitats naturels, les contraintes hydriques et notamment les contraintes desséchantes de l'air (déficit de pression de vapeur d'eau élevé) sont corrélés à la température (Dai, 2013) : une réduction des pertes hydriques en réponse à des températures élevées peut donc constituer une réponse adaptative face aux risques de déshydratation accrus.

Enfin, une contribution majeure de l'[Article 1](#) est la démonstration d'une co-variation constante à l'échelle individuelle pendant 7 ans des taux métaboliques et des pertes hydriques (**Figure 40**), suggérant l'existence d'un syndrome physiologique reliant ces traits de la régulation des balances thermiques et hydriques. Ce résultat démontre un lien fonctionnel étroit entre la régulation de la balance thermique et de la balance hydrique.

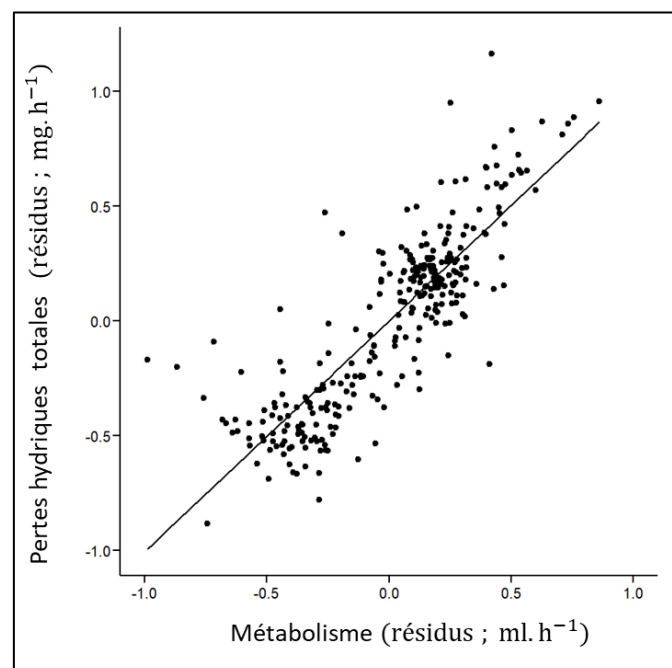


Figure 40 : Corrélation entre pertes hydriques totales (résidus du modèle ; mg/h) et taux métabolique (résidus du modèle ; ml/h) mise en évidence dans l'[Article 1](#).

Ces résultats sont particulièrement importants pour la compréhension des réponses des ectothermes face au changement climatique car ils indiquent que la plasticité physiologique face aux variations de température implique des réponses étroitement liées à la régulation de la balance hydrique. Ils suggèrent aussi l'importance de considérer la réversibilité des réponses d'acclimatation sur des pas de temps longs. Des syndromes physiologiques de thermo-hydrorégulation pourraient alors contribuer aux réponses des ectothermes au changement climatique. Des études récentes indiquent également que considérer les pertes hydriques individuelles et leur plasticité face aux variations climatiques permet une meilleure compréhension de la vulnérabilité climatique des ectothermes (Chown et al., 2011; Kearney et al., 2018c; Lertzman-Lepofsky et al., 2020; Riddell et al., 2017).

b) Effets combinés des conditions thermiques et hydriques

J'ai testé l'hypothèse que les contraintes thermiques et hydriques impactent de manière interactive la physiologie des individus. Les résultats de l'[Article 2](#) indiquent cependant des effets principalement additifs des contraintes thermiques (cycle thermique caniculaire) et hydriques (privation de l'accès à l'eau de boisson) sur la physiologie des individus, contrairement à nos prédictions. Les effets observés suggèrent ainsi des réponses physiologiques distinctes à chaque stresser plutôt que des réponses conjointes induisant des effets d'interaction. Par exemple, les contraintes hydriques et thermiques ont additivement induit une augmentation des pertes de masse. Le comportement de boisson post-expérimental, la perte de masse et l'augmentation de l'osmolalité plasmatique des vipères indiquent conjointement un état de déshydratation dans le traitement sous contraintes hydriques. La corrélation entre les pertes de masse et les taux basaux de corticostérone, mais pas avec l'osmolalité suggère cependant que les pertes de masse dans le traitement avec contraintes thermiques soient davantage liées à une augmentation des dépenses énergétiques et du catabolisme (Burraco et al., 2020b; CaraDonna et al., 2018) qu'à une déshydratation exacerbée. De manière similaire, les taux basaux de corticostérone ont été influencés de manière additive par les contraintes thermiques et hydriques suggérant un ajustement indépendant à la température corporelle et à l'état de déshydratation. Des études récentes ont également documenté des effets additifs des contraintes thermiques et hydriques sur la physiologie de lézards et de grillons (Brusch et al., 2020b; Padda et al., 2021), pouvant conduire à des coûts supérieurs pour les individus exposés aux stressers combinés.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'il soit possible de considérer indépendamment les effets physiologiques à court terme de ces deux stressseurs climatiques.

Les résultats de l'[Article 3](#) indiquent que les contraintes hydriques liées à l'air (air sec) peuvent compromettre l'état d'hydratation individuel (augmentation de l'osmolalité, pertes de masse). Ce résultat est important car il démontre que les variations d'hygrométrie de l'air, associées aux températures élevées et aux évènements climatiques extrêmes de canicules et de sécheresse impactent négativement la balance hydrique et les performances individuelles, même chez des ectothermes terrestres avec une peau résistante aux pertes hydriques (Anderson & Andrade, 2017). Un effet marqué de ces contraintes hydriques sur la physiologie est notamment l'augmentation des pertes musculaires. Dans l'[Article 4](#), une courte privation d'eau a également induit une perte musculaire marquée sur des vipères péliades gestantes. De telles pertes musculaires peuvent en effet réduire les performances individuelles de locomotion, mais conduisent aussi à la déplétion de réserves énergétiques, cruciales pour la reproduction sur capital de ces espèces (Dupoué & Lourdais, 2014; Lorigou et al., 2016; Lourdais et al., 2013, 2004). Les implications fonctionnelles de ces pertes musculaires en lien avec la déshydratation sont discutées dans la section 1.3. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les contraintes hydriques (tant sous la forme des entrées liées à l'eau de boisson que des pertes hydriques liées à l'humidité de l'air) peuvent compromettre la balance hydrique et les performances individuelles.

c) Mécanismes proximaux impliqués

Acclimatation du métabolisme et des pertes hydriques

Les ajustements du métabolisme observés dans l'[Article 1](#) reposent sur des mécanismes proximaux à l'échelle cellulaire, notamment des modifications de la structure ou de la densité des mitochondries (Chung et al., 2017; Koch et al., 2021; Salin et al., 2016; Seebacher et al., 2010b) ou des ajustements des transcriptomes (Vergauwen et al., 2010). La réduction des pertes hydriques dans le groupe exposé au cycle thermique journalier plus chaud, présentant également des taux métaboliques réduits, peut s'expliquer en partie par les réductions des pertes hydriques respiratoires associées (Woods & Smith, 2010). Ce mécanisme partagé entre taux métaboliques et pertes hydriques peut notamment contribuer à expliquer le patron de co-variation observé à l'échelle individuelle. Cependant, nous avons également observé une

réduction des pertes hydriques totales dans le groupe exposé au cycle thermique journalier plus froid, malgré des taux métaboliques supérieures.

Ce résultat nous amène à formuler l'hypothèse que la fraction cutanée des pertes hydriques a majoritairement contribué à la plasticité développementale des échanges hydriques. L'épaisseur, la structure et la composition lipidique de la couche cornée, la plus externe de l'épiderme (stratum corneum) est un déterminant majeur de la résistance cutanée aux pertes hydriques chez les reptiles et notamment les serpents (Baeyens & Rountree, 1983; Lillywhite, 2004; Roberts & Lillywhite, 1983; Torri et al., 2014). La composition lipidique de cette couche de l'épiderme peut varier au cours de la vie des individus (Agugliaro & Reinert, 2005), et des mécanismes de plasticité développementale des pertes hydriques ont été documentés chez des oiseaux désertiques et des amphibiens (Muñoz-García & Williams, 2008; Riddell et al., 2019; Tieleman & Williams, 2015). Les conditions thermiques pendant le développement peuvent induire des ajustements plastiques des pertes hydriques cutanées (Riddell et al., 2019). Des travaux sur des lézards, aux mécanismes de pertes hydriques cutanées similaires à ceux des vipères, ont également démontré des capacités d'acclimatation en réponse aux variations de l'humidité de l'air (Kattan & Lillywhite, 1989; Kobayashi et al., 1983). Chez les serpents, le processus de mue joue un rôle clef dans les modifications structurelles du tégument et la perméabilité hydrique cutanée, notamment durant la période développementale (Torri et al., 2014; Tu et al., 2002). Le lien entre le métabolisme et les pertes hydriques mis en évidence par mes travaux, et la contribution des pertes hydriques cutanées à la plasticité développementale observée, soulignent donc que des ajustements plastiques de la perméabilité cutanée (e.g. **Figure 41**) contribuent aux réponses des ectothermes face aux contraintes thermiques et hydriques. De futures études sont nécessaires pour clarifier les mécanismes associés à ces réponses cutanées, la temporalité de ces ajustements et la fenêtre de sensibilité au cours du développement, et pour déterminer les bénéfices associés pour le maintien de la balance hydrique face aux stressseurs climatiques.

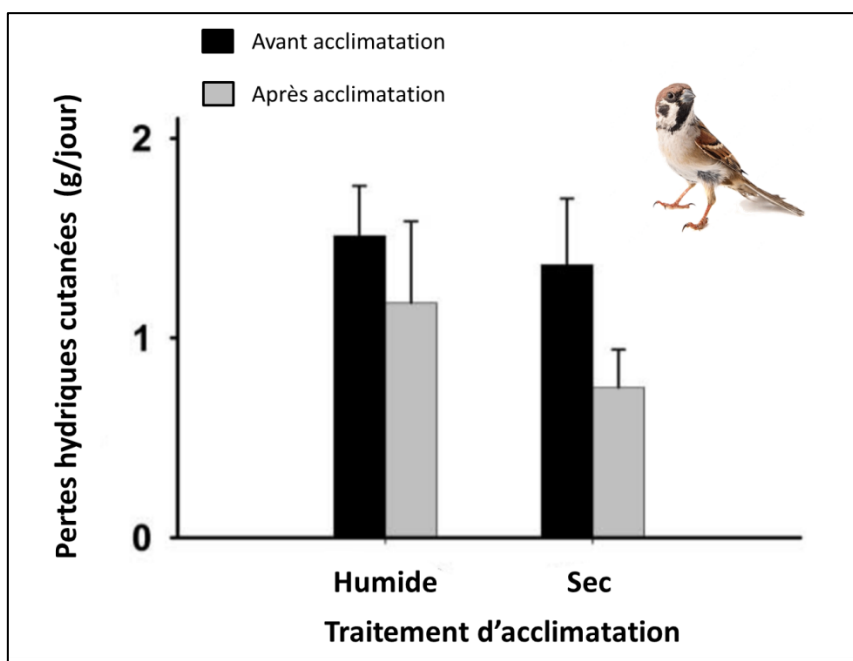


Figure 41 : Flexibilité phénotypique des pertes hydriques cutanées chez des moineaux (*Passer domesticus*) exposés pendant 21 jours à des conditions hydriques humides ou sèches. Ces ajustements ont été corrélés à des modifications structurelles du stratum corneum. Modifié d'après Muñoz-Garcia et al., 2015.

Catabolisme protéique et maintien de la balance hydrique

Les travaux de Bruschi et al., (2018) ont mis en évidence qu'en l'absence d'eau de boisson, le catabolisme protéique via la mobilisation des protéines de structures au sein des muscles peut générer la libération d'eau de liaison et ainsi compenser l'état de déshydratation des individus. Les résultats de ma thèse soutiennent l'expression de ce mécanisme physiologique compensatoire en réponse aux contraintes hydriques. Ainsi, l'[Article 3](#) et l'[Article 4](#) démontrent que les contraintes hydriques de nature différentes (air desséchant ou privation de l'accès à l'eau de boisson) induisent des pertes musculaires.

Dans l'[Article 3](#), la corrélation entre les pertes musculaires et l'état de déshydratation individuel (augmentation de l'osmolalité plasmatique ; **Figure 42**) souligne un lien fonctionnel entre la balance hydrique et cet ajustement physiologique. De la même manière, la corrélation entre les pertes musculaires et le nombre d'embryons en développement dans l'[Article 4](#) démontre clairement des contraintes hydriques additives liées aux besoins embryonnaires, et indique que la mobilisation protéique pourrait contribuer à l'allocation en eau des femelles gestantes vers leurs embryons. Ainsi les muscles squelettiques peuvent constituer non seulement un support énergétique pour soutenir la reproduction (Lorioux et al., 2016; Lourdaï et al., 2013b; 2004), mais également une réserve hydrique dont la

mobilisation pourrait compenser en partie les effets négatifs des contraintes hydriques sur la physiologie individuelle et l'allocation en eau pendant la reproduction (Brusch et al., 2018). Ce mécanisme physiologique contribue ainsi à la fois à la régulation de la balance énergétique étroitement liée à la température, et à la régulation de la balance hydrique.

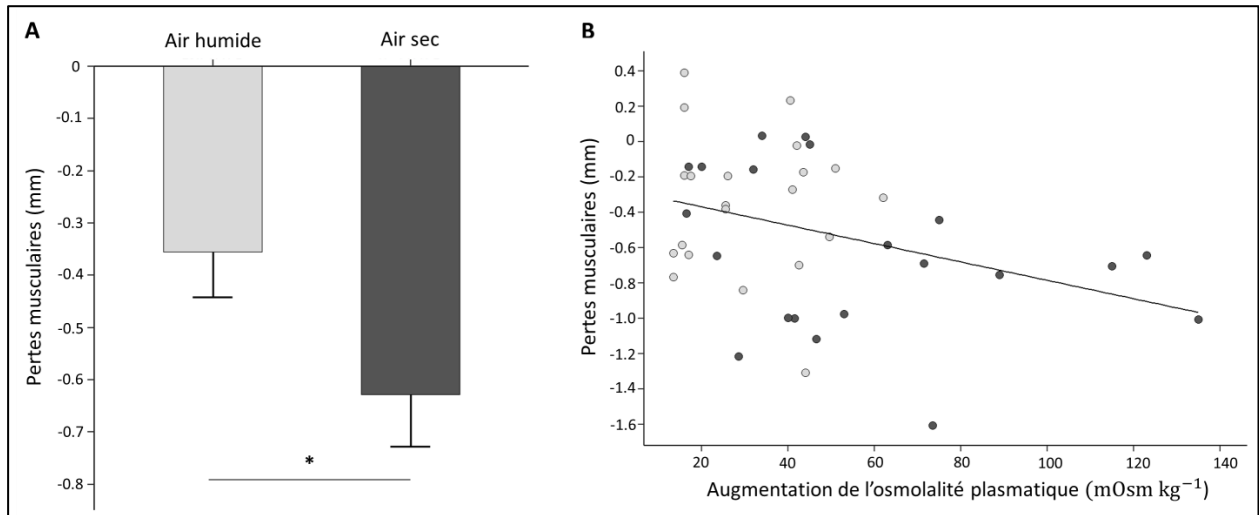


Figure 42 : (A) Pertes musculaires (mm) en fonction des contraintes hydriques (air humide vs. air sec) ; (B) Corrélations entre pertes musculaires et augmentation de l'osmolalité plasmatique au cours du traitement expérimental (cercles clairs = air humide ; cercles foncés = air sec) ; Résultats obtenus dans l'Article 3.

Soubassement hormonal

Mes travaux indiquent que les taux basaux de corticostérone reflètent les effets additifs des contraintes thermiques et hydriques (Article 2). L'augmentation des niveaux basaux de corticostérone en réponses aux températures élevées est susceptible d'indiquer un état physiologique altéré associé à des dépenses énergétiques supérieures (comme suggéré par la corrélation observée entre augmentation de corticostérone et pertes de masse) plutôt qu'une réponse plastique adaptative (DuRant et al., 2008; Jimeno et al., 2018). En effet, des études ont au contraire documenté une relation négative entre la température d'acclimatation et le niveau basal de corticostérone, associé à une réduction de l'activité comportementale pouvant limiter les dépenses énergétiques (Dupoué et al., 2018c; Jessop et al., 2016). Alors que le rôle de la corticostérone dans la régulation hydrique et notamment de l'équilibre en ions a été documenté chez plusieurs vertébrés (De Kloet et al., 2000; McCormick & Bradshaw, 2006), les taux basaux de corticostérone n'étaient pas corrélés à l'état d'hydratation individuel (osmolalité plasmatique). La mobilisation énergétique associée à l'augmentation des taux basaux de corticostérone pourrait cependant contribuer à induire des réponses de catabolisme

protéique susceptibles d'influencer la balance hydrique, comme suggéré par les pertes musculaires observées dans l'[Article 3](#) et l'[Article 4](#) (Brusch et al., 2018).

D'autres hormones comme l'arginine vasotocine jouent des rôles clefs dans la régulation de la balance hydrique via des ajustements physiologiques et comportementaux en réponse à la déshydratation (Balment et al., 2006; Bradshaw, 1975; Ladyman et al., 2006; McCormick & Bradshaw, 2006; Scanes, 2015). La sécrétion d'arginine vasotocine en réponse à l'augmentation de l'osmolalité peut notamment contribuer aux réponses de « dépression thermique » face aux contraintes hydriques (Ladyman et al., 2006). Considérer d'autres médiateurs hormonaux comme l'arginine vasotocine pourrait ainsi permettre de clarifier les mécanismes proximaux de la régulation hydrique, notamment en relation avec les ajustements comportementaux, indépendamment des ajustements de la balance énergétique (dont la corticostérone est quant à elle un médiateur).

2. Le rôle du comportement face aux contraintes hydriques

a) Le comportement comme intégrateur de l'état d'hydratation

La consommation d'eau de boisson est un comportement essentiel pour restaurer ou maintenir la balance hydrique chez les vertébrés terrestres et aquatiques (Edwards et al., 2021; Lillywhite et al., 2019; Sandfoss & Lillywhite, 2019). Par exemple, les serpents et des lézards désertiques, dépendent essentiellement de l'eau de boisson pour maintenir leur balance hydrique et non de l'alimentation, qui implique au contraire un coût hydrique à court terme et induit des comportements de boisson en grande quantité (Lillywhite, 2017; Murphy & Denardo, 2019; Wright et al., 2013). Les serpents marins dépendent également de l'eau de pluie pour s'hydrater, et l'intensité des comportements de boisson peut intégrer l'état physiologique individuel (Lillywhite et al., 2019, 2012, 2008).

Les résultats de l'[Article 3](#), l'[Article 4](#) et l'[Expérimentation 5](#) indiquent qu'après une période d'exposition à des contraintes hydriques, les individus expriment un comportement de boisson immédiat et prononcé. L'[Article 2](#) met en évidence que les contraintes thermiques et hydriques combinées impactent de manière interactive ce comportement de boisson : le gain de masse associé est disproportionnellement plus élevé pour les individus exposés aux températures élevées et à une privation d'eau que pour les autres groupes (**Figure 43**).

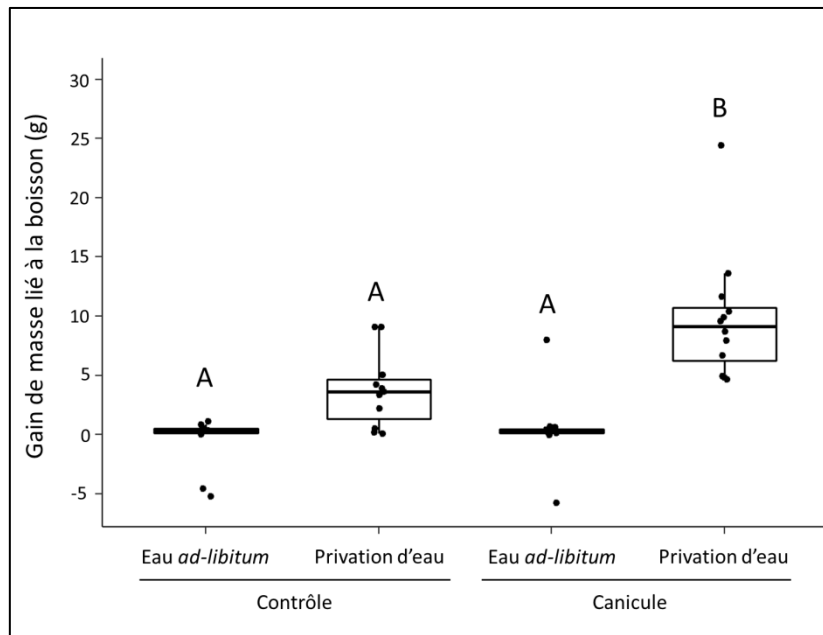


Figure 43 : Comportement de boisson (gain de masse en grammes) en fonction des contraintes thermiques et hydriques imposées dans l’[Article 2](#). Les lettres différentes indiquent des différences entre groupes d’après des tests post-hoc.

J’ai également mis en évidence une corrélation entre ce comportement de boisson et le niveau de déshydratation individuel (osmolalité plasmatique [Figure 44](#) et pertes de masse ; [Article 2](#) ; [Article 3](#) ; [Article 4](#)), ainsi qu’avec les dommages oxydatifs liés à la privation d’eau (ROMs ; [Article 4](#)). Mes résultats démontrent clairement que le comportement de boisson est étroitement lié à l’état physiologique individuel, qui reflète les effets des contraintes climatiques subies dans le passé et de manière cumulative par l’organisme.

L’interaction entre contraintes hydriques et thermiques sur ce comportement, malgré des effets additifs sur l’état physiologique, suggère des effets synergiques des températures élevées et de la privation d’eau sur des mécanismes neurosensoriels contrôlant la soif et l’expression de ce comportement. Des travaux supplémentaires sont requis pour déterminer ces mécanismes et les seuils de déshydratation induisant ce mécanisme compensatoire. Ces résultats ont des implications sur l’écologie des organismes face aux événements extrêmes, ils suggèrent que des comportements compensatoires peuvent s’exprimer, comme par exemple des changements d’activité ou la recherche d’eau de boisson dans leur habitat (Serrano-Rojas & Pašukonis, 2021; Wood et al., 2021).

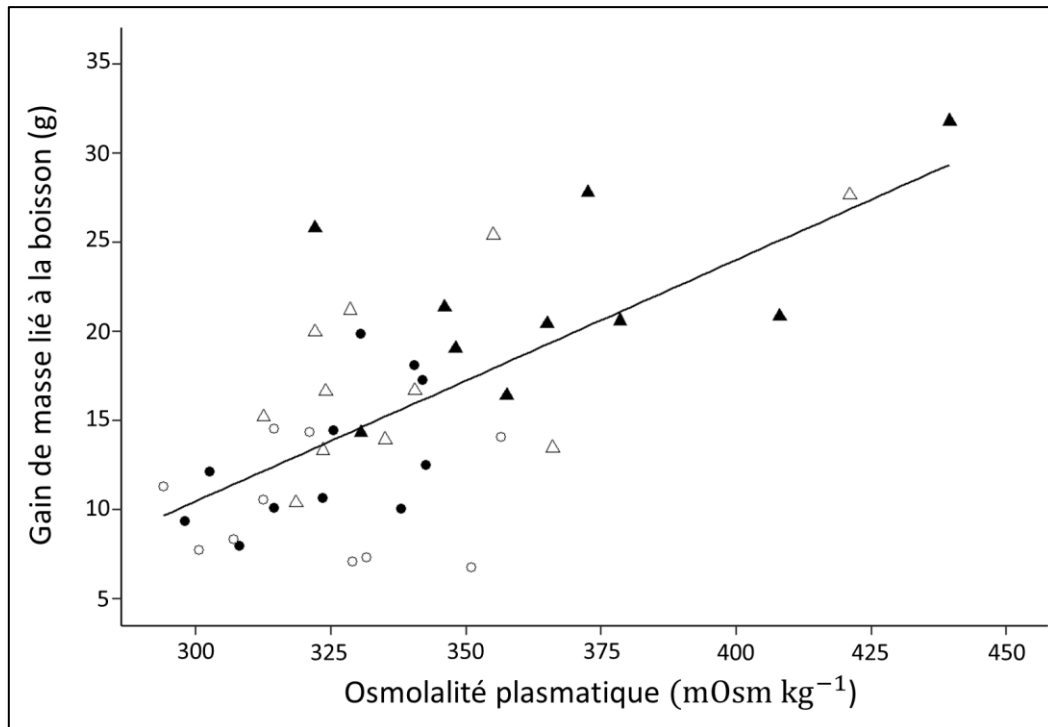


Figure 44 : Corrélation entre le comportement de boisson (gain de masse en grammes) et état hydrique en fin de traitement expérimental (osmolalité plasmatique mOsm/kg) dans l'Article 4 (cercles = air humide ; triangle = air sec ; couleur blanche = abris humide ; couleur noire = abris sec).

L'Article 3 démontre très clairement un choix comportemental de microclimats face aux contraintes hydriques (comportement que nous avons dénommé "hydrorégulation") et qui intègre l'état physiologique. Ainsi la sélection d'abris offrant un microclimat humide est observée en grande majorité par les individus exposés à un air sec. Cet ajustement comportemental s'est effectué de manière graduelle au cours du temps : plus le temps d'exposition aux contraintes hydriques augmente, plus les individus ont ajusté leur comportement vers la sélection du microclimat humide. La réponse comportementale semble donc ici aussi induite par l'état physiologique interne (i.e. effets cumulés au cours du temps des contraintes hydriques sur l'état de déshydratation) plutôt que par la perception d'un signal environnemental (air sec) qui aurait provoqué une réaction immédiate.

Les résultats collectés sur (1) comportement de boisson et (2) la sélection de microclimats indiquent donc que les ajustements comportementaux face aux contraintes hydriques sont largement dépendants de l'état physiologique individuel, et intègrent les effets cumulés des contraintes climatiques au cours du temps. Cette contribution est particulièrement importante pour comprendre la dynamique des réponses comportementales aux contraintes hydriques. Alors que les réponses de thermorégulation comportementale ont été documentées sur des pas

de temps très courts et jouent un rôle majeur dans l'ajustement au premier ordre des patrons d'activité et d'acquisition d'énergie (e.g. minutes ; O'Neill & Rolston, 2007; Seebacher, 2005; Vickers et al., 2011), ces résultats suggèrent des ajustements comportementaux face aux contraintes hydriques mais sur des pas de temps plus longs (e.g. jours et semaines) en fonction de leur état de déshydratation. Ainsi, l'expression des comportements d'hydrorégulation devrait être dépendant de l'intensité de la contraintes hydrique, mais aussi de la résistance aux pertes hydriques de l'individu et également de son état physiologique (Dupoué et al., 2015b; Lourdais et al., 2017). Des variations importantes de réponses comportementales sont donc attendues entre les espèces selon leurs adaptations hydriques spécifiques. Ainsi Guillon et al., (2014) a pu démontrer qu'en situation de syntopie, la vipère péliade sélectionne des microclimats plus humides que la vipère aspic, du fait de sa sensibilité aux pertes hydriques plus élevée en lien avec son affinité climatique boréale. La prise en compte de la temporalité de ces ajustements est particulièrement importante pour modéliser les réponses des organismes face aux contraintes hydriques dans les habitats naturels. Contrairement aux réponses aux conditions thermiques, des réponses physiologiques peuvent aussi permettre aux individus de maintenir leur état hydrique en l'absence d'eau de boisson, avant d'ajuster leur comportement ou en parallèle de ces réponses. Par exemple, en mobilisant des réserves hydriques internes, via le catabolisme protéique comme le suggèrent mes résultats (Brusch et al., 2018), ou via la mobilisation de l'eau stockée dans la vessie comme démontré chez des tortues terrestres et des lézards des milieux désertiques (Davis & DeNardo, 2007; Jørgensen, 1998; Peterson, 2015).

b) Atténuation comportementale des coûts physiologiques

J'ai pu démontrer expérimentalement l'existence d'une hydrorégulation comportementale (sélection de microclimats) mais aussi quantifier ses bénéfices pour le maintien de la balance hydrique. En effet, l'accès à un microclimat humide a permis aux individus d'atténuer les pertes de masse, l'augmentation de leur osmolalité plasmatique, et de limiter les pertes musculaires et le comportement de boisson post-expérimental. Dans les conditions contraignantes (air sec), le taux d'utilisation d'un abri humide est par exemple corrélé à la réduction des pertes de masse et de l'augmentation de l'osmolalité plasmatique (**Figure 45**). Ces résultats indiquent clairement que la sélection de microclimats humides permet de limiter l'état de déshydratation individuel ainsi que certains coûts physiologiques et mécanismes compensatoires associés (pertes musculaires, comportements de boisson).

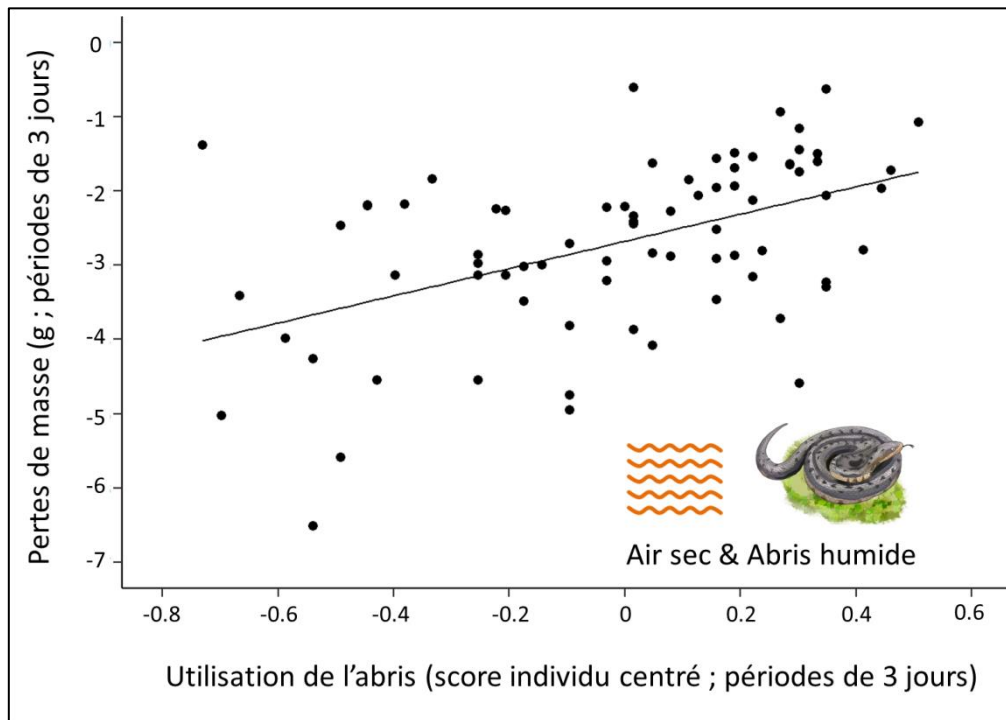


Figure 45 : Relation entre pertes de masse (g ; par période de 3 jours) et utilisation de l’abris (score individu centré ; par période de 3 jours) démontrée dans l’[Article 3](#) dans le groupe exposé aux contraintes hydriques d’air sec et ayant accès à un abri humide

Ce résultat majeur de ma thèse met en évidence (i) l’existence d’un comportement d’hydrorégulation indépendamment des contraintes thermiques (Mitchell & Bergmann, 2016), et (ii) d’autre part que l’utilisation différentielle des microclimats permet d’atténuer l’effet des contraintes hydriques sur la physiologie. Alors que l’essentiel des études sur les ectothermes se sont focalisées sur les effets des ajustements comportementaux en réponse aux microclimats thermiques (Neel et al., 2021; Ng et al., 2021; Pincebourde et al., 2016; Potter et al., 2013), mes travaux démontrent l’importance de considérer également la dimension hydrique des microclimats, et la capacité des organismes à exploiter de manière dynamique les “niches hydroclimatiques” pour réguler leur balance hydrique. Des travaux récents en modélisation ont notamment intégré la sensibilité individuelle aux pertes hydriques pour mieux prédire les réponses écologiques au changement climatique (Albright et al., 2017; Miranda et al., 2019; Peterman & Semlitsch, 2014; Riddell et al., 2017), mais considèrent le microclimat essentiellement sous son volet thermique (Moore et al., 2018; Riddell et al., 2021). Intégrer la dimension hydrique et hygrométrique des microclimats disponibles constitue un challenge important mais qui permettrait d’affiner ces modèles et de mieux prédire les réponses des organismes aux variations climatiques (voir Huang et al., 2020 pour une étude récente appliquant partiellement cette approche).

Ces ajustements comportementaux plus rapides que les réponses d'acclimatation plastiques des pertes hydriques (jours/semaines versus mois/années ; (Mitchell & Bergmann, 2016; Muñoz-Garcia & Williams, 2008; Rozen-Rechels et al., 2020) sont aussi susceptibles de limiter les pressions de sélection sur la physiologie hydrique, en limitant l'exposition aux contraintes environnementales par un effet de construction de niche (Farallo et al., 2020). On appelle « effet Bogert » cette relation antagoniste entre comportement et évolution physiologique, en référence aux travaux de Charles M. Bogert sur la thermorégulation des reptiles (**Figure 46** ; Huey et al., 2015; Muñoz, 2021). Selon cette hypothèse le maintien de l'homéostasie est facilitée par les ajustements comportementaux (par exemple ici des choix de microhabitats) donc l'organisme évite les contraintes environnementales en “déplaçant” sa niche microclimatique par l'intermédiaire du comportement et cet évitement induit une baisse de la sélection sur les performances physiologiques. L'effet Bogert a été démontré dans plusieurs études récentes de la thermorégulation et de la biologie thermique (résumé dans Muñoz, 2021), mais notre travail suggère que les implications évolutives des ajustements comportementaux documentées en regard de la thermorégulation peuvent également s'appliquer à l'hydrorégulation.

Déterminer les implications de ces ajustements en réponse aux contraintes hydriques pour les comportements de thermorégulation et leur capacité à limiter les effets des températures extrêmes sur les ectothermes constitue une perspective de mes recherches. Des études ont renseigné les effets de la déshydratation sur la thermorégulation comportementale (« dépression thermique », abaissement des températures corporelles ; Ladyman & Bradshaw, 2003; Pintor et al., 2016; Rozen-Rechels et al., 2019) et suggèrent une réduction de l'activité en réponse aux conditions chaudes et desséchantes dans les habitats naturels (Dupoué et al., 2018b; Kearney & Porter, 2004; Kearney et al., 2018; Moore et al., 2018; Ryan et al., 2016). Récemment, des modèles ont été développés pour prédire les ajustements comportementaux au sein des microclimats en réponse aux contraintes thermiques et à l'état énergétique (Malishev et al., 2018). Considérer les liens entre le maintien de la balance hydrique et les réserves énergétiques, ainsi que leurs implications pour les performances individuelles et la valeur sélective en fonction des températures permettrait d'affiner ces modèles.

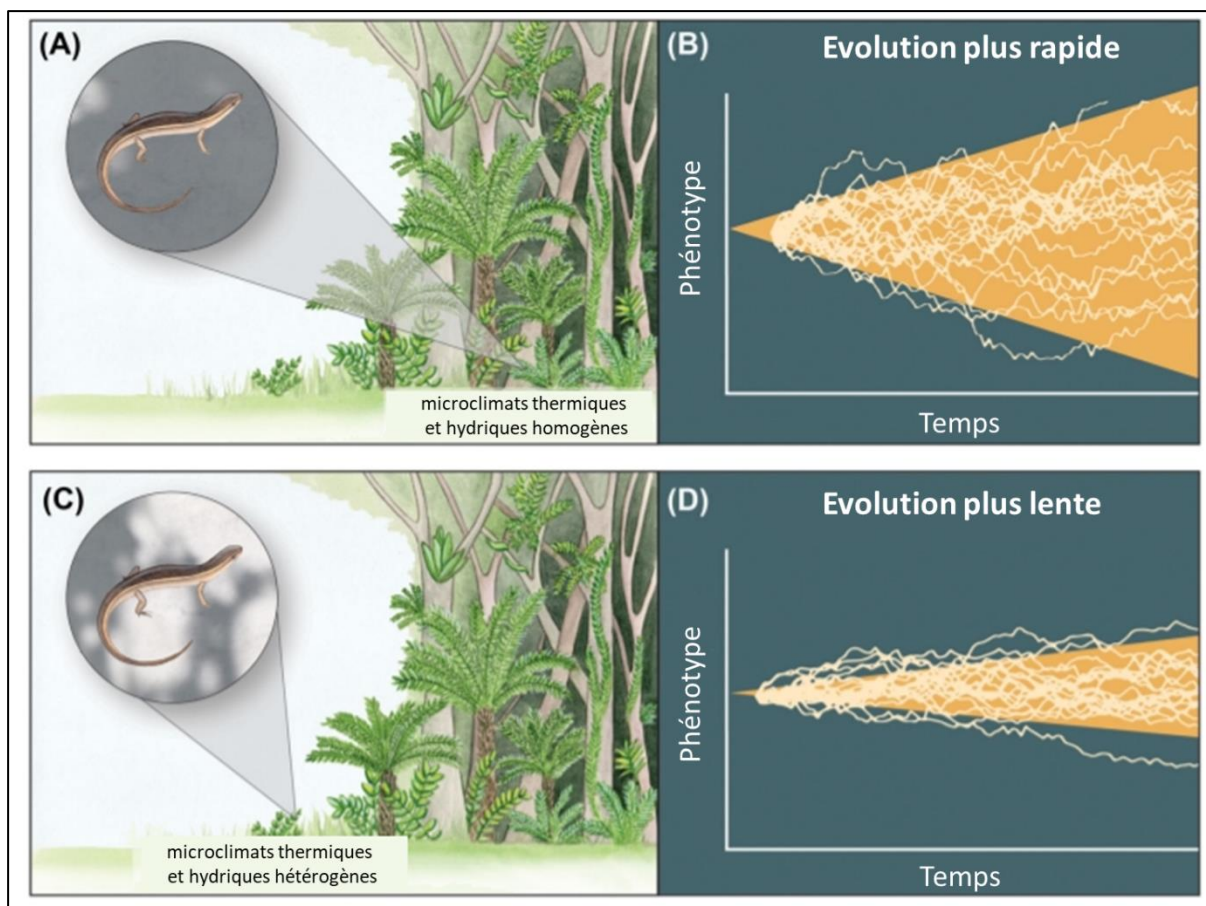


Figure 46 : Représentation schématique de l’effet Bogert ; modifié d’après Muñoz, 2021. (A) un lézard interagissant avec des microclimats homogènes dans un habitat de forêt fermée a une capacité limitée pour exprimer des ajustements comportementaux : à long terme de telles lignées devraient être exposées à des pressions de sélection supérieures sur leur physiologie et présenter des taux d’évolution plus rapides (B). Au contraire, (C) un lézard interagissant avec des microclimats hétérogènes dans un habitat plus ouvert présente de capacités supérieures pour exprimer des ajustements comportementaux à plus court terme que les ajustements physiologiques : à long terme de telles lignées devraient à des pressions de sélection inférieure sur la physiologie et donc un taux d’évolution plus lent (i.e. « l’effet Bogert ») (D).

Des compromis entre les besoins thermiques et hydriques peuvent en effet s’exprimer en fonction des statuts physiologiques et influencer les choix de microclimats (Dupoué et al., 2015b; Lourdais et al., 2017; Stahlschmidt et al., 2011). Un des objectifs de ma thèse était de tester les compromis et conflits potentiels entre les mécanismes de thermorégulation et d’hydrorégulation, notamment durant la gestation qui implique des besoins thermiques et hydriques contrastés en fonction du stade de développement des embryons (Lorioux et al., 2013b; Lourdais et al., 2017, 2015). Je n’ai pas pu développer cette approche dans le contexte de la crise sanitaire qui a fortement impacté mes expériences. Mes travaux ouvrent cependant des perspectives expérimentales pour clarifier les interactions entre thermorégulation et hydrorégulation comportementale. Dans l’[Article 4](#), j’ai testé l’effet de la privation d’eau au

cours de la gestation sur la thermorégulation de femelles gestantes, et je n'ai pas observé d'effets sur les préférences thermiques. Cependant, la méthodologie employée ne permet qu'une compréhension limitée de l'ajustement des températures corporelles car elle repose sur des mesures ponctuelles au thermomètre infrarouge. Des designs expérimentaux utilisant des capteurs internes (e.g. ANAPILS) et manipulant conjointement l'accès aux microclimats thermiques et hydriques permettraient de mesurer avec précision les patrons journaliers de thermo-hydrorégulation et d'identifier les interactions entre ces ajustements. Des mesures conjointes de traits physiologiques permettraient alors de clarifier les déterminants de ces réponses, et les bénéfices associés sur le maintien de l'homéostasie.

c) L'hétérogénéité microclimatique : implications pour la conservation

Mes travaux de thèse mettent en évidence le potentiel des conditions microclimatiques hydriques à limiter les effets des stressseurs sur la physiologie des organismes. Le microclimat peut donc constituer non seulement un refuge thermique face aux extrêmes de température (Lembrechts et al., 2019; Neel et al., 2021; Pincebourde et al., 2016; Potter et al., 2013), mais également un refuge hydrique face aux conditions desséchantes. Face aux événements climatiques extrêmes impliquant des contraintes thermiques et hydriques combinées, ces microclimats sont donc susceptibles de permettre des ajustements comportementaux limitant l'exposition aux contraintes.

La capacité des organismes à exprimer ces ajustements comportementaux face aux événements extrêmes dépend cependant de la disponibilité de ces microclimats en lien avec la structure des habitats et la capacité des organismes à les exploiter (Araya-Donoso et al., 2021; Neel et al., 2021; Riddell et al., 2021). Or, les événements climatiques extrêmes peuvent directement impacter la structure des habitats et micro-habitats, et considérablement modifier les conditions microclimatiques. Par exemple, des sécheresses peuvent modifier la structure de la canopée et des strates arbustives en forêt et ainsi modifier les microclimats disponibles et affecter les communautés d'ectothermes y vivant (Dundas et al., 2021). L'exploitation forestière peut de la même manière impacter les microclimats disponibles (Mollinari et al., 2019). La modification de la structure des habitats et les pertes d'habitats liés aux activités anthropiques peut ainsi limiter l'accès aux microclimats (**Figure 47** ; Gorissen et al., 2017) et contraindre le potentiel des réponses comportementales à limiter les effets des événements climatiques extrêmes sur la physiologie.

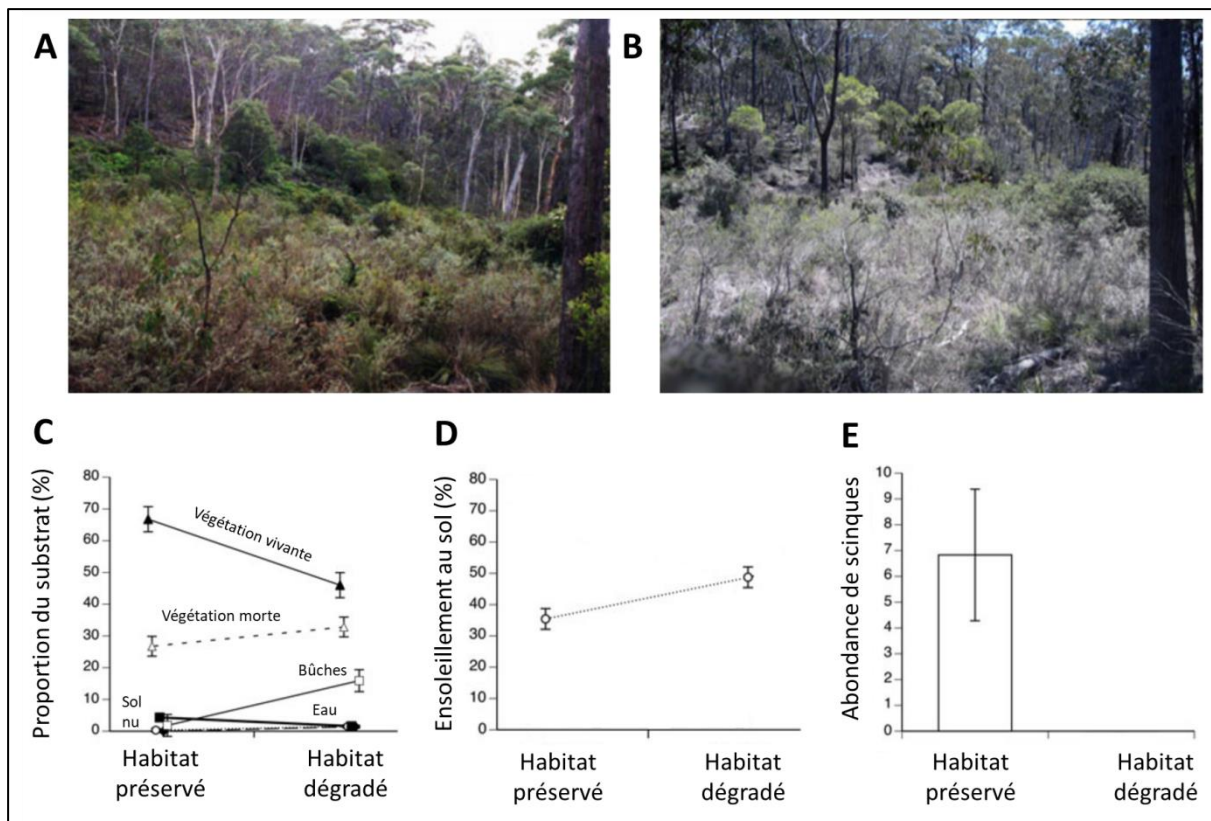


Figure 47 : Habitat de marais au sud-est de l'Australie, dans un état préservé (A) ou dégradé par des activités anthropiques (B). La dégradation de l'habitat conduit à des modifications des micro-habitats (C : proportions de différents substrats en fonction du type d'habitat) modifiant les microclimats vers des conditions plus ensoleillées, plus chaudes et sèches (D : proportion d'enseillement au sol en fonction du type d'habitat) ; menant à l'extinction locale d'un scinque (*Eulamprus leuraensis*) inféodée aux zones humides (E : abondance moyenne des scinques en fonction du type d'habitat). Modifié d'après Gorissen et al., 2017.

Au contraire, la mise en place de mesure de gestion et de conservation favorisant l'hétérogénéité des micro-habitats peut permettre de maintenir une diversité de microclimats susceptibles d'être exploités par les organismes exposés aux contraintes climatiques. Face au changement climatique, la conservation des habitats et de la diversité des microclimats associés est donc une priorité pour la conservation des ectothermes (Turlure et al., 2010). Dans le cas spécifiques des vipères aspic et péliades étudiées au cours de ma thèse, le maintien et la restauration des paysages de friches, de landes et de bocages est primordial (Gardner, 2019; Gleed-Owen & Langham, 2012) car ces écosystèmes présentent une mosaïque complexe de microclimats favorables à l'expression d'ajustements comportementaux.

3. Sensibilité hydrique de la reproduction

a) Effets sur la physiologie maternelle et les compromis d'allocation

Chez les ectothermes et notamment les reptiles squamates, les effets de la température sur la reproduction et les effets transgénérationnels associés ont été largement documentés (Matsumoto & Crews, 2012; Noble et al., 2018; Refsnider et al., 2019; Sanger et al., 2021; Singh et al., 2020; While et al., 2018). Récemment, des études ont aussi mis en évidence l'importance de l'allocation des ressources hydriques dans la reproduction pour le développement de la descendance (Brusch et al., 2018; Capehart et al., 2016; Dupoué et al., 2015a; Lourdais et al., 2017, 2015). Cependant, les recherches portant sur les effets des sécheresses sur la reproduction ont essentiellement documenté des effets indirects liés aux ressources trophiques, notamment chez les serpents (Amorim et al., 2015; Cruz-McDonnell & Wolf, 2016; Martin & Mouton, 2020; Smith et al., 2019). Je fais l'hypothèse dans ma thèse que les effets des contraintes hydriques sur la physiologie peuvent directement impacter et compromettre la reproduction. Les résultats de l'[Article 4](#) indiquent clairement qu'une courte période de privation d'eau en début de gestation induit chez la femelle vipère péliade une déshydratation marquée (pertes de masse, augmentation de l'osmolalité, comportement de boisson post-expérimental), une mobilisation des réserves musculaires plus élevée, l'augmentation des taux basaux de corticostérone, et un stress oxydatif (augmentation des dommages ROMs sans réponse anti-oxydante OXY). De tels niveaux de stress physiologique et de déshydratation sont susceptibles d'altérer les performances individuelles des femelles reproductrices (Anderson & Andrade, 2017; Lorenzon et al., 1999; Moeller et al., 2013). Ainsi, les contraintes hydriques pendant la gestation perturbent fortement la physiologie maternelle et amplifient les coûts énergétiques de la reproduction (stress physiologique et déplétion des réserves).

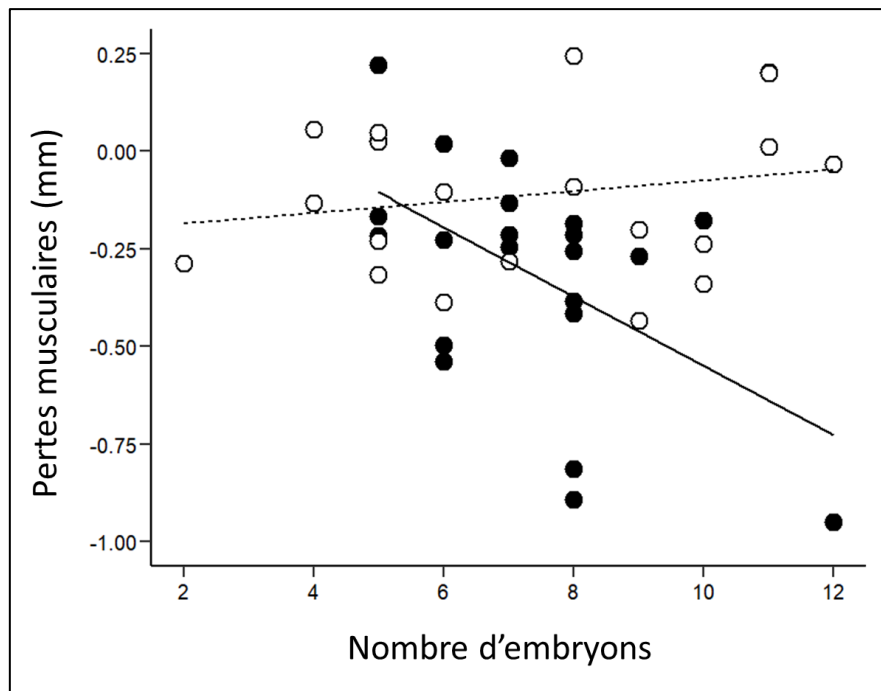


Figure 48 : Corrélation entre pertes musculaires et nombre d'embryons observée chez les femelles privées d'eau (cercles noirs) mais absente chez les femelles du groupe contrôle (cercles blancs) dans l'[Article 4](#)

On observe un maintien des transferts en eau vers les embryons chez les femelles déshydratées, et une corrélation entre le comportement de boisson post-expérimental et les pertes musculaires avec le nombre d'embryons (**Figure 48**). Ces résultats indiquent que les femelles ont maintenu l'allocation en eau vers leurs embryons au détriment de leur propre balance hydrique (Brusch et al., 2018; Dupoué et al., 2015a) afin de répondre aux besoins de la reproduction (Lourdais et al., 2017, 2015). Mes résultats confirment donc que le concept de reproduction sur capital généralement appliqué à l'énergie, peut également être appliqué aux ressources hydriques (e.g. réserves musculaires investies dans l'allocation en eau vers la reproduction). Dans ce contexte, les femelles les plus fécondes sont les plus impactées par les contraintes hydriques (Dupoué et al., 2015a). Mes résultats démontrent ainsi des compromis liés à l'eau et à la fécondité (Dupoué et al., 2020b, 2015a). Cela implique d'une part l'existence d'effets démographiques plus prononcés sur les femelles contribuant le plus au recrutement dans la population mais aussi des pressions de sélection de l'environnement hydrique sur l'investissement reproducteur et la taille des portées.

Mes résultats confirment que les contraintes hydriques ont des répercussions directes sur les performances et potentiellement sur la survie future des individus, indépendamment d'effets à l'échelle des écosystèmes et des interactions trophiques (Cruz-McDonnell & Wolf, 2016;

Martin & Mouton, 2020; Smith et al., 2019). Ils démontrent une sensibilité physiologique prononcée des femelles pendant la gestation en lien avec les contraintes hydriques embryonnaires et soutiennent ainsi le lien entre les coûts parentaux liés à la viviparité et la vulnérabilité climatique associé à ce mode de reproduction (Dupoué et al., 2020c, 2018a; Furness et al., 2015; Jara et al., 2019; Pincheira-Donoso et al., 2013).

b) Effets sur le développement pré et postnatal

Les résultats de l'[Article 4](#) indiquent que les femelles exposées à une privation d'eau en début de gestation ont maintenu l'allocation en eau vers les embryons, au détriment du maintien de leur équilibre hydrique et en lien avec les besoins hydriques additifs de chaque embryon. Cependant, malgré cet investissement maternel coûteux, les contraintes hydriques ont conduit à de la mortalité embryonnaire en début de gestation. Une courte privation d'eau peut donc compromettre le succès reproducteur, notamment chez les femelles les plus fécondes plus sensibles à la déshydratation, malgré les réserves énergétiques accumulées et investies dans l'événement reproducteur. Mes travaux démontrent que les effets directs des contraintes hydriques sur la physiologie peuvent altérer le succès reproducteur (résultats similaires observés dans deux études récentes : Capehart et al., 2016; Zani & Stein, 2018). Ce coût sur le développement embryonnaire et le succès reproducteur est ainsi susceptible de contribuer au déclin des populations exposées à des sécheresses plus intenses et fréquentes.

La privation d'eau en fin de gestation dans l'[Expérimentation 5](#) n'a pas eu d'effet sur le succès reproducteur ni sur la morphologie des nouveau-nés. Au contraire, les nouveau-nés issus des mères privées d'eau ont présenté une croissance postnatale de leur taille corporelle supérieure à celle des nouveau-nés issus des femelles du groupe contrôle. Ce résultat pourrait s'expliquer par une mobilisation accrue des réserves maternelles acquises par ces nouveau-nés issus de femelles déshydratées et présentant des taux de corticostérone élevés (Dupoué et al., 2016). L'absence d'interactions entre le traitement maternel et le traitement post-natal subi au cours de la croissance suggère que cet effet transgénérationnel n'est pas "adaptatif" en anticipation des contraintes de l'environnement post-natal (Marshall et al., 2007; Uller et al., 2013).

Ces résultats ne soutiennent pas ma prédiction selon laquelle les effets négatifs des contraintes hydriques maternelles sur les embryons seraient plus forts en fin de gestation, alors que cette phase correspond au pic des besoins hydriques embryonnaires en lien avec la croissance somatique (Lourdais et al., 2017, 2015). Une explication possible est que les femelles gestantes maintiennent un transfert en eau assurant la croissance des embryons au détriment de leur statut physiologique propre (Dupoué et al., 2015a). Cependant, ces résultats invitent à examiner plus précisément la fonction des transferts d'eau maternelle au cours du développement embryonnaire et les mécanismes proximaux associés. Des études sur des reptiles ont clairement démontré les mécanismes physiologiques et cellulaires expliquant l'ampleur des effets thermiques sur le développement embryonnaire (Sanger et al., 2021), ainsi que leur dépendance au stade de développement (Lorioux et al., 2013b), mais les mécanismes conduisant à la mortalité embryonnaire ou à des effets transgénérationnels en lien avec les contraintes hydriques restent à élucider. Des études récentes ont par exemple fait l'hypothèse de mécanismes de résorption des follicules et d'avortement en réponse à des contraintes hydriques à des stades précoces de la gestation (Capehart et al., 2016; Zani & Stein, 2018). Une perspective de mes recherches est donc de préciser davantage la fenêtre de sensibilité hydrique pendant la gestation, et de déterminer les mécanismes d'ajustements maternels associés aux besoins hydriques embryons.

Par exemple, il a été démontré que la thermorégulation maternelle joue un rôle clef pour assurer des températures de développement optimales (Lorioux et al., 2013a, 2013b), et que les femelles gestantes sélectionnent des microclimats plus humides en lien avec leur sensibilité aux pertes hydriques (Lourdais et al., 2017). Cependant, il est encore nécessaire de clarifier les conflits potentiels entre les ajustements comportementaux et physiologiques face aux contraintes hydriques, et la thermorégulation maternelle pendant la gestation. En effet, un abaissement des températures corporelles maternelles en réponse à la déshydratation (Ladyman & Bradshaw, 2003) pourrait être en conflit avec les besoins thermiques du développement embryonnaire, mais être bénéfique pour le maintien de la balance hydrique maternelle et des transferts en eau vers les embryons. On peut faire l'hypothèses que la nature de ces conflits entre thermorégulation et hydrorégulation maternelle soit dépendante du stade de la gestation et des besoins embryonnaires associés (Lorioux et al., 2013b; Lourdais et al., 2017, 2015). Pour comprendre les interactions entre thermorégulation et hydrorégulation face aux contraintes hydriques pendant la gestation, des plans expérimentaux manipulant l'accès à l'eau à différentes périodes de la gestation (e.g. début vs. fin) et examinant les réponses

comportementales (ajustement des préférences thermiques et hygrométrique lors de la sélection de microclimat) et les conséquences sur la physiologie maternelle et le développement embryonnaire sont requis.

L'exposition à des contraintes hydriques (privation d'eau et air sec) durant les deux premières semaines de vie a quant à elle considérablement réduit la croissance de la taille corporelle (-40%) et la croissance des mâchoires des nouveau-nés (-70%). Ces effets marqués sont susceptibles de limiter les performances individuelles et notamment les premières prises alimentaires, ce qui pourrait à terme diminuer la valeur sélective des individus et potentiellement altérer leurs trajectoires développementales futures (Dupoué et al., 2016; Forsman, 1994; Forsman & Lindell, 1993; Lorigou et al., 2013). Mes résultats indiquent donc que les conditions hydriques de l'environnement postnatal sont critiques pour le développement des nouveau-nés à court terme. Les effets des contraintes hydriques sur le phénotype à long terme restent cependant à élucider. Par exemple, les résultats de l'[Article 1](#) démontrent une réponse développementale des pertes hydrique à l'exposition chronique à la température pendant la croissance. On peut faire l'hypothèse qu'une exposition aiguë à des contraintes hydriques pendant une fenêtre développementale même courte pourrait également induire des effets persistants (e.g. perméabilité cutanée ; Muñoz-Garcia et al., 2015; Muñoz-Garcia & Williams, 2008; Tu et al., 2002). Une perspective de mes recherches est donc de déterminer les réponses plastiques aux conditions hydriques pendant le développement postnatal, et de clarifier les conséquences associées pour la valeur sélective. Les effets des contraintes observés sur la croissance semblent négatifs à court et moyen terme, mais on peut faire l'hypothèse d'effets adaptatifs à long terme comme par exemple une plasticité développementale de réduction de la perméabilité cutanée en anticipation des contraintes hydriques de l'environnement de l'adulte (Muñoz-Garcia & Williams, 2008; Nettle & Bateson, 2015; Nijhout, 2003; Tracy & Walsberg, 2001).

Conclusion

Mes travaux de thèse contribuent à une meilleure compréhension de la vulnérabilité climatique des ectothermes et des mécanismes physiologiques et comportementaux en réponse aux contraintes thermiques et hydriques. Mes travaux renseignent sur les réponses physiologiques aux contraintes abiotiques à la fois sur le long terme (acclimatation physiologique au cours des années) et sur le court terme (sensibilité physiologique aux événements climatiques extrêmes). J'ai mis en évidence des liens étroits entre la régulation des balances thermiques et hydriques, notamment via des mécanismes proximaux partagés et des liens fonctionnels entre des traits physiologiques (e.g. co-variation entre métabolisme et pertes hydriques), et des effets additifs des contraintes thermiques et hydriques combinées sur la physiologie individuelle. Mes travaux démontrent également le potentiel du comportement d'hydrorégulation et de la sélection de microclimats à limiter les effets des événements extrêmes sur la physiologie. Enfin, mes résultats indiquent que les contraintes hydriques peuvent affecter la reproduction en altérant la physiologie maternelle et le succès reproducteur, et peuvent aussi limiter la croissance post-natale. L'ensemble de ces résultats indiquent que les conditions hydriques interagissent avec la balance thermique et le budget énergétique des individus. Ma thèse démontre ainsi l'importance d'intégrer la dimension hydrique de la physiologie et des ajustements comportementaux au sein des microclimats pour comprendre et prédire les réponses des ectothermes terrestres face au changement climatique. Une application directe de mes travaux en biologie de la conservation est de considérer l'hétérogénéité des micro-habitats et des conditions microclimatiques refuges face aux canicules et aux sécheresses.

Bibliographie

- Addo-Bediako, A., Chown, S.L., Gaston, K.J., 2002. Metabolic Cold Adaptation in Insects: A Large-Scale Perspective. *Funct. Ecol.* <https://doi.org/10.2307/826586>
- Addo-Bediako, A., Chown, S.L., Gaston, K.J., 2001. Revisiting water loss in insects: a large scale view. *J. Insect Physiol.* 47, 1377–1388. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00128-7)
- Agugliaro, J., Reinert, H.K., 2005. Comparative skin permeability of neonatal and adult timber rattlesnakes (*Crotalus horridus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 141, 70–75. <https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2005.04.002>
- Albright, T.P., Mutiibwa, D., Gerson, A.R., Smith, E.K., Talbot, W.A., O'Neill, J.J., McKechnie, A.E., Wolf, B.O., 2017. Mapping evaporative water loss in desert passerines reveals an expanding threat of lethal dehydration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 2283–2288. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613625114>
- Amorim, F., Mata, V.A., Beja, P., Rebelo, H., 2015. Effects of a drought episode on the reproductive success of European free-tailed bats (*Tadarida teniotis*). *Mamm. Biol.* 80, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.01.005>
- Anderson, R.C.O., Andrade, D. V., 2017. Trading heat and hops for water: Dehydration effects on locomotor performance, thermal limits, and thermoregulatory behavior of a terrestrial toad. *Ecol. Evol.* 7, 9066–9075. <https://doi.org/10.1002/ece3.3219>
- Angelier, F., Wingfield, J.C., 2013. Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: Theory, hypotheses and perspectives. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 118–128. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2013.05.022>
- Angilletta Jr., M.J., 2009. Thermal Adaptation. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570875.001.1>
- Araya-Donoso, R., San Juan, E., Tamburrino, Í., Lamborot, M., Veloso, C., Véliz, D., 2021. Integrating genetics, physiology and morphology to study desert adaptation in a lizard species. *J. Anim. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13546>
- Arnold, P.A., Delean, S., Cassey, P., White, C.R., 2021. Meta-analysis reveals that resting metabolic rate is not consistently related to fitness and performance in animals. *J. Comp. Physiol. B* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01358-w>
- Aubret, F., Bonnet, X., Shine, R., Lourdais, O., 2002. Fat Is Sexy for Females but Not Males: The Influence of Body Reserves on Reproduction in Snakes (*Vipera aspis*). *Horm. Behav.* 42, 135–147. <https://doi.org/10.1006/HBEH.2002.1793>
- Auer, S.K., Salin, K., Anderson, G.J., Metcalfe, N.B., 2016. Flexibility in metabolic rate and activity level determines individual variation in overwinter performance. *Oecologia* 182, 703–712. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3697-z>
- Bador, M., Terray, L., Boé, J., Somot, S., Alias, A., Gibelin, A.-L., Dubuisson, B., 2017. Future summer mega-heatwave and record-breaking temperatures in a warmer France climate. *Environ. Res. Lett.* 12, 074025. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/AA751C>
- Baeyens, D.A., Rountree, R.L., 1983. A comparative study of evaporative water loss and epidermal permeability in an arboreal snake, *Opheodrys aestivus*, and a semi-aquatic snake, *Nerodia rhombifera*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 76, 301–304. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90331-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90331-6)
- Balment, R.J., Lu, W., Weybourne, E., Warne, J.M., 2006. Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: A review with insights from mammalian models. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2005.12.022>
- Baškiera, S., Gvoždík, L., 2020. Repeatability and heritability of resting metabolic rate in a long-lived amphibian. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 253,

110858. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110858>
- Basson, C.H., Clusella-Trullas, S., 2015. The Behavior-Physiology Nexus: Behavioral and Physiological Compensation Are Relied on to Different Extents between Seasons. *Physiol. Biochem. Zool.* 88, 384–94. <https://doi.org/10.1086/682010>
- Bauwens, Claus, 2019a. Intermittent reproduction, mortality patterns and lifetime breeding frequency of females in a population of the adder (*Vipera berus*). *PeerJ* 7, e6912. <https://doi.org/10.7717/peerj.6912>
- Bauwens, Claus, 2019b. Do female northern vipers (*Vipera berus*) really stop feeding during pregnancy? *Herpetol. Bull.* 4–8.
- Beaman, J.E., White, C.R., Seebacher, F., 2016. Evolution of Plasticity: Mechanistic Link between Development and Reversible Acclimation. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.01.004>
- Beever, Erik A., Hall, L.E., Varner, J., Loosen, A.E., Dunham, J.B., Gahl, M.K., Smith, F.A., Lawler, J.J., 2017. Behavioral flexibility as a mechanism for coping with climate change. *Front. Ecol. Environ.* <https://doi.org/10.1002/fee.1502>
- Berg, W., Theisinger, O., Dausmann, K.H., 2017. Acclimatization patterns in tropical reptiles: uncoupling temperature and energetics. *Sci. Nat.* <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1506-0>
- Beukema, W., Pasmans, F., Van Praet, S., Ferri-Yáñez, F., Kelly, M., Laking, A.E., Erens, J., Speybroeck, J., Verheyen, K., Lens, L., Martel, A., 2021. Microclimate limits thermal behaviour favourable to disease control in a nocturnal amphibian. *Ecol. Lett.* 24, 27–37. <https://doi.org/10.1111/ELE.13616>
- Biro, P.A., Stamps, J.A., 2010. Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior? *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.08.003>
- Black, I.R.G., Berman, J.M., Cadena, V., Tattersall, G.J., 2019. Behavioral Thermoregulation in Lizards: Strategies for Achieving Preferred Temperature. *Behav. Lizards* 13–46. <https://doi.org/10.1201/9781498782739-2>
- Blouin-Demers, G., Weatherhead, P.J., 2001. Thermal ecology of black rat snakes (*Elaphe obsoleta*) in a thermally challenging environment. *Ecology* 82, 3025–3043. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[3025:TEOBRS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[3025:TEOBRS]2.0.CO;2)
- Bonamour, S., Chevin, L.M., Charmantier, A., Teplitsky, C., 2019. Phenotypic plasticity in response to climate change: The importance of cue variation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0178>
- Bonnet, X., Lourdais, O., Shine, R., Naulleau, G., 2002. Reproduction in a typical capital breeder: costs, currencies, and complications in the aspic viper. *Ecology* 83, 2124–2135. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[2124:RIATCB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[2124:RIATCB]2.0.CO;2)
- Bonnet, X., Naulleau, G., Lourdais, O., 1999. Growth in the asp viper (*Vipera aspis* L.): insights from long term field study. *Curr. Stud. Herpetol.*
- Boucek, R.E., Heithaus, M.R., Santos, R., Stevens, P., Rehage, J.S., 2017. Can animal habitat use patterns influence their vulnerability to extreme climate events? An estuarine sportfish case study. *Glob. Chang. Biol.* 23, 4045–4057. <https://doi.org/10.1111/GCB.13761>
- Bozinovic, F., Bastías, D.A., Boher, F., Clavijo-Baquet, S., Estay, S.A., Angilletta, M.J., 2011. The mean and variance of environmental temperature interact to determine physiological tolerance and fitness. *Physiol. Biochem. Zool.* 84, 543–552. <https://doi.org/10.1086/662551>
- Bozinovic, F., Catalán, T.P., Estay, S.A., Sabat, P., 2013. Acclimation to daily thermal variability drives the metabolic performance curve Effects of salinity on vertebrate physiology View project A Database of the Exotic Insects of Chile View project, Article

in Evolutionary Ecology Research.

- Bozinovic, F., Pörtner, H.O., 2015. Physiological ecology meets climate change. *Ecol. Evol.* 5, 1025–1030. <https://doi.org/10.1002/ECE3.1403>
- Brace, R.A., Cheung, C.Y., 2014. Regulation of amniotic fluid volume: Evolving concepts. *Adv. Exp. Med. Biol.* https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1_5
- Bradshaw, S.D., 1975. Osmoregulation and pituitary-adrenal function in desert reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 25, 230–248. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(75\)90194-X](https://doi.org/10.1016/0016-6480(75)90194-X)
- Brakefield, P.M., Pijpe, J., Zwaan, B.J., 2007. Developmental plasticity and acclimation both contribute to adaptive responses to alternating seasons of plenty and of stress in *Bicyclus* butterflies. *J. Biosci.* 32, 465–475. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0046-8>
- Brischoux, F., Beaugeard, E., Mohring, B., Parenteau, C., Angelier, F., 2020. Short-term dehydration influences baseline but not stress-induced corticosterone levels in the house sparrow (*Passer domesticus*). *J. Exp. Biol.* 223. <https://doi.org/10.1242/JEB.216424/267466/AM/SHORT-TERM-DEHYDRATION-INFLUENCES-BASELINE-BUT-NOT>
- Brown, G.P., Shine, R., 2004. MATERNAL NEST-SITE CHOICE AND OFFSPRING FITNESS IN A TROPICAL SNAKE (*TROPIDONOPHIS MAIRII*, COLUBRIDAE). *Ecology* 85, 1627–1634. <https://doi.org/10.1890/03-0107>
- Brusch, G.A., DeNardo, D.F., 2019. Egg desiccation leads to dehydration and enhanced innate immunity in python embryos. *Dev. Comp. Immunol.* 90, 147–151. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2018.09.013>
- Brusch, G.A., DeNardo, D.F., 2017. When less means more: dehydration improves innate immunity in rattlesnakes. *J. Exp. Biol.* 220, 2287–2295. <https://doi.org/10.1242/jeb.155028>
- Brusch, G.A., DeNardo, D.F., Lourdais, O., 2020a. Reproductive state and water deprivation increase plasma corticosterone in a capital breeder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 288, 113375. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2019.113375>
- Brusch, G.A., Gavira, R.S.B., Viton, R., Dupoué, A., Leroux-Coyau, M., Meylan, S., Le Galliard, J.F., Lourdais, O., 2020b. Additive effects of temperature and water availability on pregnancy in a viviparous lizard. *J. Exp. Biol.* 223. <https://doi.org/10.1242/jeb.228064>
- Brusch, G.A., Heulin, B., DeNardo, D.F., 2019. Dehydration during egg production alters egg composition and yolk immune function. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 227, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.006>
- Brusch, G.A., Lourdais, O., Kaminsky, B., DeNardo, D., 2018. Muscles provide an internal water reserve for reproduction. *Proceedings. Biol. Sci.* 285. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2018.0752>
- Bruton, M.J., Cramp, R.L., Franklin, C.E., 2012. Benefits of thermal acclimation in a tropical aquatic ectotherm, the Arafura filesnake, *Acrochordus arafurae*. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 541–551. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0643-6>
- Buchholz, R., Banusiewicz, J.D., Burgess, S., Crocker-Buta, S., Eveland, L., Fuller, L., 2019. Behavioural research priorities for the study of animal response to climate change. *Anim. Behav.* 150, 127–137. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2019.02.005>
- Buckley, L.B., Huey, R.B., 2016. Temperature extremes: geographic patterns, recent changes, and implications for organismal vulnerabilities. *Glob. Chang. Biol.* 22, 3829–3842. <https://doi.org/10.1111/GCB.13313>
- Bulova, S.J., 2002. How temperature, humidity, and burrow selection affect evaporative water loss in desert tortoises. *J. Therm. Biol.* 27, 175–189. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(01\)00079-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(01)00079-1)
- Burraco, P., Orizaola, G., Monaghan, P., Metcalfe, N.B., 2020a. Climate change and ageing

- in ectotherms. *Glob. Chang. Biol.* 26, 5371–5381. <https://doi.org/10.1111/gcb.15305>
- Capehart, G.D., Escallón, C., Vernasco, B.J., Moore, I.T., Taylor, E.N., 2016. No drought about it: Effects of supplemental hydration on the ecology, behavior, and physiology of free-ranging rattlesnakes. *J. Arid Environ.* 134, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2016.06.018>
- CaraDonna, P.J., Cunningham, J.L., Iler, A.M., 2018. Experimental warming in the field delays phenology and reduces body mass, fat content and survival: Implications for the persistence of a pollinator under climate change. *Funct. Ecol.* 32, 2345–2356. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13151>
- Careau, V., Beauchamp, P.P., Bouchard, S., Morand-Ferron, J., 2019. Energy metabolism and personality in wild-caught fall field crickets. *Physiol. Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.023>
- Careau, V., Buttemer, W.A., Buchanan, K.L., 2014a. Early-Developmental Stress, Repeatability, and Canalization in a Suite of Physiological and Behavioral Traits in Female Zebra Finches. *Integr. Comp. Biol.* <https://doi.org/10.2307/26369752>
- Careau, V., Gifford, M.E., Biro, P.A., 2014b. Individual (co)variation in thermal reaction norms of standard and maximal metabolic rates in wild-caught slimy salamanders. *Funct. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12259>
- Careau, V., Thomas, D., Humphries, M.M., Réale, D., 2008. Energy metabolism and animal personality. *Oikos.* <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2008.16513.x>
- Chaplin, M., 2006. Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006 711 7, 861–866. <https://doi.org/10.1038/nrm2021>
- Chapman, S., Mustin, K., Renwick, A.R., Segan, D.B., Hole, D.G., Pearson, R.G., Watson, J.E.M., 2014. Publishing trends on climate change vulnerability in the conservation literature reveal a predominant focus on direct impacts and long time-scales. *Divers. Distrib.* 20, 1221–1228. <https://doi.org/10.1111/DDI.12234>
- Chen, Y., Moufouma-Okia, W., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pirani, A., 2018. Recent Progress and Emerging Topics on Weather and Climate Extremes Since the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102017-030052> 43, 35–59. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENVIRON-102017-030052>
- Chevront, S.N., Kenefick, R.W., 2014. Dehydration: Physiology, Assessment, and Performance Effects. *Compr. Physiol.* 4, 257–285. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C130017>
- Chevin, L.-M., Lande, R., Mace, G.M., 2010. Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLoS Biol.* 8, e1000357. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000357>
- Choi, F., Gouhier, T., Lima, F., Rilov, G., Seabra, R., Helmuth, B., 2019. Mapping physiology: biophysical mechanisms define scales of climate change impacts. *Conserv. Physiol.* 7. <https://doi.org/10.1093/CONPHYS/COZ028>
- Chown, S.L., Gaston, K.J., 2016. Macrophysiology – progress and prospects. *Funct. Ecol.* 30, 330–344. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12510>
- Chown, S.L., Sørensen, J.G., Terblanche, J.S., 2011. Water loss in insects: An environmental change perspective. *J. Insect Physiol.* 57, 1070–1084. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2011.05.004>
- Chung, D.J., Bryant, H.J., Schulte, P.M., 2017. Thermal acclimation and subspecies-specific effects on heart and brain mitochondrial performance in a eurythermal teleost (*Fundulus heteroclitus*). *J. Exp. Biol.* 220, 1459–1471. <https://doi.org/10.1242/jeb.151217>
- Clarke, A., 2006. Temperature and the metabolic theory of ecology. *Funct. Ecol.* 20, 405–412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01109.x>

- Clarke, A., Pörtner, H.O., 2010. Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. *Biol. Rev.* 85, 703–727. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2010.00122.X>
- Claunch, N.M., Frazier, J.A., Escallón, C., Vernasco, B.J., Moore, I.T., Taylor, E.N., 2017. Physiological and behavioral effects of exogenous corticosterone in a free-ranging ectotherm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 248, 87–96. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2017.02.008>
- Coe, S.J., Rotenberry, J.T., 2003. WATER AVAILABILITY AFFECTS CLUTCH SIZE IN A DESERT SPARROW. *Ecology* 84, 3240–3249. <https://doi.org/10.1890/02-0789>
- Colinet, H., Hoffmann, A.A., 2012. Comparing phenotypic effects and molecular correlates of developmental, gradual and rapid cold acclimation responses in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* 26, 84–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01898.x>
- Colinet, H., Sinclair, B.J., Vernon, P., Renault, D., 2015. Insects in Fluctuating Thermal Environments. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 123–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021017>
- Cook, B.I., Smerdon, J.E., Seager, R., Coats, S., 2014. Global warming and 21st century drying. *Clim. Dyn.* 43, 2607–2627. <https://doi.org/10.1007/s00382-014-2075-y>
- Costantini, D., 2019. Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. *J. Exp. Biol.* 222. <https://doi.org/10.1242/JEB.194688>
- Costantini, D., 2016. Oxidative stress ecology and the d-ROMs test: facts, misfacts and an appraisal of a decade's work. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70, 809–820. <https://doi.org/10.1007/s00265-016-2091-5>
- Costantini, D., 2011a. On the measurement of circulating antioxidant capacity and the nightmare of uric acid. *Methods Ecol. Evol.* 2, 321–325. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00080.x>
- Costantini, D., 2011b. On the measurement of circulating antioxidant capacity and the nightmare of uric acid. *Methods Ecol. Evol.* 2, 321–325. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00080.x>
- Costantini, D., 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecol. Lett.* 11, 1238–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01246.x>
- Costantini, D., Marasco, V., Møller, A., 2011. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J. Comp. Physiol. B.* 181, 447–456. <https://doi.org/10.1007/S00360-011-0566-2>
- Costantini, D., Metcalfe, N.B., Monaghan, P., 2010. Ecological processes in a hormetic framework. *Ecol. Lett.* 13, 1435–1447. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2010.01531.X>
- Cox, C.L., Cox, R.M., 2015. Evolutionary shifts in habitat aridity predict evaporative water loss across squamate reptiles. *Evolution (N. Y.)* 69, 2507–2516. <https://doi.org/10.1111/evo.12742>
- Crespi, B., Semeniuk, C., 2004. Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate reproductive mode. *Am. Nat.* 163, 635–53. <https://doi.org/10.1086/382734>
- Cruz-McDonnell, K.K., Wolf, B.O., 2016. Rapid warming and drought negatively impact population size and reproductive dynamics of an avian predator in the arid southwest. *Glob. Chang. Biol.* 22, 237–253. <https://doi.org/10.1111/gcb.13092>
- da Silva, C.R.B., Riginos, C., Wilson, R.S., 2019. An intertidal fish shows thermal acclimation despite living in a rapidly fluctuating environment. *J. Comp. Physiol. B* 2019 1893 189, 385–398. <https://doi.org/10.1007/S00360-019-01212-0>
- Dai, A., 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nat. Clim. Chang.* 3, 52–58. <https://doi.org/10.1038/nclimate1633>
- Dai, A., 2011. Drought under global warming: a review. *Wiley Interdiscip. Rev. Clim. Chang.*

- 2, 45–65. <https://doi.org/10.1002/wcc.81>
- Davis, J.R., Denardo, D.F., 2010. Seasonal Patterns of Body Condition, Hydration State, and Activity of Gila Monsters (*Heloderma suspectum*) at a Sonoran Desert Site. <https://doi.org/10.1670/08-263.1> 44, 83–93. <https://doi.org/10.1670/08-263.1>
- Davis, J.R., DeNardo, D.F., 2007. The urinary bladder as a physiological reservoir that moderates dehydration in a large desert lizard, the Gila monster *Heloderma suspectum*. *J. Exp. Biol.* 210, 1472–1480. <https://doi.org/10.1242/JEB.003061>
- Davy, R., Esau, I., Chernokulsky, A., Outten, S., Zilitinkevich, S., 2017. Diurnal asymmetry to the observed global warming. *Int. J. Climatol.* 37, 79–93. <https://doi.org/10.1002/joc.4688>
- Dawson, W.R., 1982. Evaporative losses of water by birds. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 71, 495–509. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90198-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90198-0)
- de Bruijn, R., Romero, L.M., 2018. The role of glucocorticoids in the vertebrate response to weather. *Gen. Comp. Endocrinol.* 269, 11–32. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2018.07.007>
- De Kloet, E.R., Van Acker, S.A.B.E., Sibug, R.M., Oitzl, M.S., Meijer, O.C., Rahmouni, K., De Jong, W., 2000. Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int.* 57, 1329–1336. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1755.2000.00971.X>
- Degen, A.A., Khokhlova, I.S., Kam, M., Snider, I., 2004. Water budget during reproduction in female common spiny mice (*Acomys cahirinus*). *J. Mammal.* 85, 1106–1110. <https://doi.org/10.1644/BRG-211.1>
- del Cacho, M., Peñuelas, J., Lloret, F., 2013. Reproductive output in Mediterranean shrubs under climate change experimentally induced by drought and warming. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 15, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2013.07.001>
- Dezetter, M., Dupoué, A., Galliard, J.-F. Le, Lourdais, O., 2021a. Additive effects of developmental acclimation and physiological syndromes on lifetime metabolic and water loss rates of a dry-skinned ectotherm. *Funct. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13951>
- Dezetter, M., Dupoué, A., Le Galliard, J.-F., Lourdais, O., 2021b. Data from: Additive effects of developmental acclimation and physiological syndromes on lifetime metabolic and water loss rates of a dry-skinned ectotherm. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5561142>
- Dezetter, M., Le Galliard, J.F., Guiller, G., Guillon, M., Leroux-Coyau, M., Meylan, S., Brischoux, F., Angelier, F., Lourdais, O., 2021c. Water deprivation compromises maternal physiology and reproductive success in a cold and wet adapted snake *Vipera berus*. *Conserv. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.1093/CONPHYS/COAB071>
- Dirzo, R., Young, H.S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N.J.B., Collen, B., 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science* (80-.). 345, 401–406. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1251817/SUPPL_FILE/DIRZO-SM.PDF
- Drake, M.J., Miller, N.A., Todgham, A.E., 2017. The role of stochastic thermal environments in modulating the thermal physiology of an intertidal limpet, *Lottia digitalis*. *J. Exp. Biol.* 220, 3072–3083. <https://doi.org/10.1242/jeb.159020>
- DuBose, T.P., Atkinson, C.L., Vaughn, C.C., Golladay, S.W., 2019. Drought-Induced, Punctuated Loss of Freshwater Mussels Alters Ecosystem Function Across Temporal Scales. *Front. Ecol. Evol.* 7, 274. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00274>
- Dundas, S.J., Ruthrof, K.X., Hardy, G.E.S.J., Fleming, P.A., 2021. Some like it hot: Drought-induced forest die-off influences reptile assemblages. *Acta Oecologica* 111, 103714. <https://doi.org/10.1016/J.ACTAO.2021.103714>
- Dupont, S.M., Grace, J.K., Lourdais, O., Brischoux, F., Angelier, F., 2019. Slowing down the metabolic engine: Impact of early-life corticosterone exposure on adult metabolism in house sparrows (*Passer domesticus*). *J. Exp. Biol.* 222.

- <https://doi.org/10.1242/jeb.211771>
- Dupoué, A., Angelier, F., Brischoux, F., DeNardo, D.F., Trouvé, C., Parenteau, C., Lourdais, O., 2016. Water deprivation increases maternal corticosterone levels and enhances offspring growth in the snake *Vipera aspis*. *J. Exp. Biol.* 219, 658–67. <https://doi.org/10.1242/jeb.132639>
- Dupoué, A., Angelier, F., Lourdais, O., Bonnet, X., Brischoux, F., 2014. Effect of water deprivation on baseline and stress-induced corticosterone levels in the Children’s python (*Antaresia childreni*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 168, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.001>
- Dupoué, A., Angelier, F., Ribout, C., Meylan, S., Rozen-Rechels, D., Decencièrre, B., Agostini, S., Le Galliard, J.F., 2020a. Chronic water restriction triggers sex-specific oxidative stress and telomere shortening in lizards. *Biol. Lett.* 16. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0889>
- Dupoué, A., Brischoux, F., Angelier, F., Denardo, D.F., Wright, C.D., Lourdais, O., 2015a. Intergenerational trade-off for water may induce a mother-offspring conflict in favour of embryos in a viviparous snake. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12349>
- 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. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2108>
- Dupoué, A., Brischoux, F., Lourdais, O., Angelier, F., 2013. Influence of temperature on the corticosterone stress–response: An experiment in the Children’s python (*Antaresia childreni*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 193, 178–184. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2013.08.004>
- Dupoué, A., Le Galliard, J.F., Josserand, R., DeNardo, D.F., Decencièrre, B., Agostini, S., Haussy, C., Meylan, S., 2018. Water restriction causes an intergenerational trade-off and delayed mother–offspring conflict in a viviparous lizard. *Funct. Ecol.* 32, 676–686. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13009>
- Dupoué, A., Lourdais, O., 2014. Relative reproductive effort drives metabolic changes and maternal emaciation during pregnancy in a viviparous snake. *J. Zool.* 293, 49–56. <https://doi.org/10.1111/jzo.12116>
- Dupoué, A., Lourdais, O., Meylan, S., Brischoux, F., Angelier, F., Rozen-Rechels, D., Marcangeli, Y., Decencièrre, B., Agostini, S., Le Galliard, J.F., 2019. Some like it dry: Water restriction overrides heterogametic sex determination in two reptiles. *Ecol. Evol.* 9, 6524–6533. <https://doi.org/10.1002/ece3.5229>
- Dupoué, A., Rutschmann, A., Le Galliard, J.F., Clobert, J., Blaimont, P., Sinervo, B., Miles, D.B., Haussy, C., Meylan, S., 2018c. Reduction in baseline corticosterone secretion correlates with climate warming and drying across wild lizard populations. *J. Anim. Ecol.* 87, 1331–1341. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12843>
- Dupoué, A., Sorlin, M., Richard, M., Le Galliard, J.F., Lourdais, O., Clobert, J., Aubret, F., 2020b. Mother-offspring conflict for water and its mitigation in the oviparous form of the reproductively bimodal lizard, *Zootoca vivipara*. *Biol. J. Linn. Soc.* 129, 888–900. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa012>
- Dupoué, A., Sorlin, M., Richard, M., Le Galliard, J.F., Lourdais, O., Clobert, J., Aubret, F., 2020c. Mother-offspring conflict for water and its mitigation in the oviparous form of the reproductively bimodal lizard, *Zootoca vivipara*. *Biol. J. Linn. Soc.* 129, 888–900. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa012>
- Dupoué, A., Stahlschmidt, Z.R., Michaud, B., Lourdais, O., 2015b. Physiological state influences evaporative water loss and microclimate preference in the snake *Vipera aspis*. *Physiol. Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.042>
- DuRant, S.E., Hopkins, W.A., Hepp, G.R., Romero, L.M., 2013. Energetic constraints and

- parental care: Is corticosterone indicative of energetic costs of incubation in a precocial bird? *Horm. Behav.* 63, 385–391. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2012.12.001>
- DuRant, S.E., Romero, L.M., Talent, L.G., Hopkins, W.A., 2008. Effect of exogenous corticosterone on respiration in a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 126–133. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2007.12.004>
- Edwards, M., Sheehy, C.M., Fedler, M.T., Lillywhite, H.B., 2021. Thirst and drinking in North American watersnakes (*Nerodia* spp.). *J. Exp. Biol.* 224. <https://doi.org/10.1242/JEB.241414>
- Einum, S., Ratikainen, I., Wright, J., Pélabon, C., Bech, C., Jutfelt, F., Stawski, C., Burton, T., 2019. How to quantify thermal acclimation capacity? *Glob. Chang. Biol.* 25, 1893–1894. <https://doi.org/10.1111/gcb.14598>
- Enriquez-Urzelai, U., Tingley, R., Kearney, M.R., Sacco, M., Palacio, A.S., Tejedo, M., Nicieza, A.G., 2020. The roles of acclimation and behaviour in buffering climate change impacts along elevational gradients. *J. Anim. Ecol.* 89, 1722–1734. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13222>
- Fangue, N.A., Richards, J.G., Schulte, P.M., 2009. Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *J. Exp. Biol.* 212, 514–522. <https://doi.org/10.1242/JEB.024034>
- Farallo, V.R., Muñoz, M.M., Uyeda, J.C., Miles, D.B., 2020. Scaling between macro- to microscale climatic data reveals strong phylogenetic inertia in niche evolution in plethodontid salamanders. *Evolution* (N. Y.) 74, 979–991. <https://doi.org/10.1111/EVO.13959>
- Fenollosa, E., Munné-Bosch, S., 2019. Physiological Plasticity of Plants Facing Climate Change. *Annu. Plant Rev. Online* 2, 837–866. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.APR0686>
- Forget-Klein, É., Green, D.M., 2021. Toads use the subsurface thermal gradient for temperature regulation underground. *J. Therm. Biol.* 99. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2021.102956>
- Forsman, A., 1994. Growth rate and survival in relation to relative head size in *Vipera berus*. *J. Herpetol.* 28, 231–238. <https://doi.org/10.2307/1564625>
- FORSMAN, A., 1991. Adaptive variation in head size in *Vipera berus* L. populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 43, 281–296. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8312.1991.TB00600.X>
- Forsman, A., Lindell, L.E., 1993. The Advantage of a Big Head: Swallowing Performance in Adders, *Vipera berus*. *Funct. Ecol.* 7, 183. <https://doi.org/10.2307/2389885>
- Forsman, A., Shine, R., 1997. Rejection of non-adaptive hypotheses for intraspecific variation in trophic morphology in gape-limited predators. *Biol. J. Linn. Soc.* 62, 209–223. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8312.1997.TB01623.X>
- Foucart, T., Heulin, B., Lourdais, O., 2018. Small changes, big benefits: testing the significance of maternal thermoregulation in a lizard with extended egg retention. *Biol. J. Linn. Soc.* 125, 280–291. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly105>
- Fuller, A., Dawson, T.J., Helmuth, B., Hetem, R.S., Mitchell, D., Maloney, S.K., 2010. Physiological mechanisms in coping with climate change. *Physiol. Biochem. Zool.* 83, 713–720.
- Fuller, A., Mitchell, D., Maloney, S.K., Hetem, R.S., Fonsêca, V.F.C., Meyer, L.C.R., van de Ven, T.M.F.N., Snelling, E.P., 2021. How dryland mammals will respond to climate change: the effects of body size, heat load and a lack of food and water. *J. Exp. Biol.* 224. <https://doi.org/10.1242/JEB.238113>
- Furness, A.I., Morrison, K.R., Orr, T.J., Arendt, J.D., Reznick, D.N., 2015. Reproductive mode and the shifting arenas of evolutionary conflict. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1360, 75–100. <https://doi.org/10.1111/nyas.12835>

- Füssel, H.M., Klein, R.J.T., 2006. Climate Change Vulnerability Assessments: An Evolution of Conceptual Thinking. *Clim. Chang.* 2006 753 75, 301–329. <https://doi.org/10.1007/S10584-006-0329-3>
- Gardner, E., 2019. Make the Adder Count: population trends from a citizen science survey of UK adders. *Herpetol. J.* 57–70. <https://doi.org/10.33256/hj29.1.5770>
- Gerken, A.R., Eller, O.C., Hahn, D.A., Morgan, T.J., 2015. Constraints, independence, and evolution of thermal plasticity: Probing genetic architecture of long- and short-term thermal acclimation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1503456112>
- Gleed-Owen, C., Langham, S., 2012. The Adder Status Project—a conservation condition assessment of the adder (*Vipera berus*) in England, with recommendations for future monitoring and. Rep. to Amphib. Reptil. Conserv. ARC, Bournemouth, UK.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Beedle, A.S., 2007. Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *Am. J. Hum. Biol.* 19, 1–19. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20590>
- Gorissen, S., Greenlees, M., Shine, R., 2017. A skink out of water: Impacts of anthropogenic disturbance on an Endangered reptile in Australian highland swamps. *ORYX* 51, 610–618. <https://doi.org/10.1017/S0030605316000442>
- Goulet, C.T., Michelangeli, M., Chung, M., Riley, J.L., Wong, B.B.M., Thompson, M.B., Chapple, D.G., 2018. Evaluating cognition and thermal physiology as components of the pace-of-life syndrome. *Evol. Ecol.* 2018 325 32, 469–488. <https://doi.org/10.1007/S10682-018-9948-1>
- Goulet, C.T., Thompson, M.B., Chapple, D.G., 2017a. Repeatability and correlation of physiological traits: Do ectotherms have a “thermal type”? *Ecol. Evol.* 7, 710–719. <https://doi.org/10.1002/ece3.2632>
- Goulet, C.T., Thompson, M.B., Michelangeli, M., Wong, B.B.M., Chapple, D.G., 2017b. Thermal physiology: A new dimension of the pace-of-life syndrome. *J. Anim. Ecol.* 86, 1269–1280. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12718>
- Greenberg, D.A., Palen, W.J., 2021. Hydrothermal physiology and climate vulnerability in amphibians. *Proc. R. Soc. B* 288. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2020.2273>
- Guillon, M., Guiller, G., DeNardo, D., Lourdais, O., 2014. Microclimate preferences correlate with contrasted evaporative water loss in parapatric vipers at their contact zone. *Can. J. Zool.* 92, 81–86. <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0189>
- Gunderson, A.R., Armstrong, E.J., Stillman, J.H., 2016. Multiple Stressors in a Changing World: The Need for an Improved Perspective on Physiological Responses to the Dynamic Marine Environment. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033953> 8, 357–378. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MARINE-122414-033953>
- Gunderson, A.R., Dillon, M.E., Stillman, J.H., 2017. Estimating the benefits of plasticity in ectotherm heat tolerance under natural thermal variability. *Funct. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12874>
- Gunderson, A.R., Stillman, J.H., 2015. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0401>
- Gvoždík, L., 2011. To heat or to save time? Thermoregulation in the lizard *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) in different thermal environments along an altitudinal gradient. <https://doi.org/10.1139/z02-015> 80, 479–492. <https://doi.org/10.1139/Z02-015>
- Hadfield, J., 2009. MCMC Methods for Multi-response Generalized Linear Mixed Models. The MCMCglmm R Package.
- Hall, L.E., Chalfoun, A.D., Beever, E.A., Loosen, A.E., 2016. Microrefuges and the occurrence of thermal specialists: implications for wildlife persistence amidst changing temperatures. *Clim. Chang. Responses* 2016 31 3, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40665->

- Hao, Z., Phillips, T.J., Hao, F., Wu, X., 2019. Changes in the dependence between global precipitation and temperature from observations and model simulations. *Int. J. Climatol.* 39, 4895–4906. <https://doi.org/10.1002/JOC.6111>
- Harris, R.M.B., Beaumont, L.J., Vance, T.R., Tozer, C.R., Remenyi, T.A., Perkins-Kirkpatrick, S.E., Mitchell, P.J., Nicotra, A.B., McGregor, S., Andrew, N.R., Letnic, M., Kearney, M.R., Wernberg, T., Hutley, L.B., Chambers, L.E., Fletcher, M.S., Keatley, M.R., Woodward, C.A., Williamson, G., Duke, N.C., Bowman, D.M.J.S., 2018. Biological responses to the press and pulse of climate trends and extreme events. *Nat. Clim. Chang.* 2018 87 8, 579–587. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0187-9>
- Havird, J.C., Neuwald, J.L., Shah, A.A., Mauro, A., Marshall, C.A., Ghalambor, C.K., 2020. Distinguishing between active plasticity due to thermal acclimation and passive plasticity due to Q10 effects: Why methodology matters. *Funct. Ecol.* 34, 1015–1028. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13534>
- Hazeleger, W., Van Den Hurk, B.J.J.M., Min, E., Van Oldenborgh, G.J., Petersen, A.C., Stainforth, D.A., Vasileiadou, E., Smith, L.A., 2015. Tales of future weather. *Nat. Clim. Chang.* 2015 52 5, 107–113. <https://doi.org/10.1038/nclimate2450>
- Healy, T.M., Bock, A.K., Burton, R.S., 2019. Variation in developmental temperature alters adulthood plasticity of thermal tolerance in *Tigriopus californicus*. *J. Exp. Biol.* 222. <https://doi.org/10.1242/JEB.213405>
- Healy, T.M., Tymchuk, W.E., Osborne, E.J., Schulte, P.M., 2010. Heat shock response of killifish (*Fundulus heteroclitus*): Candidate gene and heterologous microarray approaches. *Physiol. Genomics* 41, 171–184. https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00209.2009/SUPPL_FILE/TABLES1.PDF
- Herczeg, G., Gonda, A., Perälä, J., Saarikivi, J., Tuomola, A., Merilä, J., 2007. Ontogenetic differences in the preferred body temperature of the European adder *Vipera berus*. *Herpetol. J.* 17, 58–61.
- Herrando-Pérez, S., Belliure, J., Ferri-Yáñez, F., van den Burg, M.P., Beukema, W., Araújo, M.B., Terblanche, J.S., Vieites, D.R., 2020. Water deprivation drives intraspecific variability in lizard heat tolerance. *Basic Appl. Ecol.* 48, 37–51. <https://doi.org/10.1016/J.BAAE.2020.08.001>
- Hertz, P.E., Arce-Hernandez, A., Ramirez-Vazquez, J., Tirado-Rivera, W., Vazquez-Vives, L., 1979. Geographical variation of heat sensitivity and water loss rates in the tropical lizard, *Anolis gundlachi*. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 62, 947–953. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(79\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(79)90033-1)
- Hewitt, J.E., Ellis, J.I., Thrush, S.F., 2016. Multiple stressors, nonlinear effects and the implications of climate change impacts on marine coastal ecosystems. *Glob. Chang. Biol.* 22, 2665–2675. <https://doi.org/10.1111/GCB.13176>
- Hickling, R., Roy, D.B., Hill, J.K., Thomas, C.D., 2005. A northward shift of range margins in British Odonata. *Glob. Chang. Biol.* 11, 502–506. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.00904.x>
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution* - Peter W. Hochachka, George N. Somero - Google Livres.
- Holden, K.G., Hedrick, A.R., Gangloff, E.J., Steven, |, Hall, J., Bronikowski, A.M., 2021. Temperature-dependence of metabolism and fuel selection from cells to whole organisms. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/JEZ.2564>
- Hope, S.F., DuRant, S.E., Hallagan, J.J., Beck, M.L., Kennamer, R.A., Hopkins, W.A., 2021. Incubation temperature as a constraint on clutch size evolution. *Funct. Ecol.* 35, 909–919. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13764/SUPPINFO>

- Horowitz, M., 2001. Heat acclimation: phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms. *J. Therm. Biol.* 26, 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(01\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(01)00044-4)
- Huang, S.P., Kearley, R.E., Hung, K.W., Porter, W.P., 2020. Evaporative water loss simulation improves models' prediction of habitat suitability for a high-elevation forest skink. *Oecologia* 2020 1923 192, 657–669. <https://doi.org/10.1007/S00442-020-04597-W>
- Hubert, J., Dufaure, J., 1968. Table de développement de la vipère aspic: *Vipera aspis* L. *Bull. la Société Zool. Fr.* 93, 135–148.
- Huey, R.B., Hertz, P.E., Sinervo, B., 2015. Behavioral Drive versus Behavioral Inertia in Evolution: A Null Model Approach. <https://doi.org/10.1086/346135> 161, 357–366. <https://doi.org/10.1086/346135>
- Huey, R.B., Kearney, M.R., Krockenberger, A., Holtum, J.A.M., Jess, M., Williams, S.E., 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 1665–1679. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2012.0005>
- Huey, R.B., Tewksbury, J.J., 2009. Can behavior douse the fire of climate warming? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3647–3648. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0900934106>
- Jara, M., García-Roa, R., Escobar, L.E., Torres-Carvajal, O., Pincheira-Donoso, D., 2019. Alternative reproductive adaptations predict asymmetric responses to climate change in lizards. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41670-8>
- Jessop, T.S., Lane, M.L., Teasdale, L., Stuart-Fox, D., Wilson, R.S., Careau, V., Moore, I.T., 2016. Multiscale Evaluation of Thermal Dependence in the Glucocorticoid Response of Vertebrates. <https://doi.org/10.1086/687588> 188, 342–356. <https://doi.org/10.1086/687588>
- Jimeno, B., Hau, M., Verhulst, S., 2018. Corticosterone levels reflect variation in metabolic rate, independent of 'stress.' *Sci. Reports* 2018 81 8, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31258-z>
- Jones, K.R., Watson, J.E.M., Possingham, H.P., Klein, C.J., 2016. Incorporating climate change into spatial conservation prioritisation: A review. *Biol. Conserv.* 194, 121–130. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2015.12.008>
- Jørgensen, C.B., 1998. Role of urinary and cloacal bladders in chelonian water economy: historical and comparative perspectives. *Biol. Rev.* 73, 347–366. <https://doi.org/10.1017/S0006323198005210>
- Kattan, G.H., Lillywhite, H.B., 1989. Humidity acclimation and skin permeability in the lizard *Anolis carolinensis*. *Physiol. Zool.* 62, 593–606. <https://doi.org/10.1086/physzool.62.2.30156187>
- Kearney, M., Porter, W.P., 2004. MAPPING THE FUNDAMENTAL NICHE: PHYSIOLOGY, CLIMATE, AND THE DISTRIBUTION OF A NOCTURNAL LIZARD. *Ecology* 85, 3119–3131. <https://doi.org/10.1890/03-0820>
- Kearney, M., Shine, R., Porter, W.P., 2009. The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3835–3840. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0808913106>
- Kearney, M.R., Isaac, A.P., Porter, W.P., 2014. microclim: Global estimates of hourly microclimate based on long-term monthly climate averages. *Sci. Data* 2014 11 1, 1–9. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.6>
- Kearney, M.R., Munns, S.L., Moore, D., Malishev, M., Bull, C.M., 2018. Field tests of a general ectotherm niche model show how water can limit lizard activity and distribution. *Ecol. Monogr.* 88, 672–693. <https://doi.org/10.1002/ECM.1326>
- Kern, P., Cramp, R.L., Franklin, C.E., 2015. Physiological responses of ectotherms to daily

- temperature variation. *J. Exp. Biol.* 218, 3068–3076. <https://doi.org/10.1242/jeb.123166>
- Kerr, G.D., Bull, C.M., 2006. Exclusive core areas in overlapping ranges of the sleepy lizard, *Tiliqua rugosa*. *Behav. Ecol.* 17, 380–391. <https://doi.org/10.1093/BEHECO/ARJ041>
- Khaliq, I., Böhning-Gaese, K., Prinzing, R., Pfenninger, M., Hof, C., 2017. The influence of thermal tolerances on geographical ranges of endotherms. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 26, 650–668. <https://doi.org/10.1111/GEB.12575>
- Khaliq, I., Hof, C., Prinzing, R., Böhning-Gaese, K., Pfenninger, M., 2014. Global variation in thermal tolerances and vulnerability of endotherms to climate change. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2014.1097>
- Kingsolver, J.G., 2015. The Well-Tempered Biologist. <https://doi.org/10.1086/648310> 174, 755–768. <https://doi.org/10.1086/648310>
- Kingsolver, J.G., Buckley, L.B., 2017. Quantifying thermal extremes and biological variation to predict evolutionary responses to changing climate. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2016.0147>
- Kingsolver, J.G., Diamond, S.E., Buckley, L.B., 2013. Heat stress and the fitness consequences of climate change for terrestrial ectotherms. *Funct. Ecol.* 27, 1415–1423. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12145>
- Kingsolver, J.G., Huey, R.B., 2008. Size, temperature, and fitness: three rules, *Evolutionary Ecology Research*. Evolutionary Ecology, Ltd.
- Kingsolver, J.G., Malinski, K.H., Parker, A.L., 2021. Connecting extreme climatic events to changes in ecological interactions. *Funct. Ecol.* 35, 1382–1384. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13820>
- Kitaysky, A.S., Wingfield, J.C., Piatt, J.F., 2001. Corticosterone facilitates begging and affects resource allocation in the black-legged kittiwake. *Behav. Ecol.* 12, 619–625. <https://doi.org/10.1093/BEHECO/12.5.619>
- Kobayashi, D., Mautz, W.J., Nagy, K.A., 1983. Evaporative Water Loss: Humidity Acclimation in *Anolis carolinensis* Lizards. *Copeia* 1983, 701. <https://doi.org/10.2307/1444335>
- Koch, R.E., Buchanan, K.L., Casagrande, S., Crino, O., Dowling, D.K., Hill, G.E., Hood, W.R., McKenzie, M., Mariette, M.M., Noble, D.W.A., Pavlova, A., Seebacher, F., Sunnucks, P., Udino, E., White, C.R., Salin, K., Stier, A., 2021. Integrating Mitochondrial Aerobic Metabolism into Ecology and Evolution. *Trends Ecol. Evol.* 36, 321–332. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2020.12.006>
- Kölliker, M., Boos, S., Wong, J.W.Y., Röllin, L., Stucki, D., Raveh, S., Wu, M., Meunier, J., 2015. Parent-offspring conflict and the genetic trade-offs shaping parental investment. *Nat. Commun.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms7850>
- Kölliker, M., Richner, H., 2001. Parent–offspring conflict and the genetics of offspring solicitation and parental response. *Anim. Behav.* 62, 395–407. <https://doi.org/10.1006/ANBE.2001.1792>
- Koussoroplis, A.M., Pincebourde, S., Wacker, A., 2017. Understanding and predicting physiological performance of organisms in fluctuating and multifactorial environments. *Ecol. Monogr.* 87, 178–197. <https://doi.org/10.1002/ECM.1247>
- Kregel, K.C., 2002. Invited review: Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92, 2177–2186. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.01267.2001/ASSET/IMAGES/LARGE/DG0521557102.JPG>
- Kuyucu, A.C., Chown, S.L., 2021. Time course of acclimation of critical thermal limits in two springtail species (Collembola). *J. Insect Physiol.* 130. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2021.104209>
- Lachenicht, M.W., Clusella-Trullas, S., Boardman, L., Le Roux, C., Terblanche, J.S., 2010.

- Effects of acclimation temperature on thermal tolerance, locomotion performance and respiratory metabolism in *Acheta domesticus* L. (Orthoptera: Gryllidae). *J. Insect Physiol.* 56, 822–830. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2010.02.010>
- Ladyman, M., Bradshaw, D., 2003. The influence of dehydration on the thermal preferences of the Western tiger snake, *Notechis scutatus*. *J. Comp. Physiol. B.* 173, 239–46. <https://doi.org/10.1007/s00360-003-0328-x>
- Ladyman, M., Bradshaw, D., Bradshaw, F., 2006. Physiological and hormonal control of thermal depression in the tiger snake, *Notechis scutatus*. *J. Comp. Physiol. B* 2006 1766 176, 547–557. <https://doi.org/10.1007/S00360-006-0077-8>
- Lahav, S., Dmi'El, R., 1996. Skin resistance to water loss in colubrid snakes: Ecological and taxonomical correlations. *Écoscience* 3, 135–139. <https://doi.org/10.1080/11956860.1996.11682323>
- Lembrechts, J.J., Nijs, I., Lenoir, J., 2019. Incorporating microclimate into species distribution models. *Ecography (Cop.)* 42, 1267–1279. <https://doi.org/10.1111/ECOG.03947>
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P., Herve, M., 2020. emmeans: estimated marginal means. R package version 1.4.4. *Am. Stat* 34, 216–221.
- Lenth, R. V., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Riebl, H., Singmann, H., 2019. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.3.01. .
- Lertzman-Lepofsky, G.F., Kissel, A.M., Sinervo, B., Palen, W.J., 2020. Water loss and temperature interact to compound amphibian vulnerability to climate change. *Glob. Chang. Biol.* 26, 4868–4879. <https://doi.org/10.1111/gcb.15231>
- Levy, O., Dayan, T., Porter, W.P., Kronfeld-Schor, N., 2019. Time and ecological resilience: can diurnal animals compensate for climate change by shifting to nocturnal activity? *Ecol. Monogr.* 89, e01334. <https://doi.org/10.1002/ecm.1334>
- Li, H., Qu, Y.F., Hu, R. Bin, Ji, X., 2009. Evolution of viviparity in cold-climate lizards: Testing the maternal manipulation hypothesis. *Evol. Ecol.* 23, 777–790. <https://doi.org/10.1007/s10682-008-9272-2>
- Ligon, D.B., Peterson, C.C., Lovern, M.B., 2012. Acute and Persistent Effects of Pre- and Posthatching Thermal Environments on Growth and Metabolism in the Red-Eared Slider Turtle, *Trachemys scripta elegans*. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 317, 227–235. <https://doi.org/10.1002/jez.1716>
- Lillywhite, H.B., 2017. Feeding begets drinking: insights from intermittent feeding in snakes. *J. Exp. Biol.* 220, 3565–3570. <https://doi.org/10.1242/jeb.163725>
- Lillywhite, H.B., 2004. Plasticity of the water barrier in vertebrate integument. *Int. Congr. Ser.* 1275, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.088>
- Lillywhite, H.B., Babonis, L.S., Sheehy, C.M., Tu, M.-C., 2008. Sea snakes (*Laticauda* spp.) require fresh drinking water: implication for the distribution and persistence of populations. *Physiol. Biochem. Zool.* 81, 785–96. <https://doi.org/10.1086/588306>
- Lillywhite, H.B., Brischoux, F., Sheehy, C.M., Pfaller, J.B., 2012. Dehydration and Drinking Responses in a Pelagic Sea Snake. *Integr. Comp. Biol.* 52, 227–234. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICS039>
- Lillywhite, H.B., Heatwole, H., III, C.M.S., 2015. Dehydration and Drinking Behavior of the Marine File Snake *Acrochordus granulatus**. <https://doi.org/10.1086/673375> 87, 46–55. <https://doi.org/10.1086/673375>
- Lillywhite, H.B., III, C.M.S., Sandfoss, M.R., Crowe-Riddell, J., Grech, A., 2019. Drinking by sea snakes from oceanic freshwater lenses at first rainfall ending seasonal drought. *PLoS One* 14, e0212099. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0212099>
- Lillywhite, H.B., Mittal, A.K., Garg, T.K., Agrawal, N., 1997. Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*.

- J. Zool. 243, 675–687. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7998.1997.TB01969.X>
- Little, A., Seebacher, F., 2016. Acclimation, acclimatization, and seasonal variation in amphibians and reptiles, in: *Amphibian and Reptile Adaptations to the Environment: Interplay between Physiology and Behavior*. pp. 41–62.
- Liu, S.C., Fu, C., Shiu, C.-J., Chen, J.-P., Wu, F., 2009. Temperature dependence of global precipitation extremes. *Geophys. Res. Lett.* 36, 17702. <https://doi.org/10.1029/2009GL040218>
- Lorenzon, P., Clobert, J., Oppliger, A., John-Alder, H., 1999. Effect of water constraint on growth rate, activity and body temperature of yearling common lizard (*Lacerta vivipara*). *Oecologia* 118, 423–430. <https://doi.org/10.1007/s004420050744>
- Lorioux, S., Angelier, F., Lourdais, O., 2016. Are glucocorticoids good indicators of pregnancy constraints in a capital breeder? *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.04.007>
- Lorioux, S., Lisse, H., Lourdais, O., 2013a. Dedicated mothers: predation risk and physical burden do not alter thermoregulatory behaviour of pregnant vipers. *Anim. Behav.* 86, 401–408. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2013.05.031>
- Lorioux, S., Vaugoyeau, M., Denardo, D.F., Clobert, J., Guillon, M., Lourdais, O., 2013b. Stage dependence of phenotypical and phenological maternal effects: insight into squamate reptile reproductive strategies. *Am. Nat.* 182, 223–33. <https://doi.org/10.1086/670809>
- Lourdais, O., Bonnet, X., Doughty, P., 2002a. Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *J. Exp. Zool.* 292, 487–493. <https://doi.org/10.1002/jez.10065>
- Lourdais, O., Bonnet, X., Shine, R., DeNardo, D., Naulleau, G., Guillon, M., 2002b. Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of a viviparous snake. *J. Anim. Ecol.* 71, 470–479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2002.00612.x>
- Lourdais, O., Brischoux, F., Barantin, L., 2005. How to assess musculature and performance in a constricting snake? A case study in the Colombian rainbow boa (*Epicrates cenchria maurus*). *J. Zool.* 265, 43–51. <https://doi.org/10.1017/S095283690400603X>
- Lourdais, O., Brischoux, F., DeNardo, D., Shine, R., 2004. Protein catabolism in pregnant snakes (*Epicrates cenchria maurus* Boidae) compromises musculature and performance after reproduction. *J. Comp. Physiol. B* 174, 383–391. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0424-6>
- Lourdais, O., Dupoué, A., Guillon, M., Guiller, G., Michaud, B., DeNardo, D.F., 2017. Hydric “Costs” of Reproduction: Pregnancy Increases Evaporative Water Loss in the Snake *Vipera aspis*. *Physiol. Biochem. Zool.* 90, 663–672. <https://doi.org/10.1086/694848>
- Lourdais, O., Guillon, M., Denardo, D., Blouin-Demers, G., 2013a. Cold climate specialization: Adaptive covariation between metabolic rate and thermoregulation in pregnant vipers. *Physiol. Behav.* 119, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.041>
- Lourdais, O., Lorioux, S., DeNardo, D.F., 2013b. Structural and performance costs of reproduction in a pure capital breeder, the Children’s python *Antaresia childreni*. *Physiol. Biochem. Zool.* 86, 176–83. <https://doi.org/10.1086/669127>
- Lourdais, O., Lorioux, S., Dupoué, A., Wright, C., DeNardo, D.F., 2015. Embryonic water uptake during pregnancy is stage- and fecundity-dependent in the snake *Vipera aspis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 189, 102–106. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2015.07.019>
- Lourdais, Olivier, Shine, R., Bonnet, X., Guillon, M., Naulleau, G., 2004. Climate affects

- embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos* 104, 551–560. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12961.x>
- Luiselli, L., Vignoli, L., Rugiero, L., Meek, R., Tre, R., 2018. Declining occupancy rates in the hibernacula of aspic vipers (*Vipera aspis*) in Italy and France; evidence for climatic effects? *Herpetological Journal*.
- Maclean, I.M.D., 2020. Predicting future climate at high spatial and temporal resolution. *Glob. Chang. Biol.* 26, 1003–1011. <https://doi.org/10.1111/GCB.14876>
- MacLeod, K.J., While, G.M., Uller, T., 2021. Viviparous mothers impose stronger glucocorticoid-mediated maternal stress effects on their offspring than oviparous mothers. *Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1002/ECE3.8360>
- Madsen, T., Shine, R., 1993. Costs of reproduction in a population of European adders. *Oecologia* 94, 488–495. <https://doi.org/10.1007/BF00566963>
- Mahat, D.B., Salamanca, H.H., Duarte, F.M., Danko, C.G., Lis, J.T., 2016. Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. *Mol. Cell* 62, 63–78. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.02.025>
- Mainka, S.A., Howard, G.W., 2010. Climate change and invasive species: double jeopardy. *Integr. Zool.* 5, 102–111. <https://doi.org/10.1111/J.1749-4877.2010.00193.X>
- Malishev, M., Bull, C.M., Kearney, M.R., 2018. An individual-based model of ectotherm movement integrating metabolic and microclimatic constraints. *Methods Ecol. Evol.* 9, 472–489. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12909>
- Marais, E., Chown, S.L., 2008. Beneficial acclimation and the Bogert effect. *Ecol. Lett.* 11, 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01213.x>
- Maritz, M.F., Douglas, R.M., 1994. Shape Quantization and the Estimation of Volume and Surface Area of Reptile Eggs. *J. Herpetol.* 28, 281. <https://doi.org/10.2307/1564526>
- Marquis, O., Massot, M., Le Galliard, J.F., 2008. Intergenerational effects of climate generate cohort variation in lizard reproductive performance. *Ecology* 89, 2575–2583. <https://doi.org/10.1890/07-1211.1>
- Marshall, Dustin J, Uller, T., Marshall, D J, Uller, Á.T., 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116, 1957–1963. <https://doi.org/10.1111/J.2007.0030-1299.16203.X>
- Martin, T.E., Mouton, J.C., 2020. Longer-lived tropical songbirds reduce breeding activity as they buffer impacts of drought. *Nat. Clim. Chang.* 10, 953–958. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-0864-3>
- Mathot, K.J., Dingemans, N.J., 2015. Energetics and behavior: Unrequited needs and new directions. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.01.010>
- Matsumoto, Y., Crews, D., 2012. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 103–110. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2011.10.012>
- Maxwell, S.L., Butt, N., Maron, M., McAlpine, C.A., Chapman, S., Ullmann, A., Segan, D.B., Watson, J.E.M., 2019. Conservation implications of ecological responses to extreme weather and climate events. *Divers. Distrib.* 25, 613–625. <https://doi.org/10.1111/DDI.12878>
- Mayfield, A.B., Fan, T.Y., Chen, C.S., 2013. Physiological acclimation to elevated temperature in a reef-building coral from an upwelling environment. *Coral Reefs* 2013 324 32, 909–921. <https://doi.org/10.1007/S00338-013-1067-4>
- McCormick, S.D., Bradshaw, D., 2006. Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.009>
- McCowan, L.S.C., Griffith, S.C., 2021. Baked eggs: catastrophic heatwave-induced reproductive failure in the desert-adapted Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). *Ibis (Lond. 1859)*. 163, 1207–1216. <https://doi.org/10.1111/IBI.12958>
- McCreedy, C., van Riper, C., 2015. Drought-caused delay in nesting of Sonoran Desert birds

- and its facilitation of parasite- and predator-mediated variation in reproductive success. *Auk* 132, 235–247. <https://doi.org/10.1642/auk-13-253.1>
- McEwen, B.S., Wingfield, J.C., 2010. What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm. Behav.* 57, 105. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2009.09.011>
- McKechnie, A.E., Wolf, B.O., 2019. The physiology of heat tolerance in small endotherms. *Physiology* 34, 302–313. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00011.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0051904850005.JPEG>
- McMenamin, S.K., Hadly, E.A., Wright, C.K., 2008. Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16988–16993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809090105>
- Mell, H., Josslerand, R., Decencièrre, B., Artacho, P., Meylan, S., Le Galliard, J.F., 2016. Do personalities co-vary with metabolic expenditure and glucocorticoid stress response in adult lizards? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70, 951–961. <https://doi.org/10.1007/s00265-016-2117-z>
- Metcalf, N.B., Monaghan, P., 2013. Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.01.015>
- Michelangeli, M., Goulet, C.T., Kang, H.S., Wong, B.B.M., Chapple, D.G., 2018. Integrating thermal physiology within a syndrome: Locomotion, personality and habitat selection in an ectotherm. *Funct. Ecol.* 32, 970–981. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13034>
- Miller, M.A., Lutterschmidt, W.I., 2014. Cutaneous Water Loss and Epidermal Lipids in Two Sympatric and Congeneric Pitvipers. *J. Herpetol.* 48, 577–583. <https://doi.org/10.1670/13-116>
- Miranda, N.A.F., Peer, N., Ishak, M.Z.B., Marshall, D.J., 2019. Heat-wave tolerance in tropical intertidal animals: accounting for thermal and desiccation tolerances. *Ecol. Indic.* 107, 105561. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2019.105561>
- Mitchell, A., Bergmann, P.J., 2016. Thermal and moisture habitat preferences do not maximize jumping performance in frogs. *Funct. Ecol.* 30, 733–742. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12535>
- Mitchell, D., Snelling, E.P., Hetem, R.S., Maloney, S.K., Strauss, W.M., Fuller, A., 2018. Revisiting concepts of thermal physiology: Predicting responses of mammals to climate change. *J. Anim. Ecol.* 87, 956–973. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12818>
- Moeller, K.T., Butler, M.W., DeNardo, D.F., 2013. The effect of hydration state and energy balance on innate immunity of a desert reptile. *Front. Zool.* 10, 23. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-23>
- Moeller, K.T., Demare, G., Davies, S., DeNardo, D.F., 2017. Dehydration enhances multiple physiological defense mechanisms in a desert lizard, *Heloderma suspectum*. *J. Exp. Biol.* 220, 2166–2174. <https://doi.org/10.1242/jeb.150367>
- Mole, M.A., D'Áraujo, S.R., van Aarde, R.J., Mitchell, D., Fuller, A., 2016. Coping with heat: behavioural and physiological responses of savanna elephants in their natural habitat. *Conserv. Physiol.* 4. <https://doi.org/10.1093/CONPHYS/COW044>
- Mollinari, M.M., Peres, C.A., Edwards, D.P., 2019. Rapid recovery of thermal environment after selective logging in the Amazon. *Agric. For. Meteorol.* 278, 107637. <https://doi.org/10.1016/J.AGRFORMET.2019.107637>
- Monaghan, P., Davies, S.A., Dow, J.A.T., Lukowiak, K., 2014. Organismal stress, telomeres and life histories. *J. Exp. Biol.* 217, 57–66. <https://doi.org/10.1242/JEB.090043>
- Moore, D., Stow, A., Kearney, M.R., 2018. Under the weather?—The direct effects of climate warming on a threatened desert lizard are mediated by their activity phase and burrow system. *J. Anim. Ecol.* 87, 660–671. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12812>
- Morash, A.J., Neufeld, C., MacCormack, T.J., Currie, S., 2018. The importance of

- incorporating natural thermal variation when evaluating physiological performance in wild species. *J. Exp. Biol.* <https://doi.org/10.1242/jeb.164673>
- Morley, S.A., Peck, L.S., Sunday, J.M., Heiser, S., Bates, A.E., 2019. Physiological acclimation and persistence of ectothermic species under extreme heat events. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 28, 1018–1037. <https://doi.org/10.1111/geb.12911>
- Muir, T.J., Costanzo, J.P., Lee, R.E., 2007. Osmotic and metabolic responses to dehydration and urea-loading in a dormant, terrestrially hibernating frog. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 177, 917–926. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0190-3>
- Muñoz-García, A., Cox, R.M., Williams, J.B., 2015. Phenotypic Flexibility in Cutaneous Water Loss and Lipids of the Stratum Corneum in House Sparrows (*Passer domesticus*) following Acclimation to High and Low Humidity. <https://doi.org/10.1086/522651> 81, 87–96. <https://doi.org/10.1086/522651>
- Muñoz-García, A., Williams, J.B., 2008. Developmental plasticity of cutaneous water loss and lipid composition in stratum corneum of desert and mesic nestling house sparrows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15611–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805793105>
- Muñoz, M.M., 2021. The Bogert effect, a factor in evolution. *Evolution* (N. Y.). <https://doi.org/10.1111/EVO.14388>
- Murphy, M.S., Denardo, D.F., 2019. Rattlesnakes Must Drink: Meal Consumption Does Not Improve Hydration State. <https://doi.org/10.1086/704081> 92, 381–385. <https://doi.org/10.1086/704081>
- Nagy, K.A., 2005. Field metabolic rate and body size. *J. Exp. Biol.* 208, 1621–1625. <https://doi.org/10.1242/JEB.01553>
- Nagy, K.A., 1994. Seasonal Water, Energy and Food Use by Free-Living, Arid-Habitat Mammals. *Aust. J. Zool.* 42, 55–63. <https://doi.org/10.1071/ZO9940055>
- Naulleau, G., 1983. The Effects of Temperature on Digestion in *Vipera aspis*. *J. Herpetol.* 17, 166. <https://doi.org/10.2307/1563457>
- Neel, L.K., Logan, M.L., Nicholson, D.J., Miller, C., Chung, A.K., Maayan, I., Degon, Z., DuBois, M., Curlis, J.D., Taylor, Q., Keegan, K.M., McMillan, W.O., Losos, J.B., Cox, C.L., 2021. Habitat structure mediates vulnerability to climate change through its effects on thermoregulatory behavior. *Biotropica* 53, 1121–1133. <https://doi.org/10.1111/BTP.12951>
- Nelson, R.J., 1993. Simulated Drought Affects Male Reproductive Function in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus bairdii*). *Physiol. Zool.* 66, 99–114. <https://doi.org/10.1086/physzool.66.1.30158289>
- Nespolo, R.F., Franco, M., 2007. Whole-animal metabolic rate is a repeatable trait: A meta-analysis. *J. Exp. Biol.* 210, 2000–2005. <https://doi.org/10.1242/jeb.02780>
- Nespolo, R.F., Lardies, M.A., Bozinovic, F., 2003. Intrapopulational variation in the standard metabolic rate of insects: Repeatability, thermal dependence and sensitivity (Q10) of oxygen consumption in a cricket. *J. Exp. Biol.* 206, 4309–4315. <https://doi.org/10.1242/jeb.00687>
- Nettle, D., Bateson, M., 2015. Adaptive developmental plasticity: What is it, how can we recognize it and when can it evolve? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1005>
- Ng, T.P.T., Lau, S.L.Y., Davies, M.S., Stafford, R., Seuront, L., Hutchinson, N., Hui, T.T.Y., Williams, G.A., 2021. Behavioral repertoire of high-shore littorinid snails reveals novel adaptations to an extreme environment. *Ecol. Evol.* 11, 7114–7124. <https://doi.org/10.1002/ECE3.7578>
- Niehaus, A.C., Wilson, R.S., Seebacher, F., Franklin, C.E., 2011. Striped marsh frog (*Limnodynastes peronii*) tadpoles do not acclimate metabolic performance to thermal

- variability. *J. Exp. Biol.* 214, 1965–1970. <https://doi.org/10.1242/jeb.054478>
- Nijhout, H.F., 2003. Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evol. Dev.* 5, 9–18. <https://doi.org/ede03003> [pii]
- Nikinmaa, M., 2013. Climate change and ocean acidification—Interactions with aquatic toxicology. *Aquat. Toxicol.* 126, 365–372. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2012.09.006>
- Nilsson, J.-Å., Åkesson, M., Nilsson, J.F., 2009. Heritability of resting metabolic rate in a wild population of blue tits. *J. Evol. Biol.* 22, 1867–1874. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01798.x>
- Noakes, M.J., McKechnie, A.E., 2020. Seasonal Metabolic Acclimatization Varies in Direction and Magnitude among Years in Two Arid-Zone Passerines. <https://doi.org/10.1086/707679> 93, 140–152. <https://doi.org/10.1086/707679>
- Noble, D.W.A., Stenhouse, V., Schwanz, L.E., 2018. Developmental temperatures and phenotypic plasticity in reptiles: a systematic review and meta-analysis. *Biol. Rev.* 93, 72–97. <https://doi.org/10.1111/brv.12333>
- Noer, N.K., Pagter, M., Bahrndorff, S., Malmendal, A., Kristensen, T.N., 2020. Impacts of thermal fluctuations on heat tolerance and its metabolomic basis in *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, and *Orchesella cincta*. *PLoS One* 15, e0237201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237201>
- Norin, T., Malte, H., Clark, T.D., 2014. Aerobic scope does not predict the performance of a tropical eurythermal fish at elevated temperatures. *J. Exp. Biol.* 217, 244–251. <https://doi.org/10.1242/jeb.089755>
- Norin, T., Metcalfe, N.B., 2019. Ecological and evolutionary consequences of metabolic rate plasticity in response to environmental change. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0180>
- Nowakowski, A.J., Watling, J.I., Thompson, M.E., Bruschi, G.A., Catenazzi, A., Whitfield, S.M., Kurz, D.J., Suárez-Mayorga, Á., Aponte-Gutiérrez, A., Donnelly, M.A., Todd, B.D., 2018. Thermal biology mediates responses of amphibians and reptiles to habitat modification. *Ecol. Lett.* 21, 345–355. <https://doi.org/10.1111/ELE.12901>
- O’Neill, K.M., Rolston, M.G., 2007. Short-term dynamics of behavioral thermoregulation by adults of the grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *J. Insect Sci.* 7, 27. <https://doi.org/10.1673/031.007.2701/869528>
- O Anderson, R.C., Andrade, D. V, Rodolfo O Anderson, C.C., 2017. Trading heat and hops for water: Dehydration effects on locomotor performance, thermal limits, and thermoregulatory behavior of a terrestrial toad. *Ecol. Evol.* 7, 9066–9075. <https://doi.org/10.1002/ECE3.3219>
- Pacifici, M., Foden, W.B., Visconti, P., Watson, J.E.M., Butchart, S.H.M., Kovacs, K.M., Scheffers, B.R., Hole, D.G., Martin, T.G., Akçakaya, H.R., Corlett, R.T., Huntley, B., Bickford, D., Carr, J.A., Hoffmann, A.A., Midgley, G.F., Pearce-Kelly, P., Pearson, R.G., Williams, S.E., Willis, S.G., Young, B., Rondinini, C., 2015. Assessing species vulnerability to climate change. *Nat. Clim. Chang.* 2015 5, 215–224. <https://doi.org/10.1038/nclimate2448>
- Padda, S.S., Glass, J.R., Stahlschmidt, Z.R., 2021. When it’s hot and dry: life-history strategy influences the effects of heat waves and water limitation. *J. Exp. Biol.* 224. <https://doi.org/10.1242/JEB.236398>
- Pallarés, S., Colado, R., Botella-Cruz, M., Montes, A., Balart-García, P., Bilton, D.T., Millán, A., Ribera, I., Sánchez-Fernández, D., 2020. Loss of heat acclimation capacity could leave subterranean specialists highly sensitive to climate change. *Anim. Conserv.* 1–9. <https://doi.org/10.1111/acv.12654>
- Pattinson, N.B., Smit, B., 2017. Seasonal behavioral responses of an arid-zone passerine in a

- hot environment. *Physiol. Behav.* 179, 268–275.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.06.018>
- Perez, M.F., Lehner, B., 2019. Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nat. Cell Biol.* 2019 212 21, 143–151. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0242-9>
- Perkins-Kirkpatrick, S.E., Gibson, P.B., 2017. Changes in regional heatwave characteristics as a function of increasing global temperature. *Sci. Reports* 2017 71 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12520-2>
- Perkins, S.E., Alexander, L. V., Nairn, J.R., 2012. Increasing frequency, intensity and duration of observed global heatwaves and warm spells. *Geophys. Res. Lett.* 39, 20714. <https://doi.org/10.1029/2012GL053361>
- Peterman, W.E., Semlitsch, R.D., 2014. Spatial variation in water loss predicts terrestrial salamander distribution and population dynamics. *Oecologia* 2014 1762 176, 357–369. <https://doi.org/10.1007/S00442-014-3041-4>
- Peterson, C.C., 2015. Anhomeostasis: Seasonal Water and Solute Relations in Two Populations of the Desert Tortoise (*Gopherus agassizii*) during Chronic Drought. <https://doi.org/10.1086/physzool.69.6.30164263> 69, 1324–1358. <https://doi.org/10.1086/PHYSZOO.69.6.30164263>
- Peterson, C.C., 2002. Temporal, population, and sexual variation in hematocrit of free-living desert tortoises: Correlational tests of causal hypotheses. *Can. J. Zool.* 80, 461–470. <https://doi.org/10.1139/z02-021>
- Pettersen, A.K., Marshall, D.J., White, C.R., 2018. Understanding variation in metabolic rate. *J. Exp. Biol.* <https://doi.org/10.1242/jeb.166876>
- Piersma, T., Drent, J., 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol. Evol.* 18, 228–233. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00036-3)
- Piersma, T., Gils, J.A. van., 2011. *The flexible phenotype: a body-centred integration of ecology, physiology, and behaviour.* Oxford University Press.
- Pincebourde, S., Murdock, C.C., Vickers, M., Sears, M.W., 2016a. Fine-Scale Microclimatic Variation Can Shape the Responses of Organisms to Global Change in Both Natural and Urban Environments. *Integr. Comp. Biol.* 56, 45–61. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICW016>
- Pincebourde, S., Murdock, C.C., Vickers, M., Sears, M.W., 2016b. Fine-Scale Microclimatic Variation Can Shape the Responses of Organisms to Global Change in Both Natural and Urban Environments. *Integr. Comp. Biol.* 56, 45–61. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICW016>
- Pincebourde, S., Woods, H.A., 2020. There is plenty of room at the bottom: microclimates drive insect vulnerability to climate change. *Curr. Opin. Insect Sci.* 41, 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2020.07.001>
- Pincheira-Donoso, D., Tregenza, T., Witt, M.J., Hodgson, D.J., 2013. The evolution of viviparity opens opportunities for lizard radiation but drives it into a climatic cul-de-sac. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 22, 857–867. <https://doi.org/10.1111/geb.12052>
- Pinheiro, J., Bates, D., 2006. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS.*
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team, 2020. An introduction to nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-150, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2008.01.002>
- Pintor, A.F. V., Schwarzkopf, L., Krockenberger, A.K., 2016. Hydroregulation in a tropical dry-skinned ectotherm. *Oecologia* 182, 925–931. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3687-1>
- Pirtle, E.I., Tracy, C.R., Kearney, M.R., 2019. Hydroregulation ; A Neglected Behavioral Response of Lizards to Climate Change ?, in: *Behavior of Lizards.* CRC Press, pp. 343–

374. <https://doi.org/10.1201/9781498782739-12>
- Poloczanska, E.S., Burrows, M.T., Brown, C.J., Molinos, J.G., Halpern, B.S., Hoegh-Guldberg, O., Kappel, C. V., Moore, P.J., Richardson, A.J., Schoeman, D.S., Sydeman, W.J., 2016. Responses of marine organisms to climate change across oceans. *Front. Mar. Sci.* 3, 62. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2016.00062/BIBTEX>
- Pörtner, H.O., Bock, C., Mark, F.C., 2017. Oxygen- & capacity-limited thermal tolerance: Bridging ecology & physiology. *J. Exp. Biol.* <https://doi.org/10.1242/jeb.134585>
- Pörtner, H.O., Farrell, A.P., 2008. Physiology and Climate Change . *Science* (80-.). 322, 690–691.
- Potter, K.A., Arthur Woods, H., Pincebourde, S., 2013. Microclimatic challenges in global change biology. *Glob. Chang. Biol.* 19, 2932–2939. <https://doi.org/10.1111/GCB.12257>
- Pough, F.H., 1980. The Advantages of Ectothermy for Tetrapods. *Am. Nat.* 115, 92–112. <https://doi.org/10.1086/283547>
- Pruvot, M., Cappelle, J., Furey, N., Hul, V., Heng, H.S., Duong, V., Dussart, P., Horwood, P., 2019. Extreme temperature event and mass mortality of insectivorous bats. *Eur. J. Wildl. Res.* 65. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1280-8>
- R Core Team, 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. [pdfs.semanticscholar.org](https://www.R-project.org/).
- Racic, A., Tylan, C., Langkilde, T., 2020. Effects of temperature on plasma corticosterone in a native lizard. *Sci. Reports* 2020 101 10, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73354-z>
- Rahmstorf, S., Coumou, D., 2011. Increase of extreme events in a warming world. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17905–17909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101766108>
- Ratikainen, I.I., Haaland, T.R., Wright, J., 2018. Differential allocation of parental investment and the trade-off between size and number of offspring. *Proc. R. Soc. B* 285. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2018.1074>
- Refsnider, J.M., Clifton, I.T., Vazquez, T.K., 2019. Developmental plasticity of thermal ecology traits in reptiles: Trends, potential benefits, and research needs. *J. Therm. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.06.005>
- Réveillon, T., Rota, T., Chauvet, É., Lecerf, A., Sentis, A., 2019. Repeatable inter-individual variation in the thermal sensitivity of metabolic rate. *Oikos* 128, 1633–1640. <https://doi.org/10.1111/oik.06392>
- Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J., 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol. Cell* 40, 253–266. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.10.006>
- Ricklefs, R.E., Wikelski, M., 2002. The physiology/life-history nexus. *Trends Ecol. Evol.* [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02578-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02578-8)
- Riddell, E.A., Apanovitch, E.K., Odom, J.P., Sears, M.W., 2017. Physical calculations of resistance to water loss improve predictions of species range models. *Ecol. Monogr.* 87, 21–33. <https://doi.org/10.1002/ECM.1240>
- Riddell, E.A., Iknayan, K.J., Hargrove, L., Tremor, S., Patton, J.L., Ramirez, R., Wolf, B.O., Beissinger, S.R., 2021. Exposure to climate change drives stability or collapse of desert mammal and bird communities. *Science* (80-.). 371, 633–636. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD4605>
- Riddell, Eric A., Iknayan, K.J., Wolf, B.O., Sinervo, B., Beissinger, S.R., 2019. Cooling requirements fueled the collapse of a desert bird community from climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 21609–21615. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1908791116>
- Riddell, E.A., McPhail, J., Damm, J.D., Sears, M.W., 2018a. Trade-offs between water loss and gas exchange influence habitat suitability of a woodland salamander. *Funct. Ecol.* 32, 916–925. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13030>
- Riddell, E.A., Odom, J.P., Damm, J.D., Sears, M.W., 2018b. Plasticity reveals hidden

- resistance to extinction under climate change in the global hotspot of salamander diversity. *Sci. Adv.* 4. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar5471>
- Riddell, Eric A, Roback, E.Y., Wells, C.E., Zamudio, K.R., Sears, M.W., 2019. Thermal cues drive plasticity of desiccation resistance in montane salamanders with implications for climate change. *Nat. Commun.* 10, 4091. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11990-4>
- Riddell, E.A., Sears, M.W., 2020. Terrestrial Salamanders Maintain Habitat Suitability under Climate Change despite Trade-Offs between Water Loss and Gas Exchange. *Physiol. Biochem. Zool.* <https://doi.org/10.1086/709558>
- Ritchie, D.J., Friesen, C.R., 2021. Invited review: Thermal effects on oxidative stress in vertebrate ectotherms. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 263, 111082. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2021.111082>
- Roberts, J.B., Lillywhite, H.B., 1983. Lipids and the permeability of epidermis from snakes. *J. Exp. Zool.* 228, 1–9. <https://doi.org/10.1002/jez.1402280102>
- Robertshaw, D., 2006. Mechanisms for the control of respiratory evaporative heat loss in panting animals. *J. Appl. Physiol.* 101, 664–668. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.01380.2005/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0080667480001.JPEG>
- Rohr, J.R., Civitello, D.J., Cohen, J.M., Roznik, E.A., Sinervo, B., Dell, A.I., 2018. The complex drivers of thermal acclimation and breadth in ectotherms. *Ecol. Lett.* 21, 1425–1439. <https://doi.org/10.1111/ele.13107>
- Rohr, J.R., Palmer, B.D., 2013. Climate Change, Multiple Stressors, and the Decline of Ectotherms. *Conserv. Biol.* 27, 741–751. <https://doi.org/10.1111/cobi.12086>
- Romero, L.M., Wikelski, M., 2002. Exposure to tourism reduces stress-induced corticosterone levels in Galápagos marine iguanas. *Biol. Conserv.* 108, 371–374. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(02\)00128-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00128-3)
- Romero, L.M., Wikelski, M., 2001. Corticosterone levels predict survival probabilities of galápagos marine iguanas during El Niño events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7366–7370. <https://doi.org/10.1073/pnas.131091498>
- Rose, J.P., Todd, B.D., 2017. Demographic effects of prolonged drought on a nascent introduction of a semi-aquatic snake. *Biol. Invasions* 19, 2885–2898. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1491-4>
- Rozen-Rechels, D., Dupoué, A., Meylan, S., Decencièrre, B., Guingand, S., Le Galliard, J.-F., 2018. Water restriction in viviparous lizards causes transgenerational effects on behavioral anxiety and immediate effects on exploration behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 72, 23. <https://doi.org/10.1007/s00265-018-2443-4>
- Rozen-Rechels, D., Dupoué, A., Meylan, S., Qitout, K., Decencièrre, B., Agostini, S., Le Galliard, J.-F., 2020a. Acclimation to Water Restriction Implies Different Paces for Behavioral and Physiological Responses in a Lizard Species. *Physiol. Biochem. Zool.* 93, 160–174. <https://doi.org/10.1086/707409>
- Rozen-Rechels, D., Farigoule, P., Agostini, S., Badiane, A., Meylan, S., Galliard, J.-F. Le, 2020b. Short-term change in water availability influences thermoregulation behaviours in a dry-skinned ectotherm. *J. Anim. Ecol.* 89, 2099–2110. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13279>
- Rozen-Rechels, D., Badiane, A., Agostini, S., Meylan, S., Le Galliard, J., 2020. Water restriction induces behavioral fight but impairs thermoregulation in a dry-skinned ectotherm. *Oikos* 129, 572–584. <https://doi.org/10.1111/oik.06910>
- Rozen-Rechels, D., Dupoué, A., Lourdais, O., Chamailé-Jammes, S., Meylan, S., Clobert, J., Le Galliard, J., 2019. When water interacts with temperature: Ecological and evolutionary implications of thermo-hydroregulation in terrestrial ectotherms. *Ecol. Evol.* 9, 10029–10043. <https://doi.org/10.1002/ece3.5440>

- Rugiero, L., Milana, G., Petrozzi, F., Capula, M., Luiselli, L., 2013. Climate-change-related shifts in annual phenology of a temperate snake during the last 20 years. *Acta Oecologica* 51, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.05.005>
- Rummukainen, M., 2010. State-of-the-art with regional climate models. *Wiley Interdiscip. Rev. Clim. Chang.* 1, 82–96. <https://doi.org/10.1002/WCC.8>
- Ryan, M.J., Latella, I.M., Giermakowski, J.T., Snell, H., Poe, S., Pangle, R.E., Gehres, N., Pockman, W.T., McDowell, N.G., 2016. Too dry for lizards: short-term rainfall influence on lizard microhabitat use in an experimental rainfall manipulation within a piñon-juniper. *Funct. Ecol.* 30, 964–973. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12595>
- Saino, N., Rubolini, D., Jonzén, N., Ergon, T., Montemaggiori, A., Stenseth, N.C., Spina, F., 2007. Temperature and rainfall anomalies in Africa predict timing of spring migration in trans-Saharan migratory birds. *Clim. Res.* <https://doi.org/10.2307/24869419>
- Salin, K., Auer, S.K., Rudolf, A.M., Anderson, G.J., Selman, C., Metcalfe, N.B., 2016. Variation in Metabolic Rate among Individuals Is Related to Tissue-Specific Differences in Mitochondrial Leak Respiration. <https://doi.org/10.1086/688769> 89, 511–523. <https://doi.org/10.1086/688769>
- Sánchez-Tójar, A., Lagisz, M., Moran, N.P., Nakagawa, S., Noble, D.W.A., Reinhold, K., 2020. The jury is still out regarding the generality of adaptive ‘transgenerational’ effects. *Ecol. Lett.* 23, 1715–1718. <https://doi.org/10.1111/ELE.13479>
- Sandblom, E., Gräns, A., Axelsson, M., Seth, H., 2014. Temperature acclimation rate of aerobic scope and feeding metabolism in fishes: Implications in a thermally extreme future. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1490>
- Sandfoss, M.R., Lillywhite, H.B., 2019. Water relations of an insular pit viper. *J. Exp. Biol.* 222. <https://doi.org/10.1242/JEB.204065/258924/AM/WATER-RELATIONS-OF-AN-INSULAR-PIT-VIPER>
- Sanger, T.J., Harding, L., Kyrkos, J., Turnquist, A.J., Epperlein, L., Nunez, S.A., Lachance, D., Dhindsa, S., Stroud, J.T., Diaz, R.E., Czesny, B., 2021. Environmental Thermal Stress Induces Neuronal Cell Death and Developmental Malformations in Reptiles. *Integr. Org. Biol.* 3. <https://doi.org/10.1093/IOB/OBAB033>
- Sanz-Lazaro, C., 2019. A Framework to Advance the Understanding of the Ecological Effects of Extreme Climate Events. *Sustain.* 2019, Vol. 11, Page 5954 11, 5954. <https://doi.org/10.3390/SU11215954>
- Scanes, C.G., 2015. Pituitary Gland. *Sturkie’s Avian Physiol.* Sixth Ed. 497–533. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407160-5.00023-3>
- Scheffers, B.R., Edwards, D.P., Diesmos, A., Williams, S.E., Evans, T.A., 2014. Microhabitats reduce animal’s exposure to climate extremes. *Glob. Chang. Biol.* <https://doi.org/10.1111/gcb.12439>
- Schulte, P. M., Healy, T.M., Fangué, N.A., 2011. Thermal Performance Curves, Phenotypic Plasticity, and the Time Scales of Temperature Exposure. *Integr. Comp. Biol.* 51, 691–702. <https://doi.org/10.1093/icb/acr097>
- Schwanz, L.E., Crawford-Ash, J., Gale, T., 2020. Context dependence of transgenerational plasticity: the influence of parental temperature depends on offspring environment and sex. *Oecologia* 2020 194, 391–401. <https://doi.org/10.1007/S00442-020-04783-W>
- Seabrook, L., McAlpine, C., Baxter, G., Rhodes, J., Bradley, A., Lunney, D., 2011. Drought-driven change in wildlife distribution and numbers: a case study of koalas in south west Queensland. *Wildl. Res.* 38, 509. <https://doi.org/10.1071/WR11064>
- Sears, M.W., Angilletta, M.J., Schuler, M.S., Borchert, J., Dilliplane, K.F., Stegman, M., Rusch, T.W., Mitchell, W.A., 2016. Configuration of the thermal landscape determines thermoregulatory performance of ectotherms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 10595–10600. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604824113>

- Sears, M.W., Raskin, E., Angilletta, M.J., 2011. The World Is not Flat: Defining Relevant Thermal Landscapes in the Context of Climate Change. *Integr. Comp. Biol.* 51, 666–675. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICR111>
- Sears, M.W., Riddell, E.A., Rusch, T.W., Angilletta, M.J., 2019. The World Still Is Not Flat: Lessons Learned from Organismal Interactions with Environmental Heterogeneity in Terrestrial Environments. *Integr. Comp. Biol.* 59, 1049–1058. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICZ130>
- Seebacher, F., 2005. A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: What is the role of phenotypic flexibility? *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0010-6>
- Seebacher, F., Brand, M.D., Else, P.L., Guderley, H., Hulbert, A.J., Moyes, C.D., 2010. Plasticity of oxidative metabolism in variable climates: molecular mechanisms. *Physiol. Biochem. Zool.* 83, 721–32. <https://doi.org/10.1086/649964>
- Seebacher, F., Ducret, V., Little, A.G., Adriaenssens, B., 2015a. Generalist–specialist trade-off during thermal acclimation. *R. Soc. Open Sci.* 2, 140251. <https://doi.org/10.1098/rsos.140251>
- Seebacher, F., White, C.R., Franklin, C.E., 2015b. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nat. Clim. Chang.* 5, 61–66. <https://doi.org/10.1038/nclimate2457>
- Sergio, F., Blas, J., Hiraldo, F., 2018. Animal responses to natural disturbance and climate extremes: a review. *Glob. Planet. Change.* <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2017.10.009>
- Serrano-Rojas, S.J., Pašukonis, A., 2021. Tadpole-transporting frogs use stagnant water odor to find pools in the rainforest. *J. Exp. Biol.* 224. <https://doi.org/10.1242/JEB.243122>
- Sexton, O.J., Heatwole, H., 1968. An Experimental Investigation of Habitat Selection and Water Loss in Some Anoline Lizards. *Ecology* 49, 762–767. <https://doi.org/10.2307/1935543>
- Shine, R., Sun, L.-X., Fitzgerald, M., Kearney, M., 2002a. Antipredator Responses of Free-Ranging Pit Vipers (*Gloydius shedaoensis*, Viperidae). *Copeia.* <https://doi.org/10.2307/1448166>
- Shine, R., Sun, L.X., Kearney, M., Fitzgerald, M., 2002b. Thermal correlates of foraging-site selection by Chinese pit-vipers (*Gloydius shedaoensis*, Viperidae). *J. Therm. Biol.* 27, 405–412. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(02\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(02)00009-8)
- Sinclair, B.J., Marshall, K.E., Sewell, M.A., Levesque, D.L., Willett, C.S., Slotsbo, S., Dong, Y., Harley, C.D.G., Marshall, D.J., Helmuth, B.S., Huey, R.B., 2016. Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecol. Lett.* 19, 1372–1385. <https://doi.org/10.1111/ele.12686>
- Sinervo, B., Méndez-de-la-Cruz, F., Miles, D.B., Heulin, B., Bastiaans, E., Villagrán-Santa Cruz, M., Lara-Resendiz, R., Martínez-Méndez, N., Calderón-Espinosa, M.L., Meza-Lázaro, R.N., Gadsden, H., Avila, L.J., Morando, M., De la Riva, I.J., Victoriano Sepulveda, P., Rocha, C.F.D., Ibarguengoytía, N., Aguilar Puntriano, C., Massot, M., Lepetz, V., Oksanen, T.A., Chapple, D.G., Bauer, A.M., Branch, W.R., Clobert, J., Sites, J.W., 2010. Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science* 328, 894–9. <https://doi.org/10.1126/science.1184695>
- Singh, S.K., Das, D., Rhen, T., 2020. Embryonic Temperature Programs Phenotype in Reptiles. *Front. Physiol.* 11, 35. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00035/BIBTEX>
- Smith, C.F., Schuett, G.W., Reiserer, R.S., Dana, C.E., Collyer, M.L., Davis, M.A., 2019. Drought-induced Suppression of Female Fecundity in a Capital Breeder. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51810-9>
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to

- Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICT028>
- Somero, G.N., 2010. The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers.” *J. Exp. Biol.* 213, 912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Sørensen, J.G., Sarup, P., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2008. Temperature-Induced Hormesis in *Drosophila*. *Mild Stress Heal. Aging Appl. Hormesis Aging Res. Interv.* 65–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6869-0_5
- Speakman, J.R., Garratt, M., 2014. Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays* 36, 93–106. <https://doi.org/10.1002/bies.201300108>
- Speights, C.J., Harmon, J.P., Barton, B.T., 2017. Contrasting the potential effects of daytime versus nighttime warming on insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.06.005>
- Sperry, J.H., Weatherhead, P.J., 2008. Prey-mediated effects of drought on condition and survival of a terrestrial snake. *Ecology* 89, 2770–2776. <https://doi.org/10.1890/07-2017.1>
- Spinoni, J., Vogt, J. V., Naumann, G., Barbosa, P., Dosio, A., 2018. Will drought events become more frequent and severe in Europe? *Int. J. Climatol.* 38, 1718–1736. <https://doi.org/10.1002/joc.5291>
- Spotila, J.R., 1972. Role of Temperature and Water in the Ecology of Lungless Salamanders. *Ecol. Monogr.* 42, 95–125. <https://doi.org/10.2307/1942232>
- Spotila, J.R., Berman, E.N., 1976. Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 55, 407–411. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(76\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(76)90069-4)
- Stahlschmidt, Z.R., Brashears, J., DeNardo, D.F., 2011. The role of temperature and humidity in python nest site selection. *Anim. Behav.* 81, 1077–1081. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2011.02.024>
- Stahlschmidt, Z.R., Hoffman, T.C.M., DeNardo, D.F., 2008. Postural Shifts During Egg-Brooding and Their Impact on Egg Water Balance in Children’s Pythons (*Antaresia childreni*). *Ethology* 114, 1113–1121. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0310.2008.01553.X>
- Stahlschmidt, Z.R., Jodrey, A.D., Luoma, R.L., 2015. Consequences of complex environments: Temperature and energy intake interact to influence growth and metabolic rate. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 187, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.04.007>
- Stearns, S.C., 1989. Trade-Offs in Life-History Evolution. *Funct. Ecol.* 3, 259. <https://doi.org/10.2307/2389364>
- Stewart, J.R., 2013. Fetal nutrition in lecithotrophic squamate reptiles: Toward a comprehensive model for evolution of viviparity and placentation. *J. Morphol.* <https://doi.org/10.1002/jmor.20141>
- Stier, A., Dupoué, A., Picard, D., Angelier, F., Brischoux, F., Lourdais, O., 2017. Oxidative stress in a capital breeder (*Vipera aspis*) facing pregnancy and water constraints. *J. Exp. Biol.* 220, 1792–1796. <https://doi.org/10.1242/jeb.156752>
- Stillman, J.H., 2019. Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. *Physiology.* <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2018>
- Suggitt, A.J., Wilson, R.J., Isaac, N.J.B., Beale, C.M., Auffret, A.G., August, T., Bennie, J.J., Crick, H.Q.P., Duffield, S., Fox, R., Hopkins, J.J., Macgregor, N.A., Morecroft, M.D., Walker, K.J., Maclean, I.M.D., 2018. Extinction risk from climate change is reduced by microclimatic buffering. *Nat. Clim. Chang.* 2018 88 8, 713–717. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0231-9>

- Sultan, S.E., 2017. Developmental plasticity: Re-conceiving the genotype. *Interface Focus*. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2017.0009>
- Sunday, J.M., Bates, A.E., Kearney, M.R., Colwell, R.K., Dulvy, N.K., Longino, J.T., Huey, R.B., 2014. Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 5610–5615. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316145111>
- Sutanto, S.J., Vitolo, C., Di Napoli, C., D’Andrea, M., Van Lanen, H.A.J., 2020. Heatwaves, droughts, and fires: Exploring compound and cascading dry hazards at the pan-European scale. *Environ. Int.* 134, 105276. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.105276>
- Terblanche, Klok, C.J., Krafur, E.S., Chown, S.L., 2006. Phenotypic Plasticity and Geographic Variation in Thermal Tolerance and Water Loss Of The Tsetse *Glossina pallidipes* (Diptera : Glossinidae): Implications For Distribution Modelling. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 786–794. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.786>
- Terrien, J., Perret, M., Aujard, F., 2011. Behavioral thermoregulation in mammals: a review. *Front. Biosci. (Landmark Ed.* 16, 1428–1444. <https://doi.org/10.2741/3797>
- Thompson, M.B., Speake, B.K., 2002. Energy and nutrient utilisation by embryonic reptiles, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. Elsevier Inc., pp. 529–538. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00188-5)
- Tieleman, B.I., Williams, J.B., 2015. Cutaneous and respiratory water loss in larks from arid and mesic environments. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 590–9. <https://doi.org/10.1086/344491>
- Tieleman, B.I., Williams, J.B., Visser, G.H., 2003. Variation in allocation of time, water and energy in Hoopoe Larks from the Arabian Desert. *Funct. Ecol.* 17, 869–876. <https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2003.00801.x>
- Todgham, A.E., Stillman, J.H., 2013. Physiological Responses to Shifts in Multiple Environmental Stressors: Relevance in a Changing World. *Integr. Comp. Biol.* 53, 539–544. <https://doi.org/10.1093/ICB/ICT086>
- Torri, C., Mangoni, A., Teta, R., Fattorusso, E., Alibardi, L., Fermani, S., Bonacini, I., Gazzano, M., Burghammer, M., Fabbri, D., Falini, G., 2014. Skin lipid structure controls water permeability in snake molts. *J. Struct. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.10.007>
- Tracy, R., Walsberg, G., 2001. Developmental and acclimatory contributions to water loss in a desert rodent: investigating the time course of adaptive change. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 171, 669–679. <https://doi.org/10.1007/s003600100218>
- Trenberth, K.E., Dai, A., van der Schrier, G., Jones, P.D., Barichivich, J., Briffa, K.R., Sheffield, J., 2014a. Global warming and changes in drought. *Nat. Clim. Chang.* 4, 17–22. <https://doi.org/10.1038/nclimate2067>
- Trivers, R.L., 1974. Parent-Offspring Conflict. *Am. Zool.* 14, 249–264. <https://doi.org/10.1093/icb/14.1.249>
- Tsuji, J.S., 1988. Thermal Acclimation of Metabolism in *Sceloporus* Lizards from Different Latitudes. *Physiol. Zool.* 61, 241–253. <https://doi.org/10.1086/physzool.61.3.30161237>
- Tsuji, Y., Prayitno, B., Widayati, K.A., Suryobroto, B., 2018. Mass Mortality of Wild Malayan Flying Lemurs (*Galeopterus variegatus*) and Its Underlying Causes. *Mammal Study* 43, 1–5. <https://doi.org/10.3106/ms2017-0071>
- Tsunoda, M., Newman, C., Buesching, C.D., Macdonald, D.W., Kaneko, Y., 2018. Badger setts provide thermal refugia, buffering changeable surface weather conditions. *J. Therm. Biol.* 74, 226–233. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2018.04.005>
- Tu, M.C., Lillywhite, H.B., Menon, J.G., Menon, G.K., 2002. Postnatal ecdysis establishes the permeability barrier in snake skin: new insights into barrier lipid structures | *Journal of Experimental Biology. J. Exp. Biol.* 3019–3030.

- Turlure, C., Choutt, J., Baguette, M., Van Dyck, H.A.N.S., 2010. Microclimatic buffering and resource-based habitat in a glacial relict butterfly: significance for conservation under climate change. *Glob. Chang. Biol.* 16, 1883–1893. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2486.2009.02133.X>
- Uchiyama, M., Maejima, S., Wong, M.K.S., Preyavichyapugdee, N., Wanichanon, C., Hyodo, S., Takei, Y., Matuda, K., 2014. Changes in plasma angiotensin II, aldosterone, arginine vasotocin, corticosterone, and electrolyte concentrations during acclimation to dry condition and seawater in the crab-eating frog. *Gen. Comp. Endocrinol.* 195, 40–46. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2013.10.013>
- Uller, T., 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends Ecol. Evol.* 23, 432–438. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2008.04.005>
- Uller, T., Nakagawa, S., English, S., 2013. Weak evidence for anticipatory parental effects in plants and animals. *J. Evol. Biol.* 26, 2161–2170. <https://doi.org/10.1111/JEB.12212>
- Ummenhofer, C.C., Meehl, G.A., 2017. Extreme weather and climate events with ecological relevance: A review. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0135>
- Urban, M.C., 2015. Accelerating extinction risk from climate change. *Science* (80-.). 348, 571–573. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA4984>
- Urban, M.C., Richardson, J.L., Freidenfelds, N.A., 2014. Plasticity and genetic adaptation mediate amphibian and reptile responses to climate change. *Evol. Appl.* <https://doi.org/10.1111/eva.12114>
- Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelstrom, H., Fumagalli, L., 2006. Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Ecol.* 15, 3425–3437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03031.x>
- van de Pol, M., Jenouvrier, S., Cornelissen, J.H.C., Visser, M.E., 2017. Behavioural, ecological and evolutionary responses to extreme climatic events: challenges and directions. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160134. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0134>
- van de Pol, M., Wright, J., 2009. A simple method for distinguishing within- versus between-subject effects using mixed models. *Anim. Behav.* 77, 753–758. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2008.11.006>
- Vasseur, D.A., DeLong, J.P., Gilbert, B., Greig, H.S., Harley, C.D.G., McCann, K.S., Savage, V., Tunney, T.D., O'Connor, M.I., 2014. Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2612>
- Vergauwen, L., Benoot, D., Blust, R., Knapen, D., 2010. Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 157, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.160>
- Verheyen, J., Stoks, R., 2019. Temperature variation makes an ectotherm more sensitive to global warming unless thermal evolution occurs. *J. Anim. Ecol.* 88, 624–636. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12946>
- Vickers, M., Manicom, C., Schwarzkopf, L., 2011. Extending the cost-benefit model of thermoregulation: High-temperature environments. *Am. Nat.* 177, 452–461. <https://doi.org/10.1086/658150/ASSET/IMAGES/LARGE/FG6.JPEG>
- Vincent, S.E., Mori, A., 2007. Determinants of feeding performance in free-ranging pit-vipers (*Viperidae*: *Ovophis okinavensis*): key roles for head size and body temperature. *Biol. J. Linn. Soc.* 93, 53–62. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00928.x>
- Walker, R.S., Gurven, M., Burger, O., Hamilton, M.J., 2007. The trade-off between number

- and size of offspring in humans and other primates. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 827–833. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2007.1511>
- Wang, Z., Mei, W., I, X.J., 2009. Temperature acclimation affects thermal preference and tolerance in three *Eremias* lizards (*Lacertidae*). *Curr. Zool.* 55, 258–265.
- Warner, D.A., Shine, R., 2008. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature* 451, 566–568. <https://doi.org/10.1038/nature06519>
- Webb, J.K., Whiting, M.J., 2005. Why don't small snakes bask? Juvenile broad-headed snakes trade thermal benefits for safety. *Oikos* 110, 515–522. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13722.x>
- West-Eberhard, M.J., 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.
- While, G.M., Noble, D.W.A., Uller, T., Warner, D.A., Riley, J.L., Du, W.-G., Schwanz, L.E., 2018. Patterns of developmental plasticity in response to incubation temperature in reptiles. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.* 329, 162–176. <https://doi.org/10.1002/jez.2181>
- White, C.R., Marshall, D.J., Alton, L.A., Arnold, P.A., Beaman, J.E., Bywater, C.L., Condon, C., Crispin, T.S., Janetzki, A., Pirtle, E., Winwood-Smith, H.S., Angilletta, M.J., Chenoweth, S.F., Franklin, C.E., Halsey, L.G., Kearney, M.R., Portugal, S.J., Ortiz-Barrientos, D., 2019. The origin and maintenance of metabolic allometry in animals. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 598–603. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0839-9>
- Williams, S.E., Shoo, L.P., Isaac, J.L., Hoffmann, A.A., Langham, G., 2008. Towards an Integrated Framework for Assessing the Vulnerability of Species to Climate Change. *PLOS Biol.* 6, e325. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0060325>
- Wilson, R.S., Franklin, C.E., 2002. Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17, 66–70. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02384-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02384-9)
- Wingfield, J.C., 2013. Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Funct. Ecol.* 27, 37–44. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12039>
- Wingfield, J.C., Kelley, J.P., Angelier, F., 2011. What are extreme environmental conditions and how do organisms cope with them? *Curr. Zool.* 57, 363–374. <https://doi.org/10.1093/czoolo/57.3.363>
- Wingfield, J.C., Maney, D.L., Breuner, C.W., Jacobs, J.D., Lynn, S., Ramenofsky, M., Richardson, R.D., 1998. Ecological Bases of Hormone—Behavior Interactions: The “Emergency Life History Stage.” *Integr. Comp. Biol.* 38, 191–206. <https://doi.org/10.1093/ICB/38.1.191>
- Wingfield, J.C., Pérez, J.H., Krause, J.S., Word, K.R., González-Gómez, P.L., Lisovski, S., Chmura, H.E., 2017. How birds cope physiologically and behaviourally with extreme climatic events. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160140. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0140>
- Wingfield, J.C., Sapolsky, R.M., 2003. Reproduction and Resistance to Stress: When and How. *J. Neuroendocrinol.* 15, 711–724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01033.x>
- Winne, C.T., Willson, J.D., Gibbons, J.W., 2010. Drought survival and reproduction impose contrasting selection pressures on maximum body size and sexual size dimorphism in a snake, *Seminatrix pygaea*. *Oecologia* 162, 913–922. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1513-8>
- Winne, C.T., Willson, J.D., Gibbons, J.W., 2006. Income breeding allows an aquatic snake *Seminatrix pygaea* to reproduce normally following prolonged drought-induced aestivation. *J. Anim. Ecol.* 75, 1352–1360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01159.x>
- Wolcott, T.G., Wolcott, D.L., 2001. Role of Behavior in Meeting Osmotic Challenges. *Integr. Comp. Biol.* 41, 795–806. <https://doi.org/10.1093/ICB/41.4.795>

- Wong, B.B.M., Candolin, U., 2015. Behavioral responses to changing environments. *Behav. Ecol.* 665–673. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru183>
- Wood, M., Chamailé-Jammes, S., Hammerbacher, A., Shrader, A.M., 2021. African elephants can detect water from natural and artificial sources via olfactory cues. *Anim. Cogn.* 2021 1–9. <https://doi.org/10.1007/S10071-021-01531-2>
- Woods, H.A., Dillon, M.E., Pincebourde, S., 2015. The roles of microclimatic diversity and of behavior in mediating the responses of ectotherms to climate change. *J. Therm. Biol.* 54, 86–97. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2014.10.002>
- Woods, H.A., Pincebourde, S., Dillon, M.E., Terblanche, J.S., 2021. Extended phenotypes: buffers or amplifiers of climate change? *Trends Ecol. Evol.* 36, 889–898. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2021.05.010>
- Woods, H.A., Smith, J.N., 2010a. Universal model for water costs of gas exchange by animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8469–8474. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905185107>
- Woods, H.A., Smith, J.N., 2010b. Universal model for water costs of gas exchange by animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8469–8474. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905185107>
- Wright, C.D., Jackson, M.L., DeNardo, D.F., 2013. Meal consumption is ineffective at maintaining or correcting water balance in a desert lizard, *Heloderma suspectum*. *J. Exp. Biol.* 216, 1439–1447. <https://doi.org/10.1242/jeb.080895>
- Xie, H., Lü, X., Zhou, J., Shi, C., Li, Y., Duan, T., Li, G., Luo, Y., 2017. Effects of acute temperature change and temperature acclimation on the respiratory metabolism of the snakehead. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 17, 535–542. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_3_10
- Xie, S.P., Deser, C., Vecchi, G.A., Collins, M., Delworth, T.L., Hall, A., Hawkins, E., Johnson, N.C., Cassou, C., Giannini, A., Watanabe, M., 2015. Towards predictive understanding of regional climate change. *Nat. Clim. Chang.* 2015 5, 921–930. <https://doi.org/10.1038/nclimate2689>
- Žagar, A., Carretero, M.A., Marguč, D., Simčič, T., Vrezec, A., 2018. A metabolic syndrome in terrestrial ectotherms with different elevational and distribution patterns. *Ecography (Cop.)*. 41, 1728–1739. <https://doi.org/10.1111/ecog.03411>
- Zani, P.A., Stein, S.J., 2018. Field and laboratory responses to drought by Common Side-blotched Lizards (*Uta stansburiana*). *J. Arid Environ.* 154, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2018.03.001>
- Zari A., T., 1996. Seasonal metabolic compensation in the fringe-toed lizard, *acanthodactylus boskianus* (reptilia: lacertidae). *J. Therm. Biol.* 145–150.
- Zellweger, F., de Frenne, P., Lenoir, J., Vangansbeke, P., Verheyen, K., Bernhardt-Römermann, M., Baeten, L., Hédli, R., Berki, I., Brunet, J., van Calster, H., Chudomelová, M., Decocq, G., Dirnböck, T., Durak, T., Heinken, T., Jaroszewicz, B., Kopecký, M., Máliš, F., Macek, M., Malicki, M., Naaf, T., Nagel, T.A., Ortmann-Ajkai, A., Petřík, P., Pielech, R., Reczynska, K., Schmidt, W., Standovár, T., Swierkosz, K., Teleki, B., Vild, O., Wulf, M., Coomes, D., 2020. Forest microclimate dynamics drive plant responses to warming. *Science (80-.)*. 368, 772–775. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA6880/SUPPL_FILE/ABA6880-ZELLWEGER-SM.PDF
- Zera, A.J., Harshman, L.G., 2003. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114006> 32, 95–126. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.32.081501.114006>
- Zhang, Q., Han, X., Hao, X., Ma, L., Li, S., Wang, Y., Du, W., 2018. A simulated heat wave shortens the telomere length and lifespan of a desert lizard. *J. Therm. Biol.* 72, 94–100.

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.01.004>

Zuffi, M.A.L., Gentili, A., Cecchinelli, E., Pupin, F., Bonnet, X., Filippi, E., Luiselli, L.M., Barbanera, F., Dini, F., Fasola, M., 2009. Geographic variation of body size and reproductive patterns in Continental versus Mediterranean asp vipers, *Vipera aspis*. *Biol. J. Linn. Soc.* 96, 383–391. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8312.2008.01124.X>

Résumé :

Le changement climatique conduit à des modifications à long terme des températures et des précipitations à l'échelle globale, mais aussi à des événements extrêmes plus fréquents et plus intenses. Alors que les réponses des ectothermes aux conditions thermiques ont attiré un intérêt considérable, les réponses physiologiques et comportementales aux contraintes hydriques demeurent peu considérées. Pourtant, comprendre les réponses écologiques au changement climatique requiert de considérer les effets des contraintes thermiques et hydriques combinées et de clarifier les interactions entre thermorégulation et hydrorégulation. L'hypothèse générale de ma thèse est que les mécanismes de régulation physiologique et comportementale des balances thermique et hydrique sont étroitement liés. A travers des approches expérimentales, j'ai documenté les réponses physiologiques et comportementales aux contraintes climatiques de deux ectothermes terrestres, la vipère péliade (*Vipera berus*) et la vipère aspic (*Vipera aspis*), sur de pas de temps allant de semaines à plusieurs années, en dehors et pendant la reproduction. Mes résultats démontrent que les régulations des balances thermique et hydrique interagissent et intègrent des mécanismes proximaux partagés. J'ai documenté des effets essentiellement additifs des contraintes thermiques et hydriques combinées sur la physiologie, et une sensibilité hydrique prononcée pendant la reproduction de ces ectothermes vivipares. J'ai démontré des comportements d'hydrorégulation en réponse à la déshydratation individuelle : les organismes peuvent atténuer les effets des contraintes sur la physiologie en limitant leur exposition par la sélection de microclimats humides, ou si l'évitement est impossible, rétablir leur balance hydrique après l'exposition aux contraintes. L'ensemble de mes travaux suggèrent l'importance de considérer les effets des contraintes hydriques sur les ectothermes, et leur capacité à y répondre par des ajustements physiologiques et comportementaux pour mieux comprendre et prédire les réponses des ectothermes terrestres face au changement climatique.

Mots clés : [balance hydrique ; comportement ; développement ; hydrorégulation ; microclimat ; performances ; physiologie ; plasticité phénotypique ; reproduction ; thermorégulation]

[Water and thermal constraints associated with climate change: physiological and behavioral responses in two viviparous snakes]

Abstract :

Climate change is leading to long-term changes in global temperature and precipitation, but also to more frequent and intense extreme weather events. While the responses of ectotherms to thermal conditions have attracted considerable interest, physiological and behavioral responses to water constraints are seldomly considered. Yet, understanding the ecological responses to climate change requires the consideration of the combined effects of thermal and water stressors and clarification of the interactions between thermoregulation and hydoregulation. The general hypothesis of my thesis is that the physiological and behavioral mechanisms of thermal and water balance regulation are closely linked. Through experimental approaches, I have documented the physiological and behavioral responses to climatic constraints of two terrestrial ectotherms, the European adder (*Vipera berus*) and the asp viper (*Vipera aspis*), over time scales ranging from weeks to several years, both during and outside of reproduction. My results demonstrate that thermal and water balance regulations interact and incorporate shared proximal mechanisms. I found that there were predominantly additive effects of combined thermal and water constraints on physiology, and pronounced sensitivity to water constraints during reproduction in these viviparous ectotherms. I also demonstrated that individuals exhibit behavioral hydoregulation in response to dehydration: organisms can mitigate the effects of water stress on physiology by limiting their exposure through the selection of moist microclimates or, if avoidance is impossible, restore their water balance after stress exposure. Altogether, my work illustrates the importance of considering the effects of water constraints on ectotherms, and their ability to respond through physiological and behavioral adjustments, in order to better understand and predict the responses of terrestrial ectotherms to climate change.

Keywords : [water balance; behaviour ; development ; hydoregulation; microclimate; performance; physiology; phenotypic plasticity; reproduction; thermoregulation]