LA ROCHELLE UNIVERSITE

ÉCOLE DOCTORALE
Euclide

Laboratoire Centre d'Etudes Biologiques de Chizé

THÈSE

présentée par :

Léa LANGE

soutenue le 30 septembre 2020
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biologie des Organismes

Influences environnementales précoces et plasticité phénotypique : étude d'un modèle amphibien avec soins parentaux prénataux, l'Alyte accoucheur

© M. Berroneau

JURY :

Rafael MARQUEZ	Directeur de Recherche, CSIC,	Rapporteur
Marie TRABALON	Professeure, EthoS, Université de Rennes 1,	Rapportrice
Claire DOUTRELANT	Directrice de Recherche, CEFE, Université de Montpellier,	Examinatrice
Yann VOITURON	Professeur, LEHNA, Université de Lyon 1,	Examinateur
Olivier LOURDAIS	Chargé de Recherche, CEBC, La Rochelle Université,	Directeur de thèse
François BRISCHOUX	Chargé de Recherche, CEBC, La Rochelle Université,	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de thèse, Olivier Lourdais et mon co-directeur de thèse, François Brischoux, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci d'avoir, entre autres, passé du temps à relire mes différents travaux au cours de cette thèse.

Je remercie mes rapporteurs et examinateurs, Claire Doutrelant, Rafael Márquez, Marie Trabalon et Yann Voituron, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie Christophe Guinet, et antérieurement Xavier Bonnet, (directeurs), ainsi que Charline Parenteau (directrice adjointe), de m'avoir accueillie au sein du CEBC.

Je remercie l'université de La Rochelle et l'Ecole doctorale Euclide, sa direction, Karim Aït-Mokhtar et David Waterman, et le référent Environnement, Paco Bustamante, pour leur gestion de la structure nous permettant de réaliser nos thèses. Je les remercie également pour ma bourse de thèse et d'avoir cofinancé (avec le CEBC) ma formation *Expérimentation sur Faune Sauvage Non-Hébergée*.

Je remercie La Rochelle Université, le CNRS, la région Nouvelle-Aquitaine pour leurs différents financements et supports techniques qui ont permis la réalisation des expérimentations de cette thèse.

Je remercie la scierie « Marteau-Bois » de Villiers-en-Bois de m'avoir donné accès à leur site et pour leur bienveillance envers les petits alytes qui colonisent leur site. Je remercie également Alexandre Boissinot d'avoir découvert ce site d'étude.

Je remercie Olivier Marquis pour ses conseils au sujet de la maintenance et de l'écologie des Alytes accoucheurs.

Je remercie l'équipe écophy, son chef d'équipe, Olivier Chastel, ainsi que les permanents de l'équipe, Frédéric Angelier, Xavier Bonnet, François Brischoux, Pierre Legagneux, Olivier Lourdais et Bruno Michaud de m'avoir accueillie dans l'équipe. Je garderai, entre autres, un bon souvenir du colloque de la CEPA.

Je remercie Lauriane Bégué. Tu m'as accompagnée au cours de mes trois années de thèse. Ton investissement a été ENORME et sans toi, cette thèse aurait été complètement différente. Plus important que tout, tu es devenue une amie.

Je remercie Elsa Daniaud. Sans toi non plus cette thèse n'aurait pas été la même et surtout, la dernière manip n'aurait jamais pu durer 1 an et demi. Merci d'avoir tenu bon malgré la montagne temporelle que cela représentait.

Je remercie tous mes stagiaires, Lauriane Bégué, Juliane Demellier, Sébastien Jacquot, Mylène Lecaer, Lisa Poncet, Juliette Scheuer et Samuel Tersigni. Cette thèse contient des petits bouts de chacun de vos investissements. Je vous souhaite d'atteindre tous vos objectifs professionnels et personnels.

Je remercie Guillaume Mercier pour le travail de terrain m'ayant permis de rédiger mon premier article de thèse.

Je remercie toutes les personnes ayant contribué un peu, beaucoup, passionnément, voire à la folie, à mes expérimentations. En plus de celles précédemment remerciées, sont également à citer : Erika Beaugeard, Patrice Denis, Simon Denis, Mathias Dezetter, Sophie Dupont, Rodrigo Gavira, Arthur Huard, Bruno Michaud, Christian Thiburce, Robin Viton (et sûrement d'autres que j'aurai oublié … 3 ans, c'est LONG).

Je remercie mes colloques de bureau, Stéphane Lecq, Mathias Dezetter, George Brush et plus particulièrement Rodrigo Gavira ; tu as toujours su être là, dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu auras toujours un pied-à-terre en France !

Je remercie le département de biologie de La Rochelle Université, Mickael Airaud, Françoise Amelineau, Anne Aubert, Pierrick Bocher, Denis Fichet, Nathalie Imbert, Christine Kubicek Trichet, Vincent Le Fouest, Karine Monceau, Gilles Radenac, Benoit Simon Bouhet, Cécile Vincent, et tous ceux que j'oublie, de m'avoir aidée à faire mes premiers pas dans l'enseignement.

Je remercie tous mes anciens responsables de stage, Astrid Clavé-Letourneur, Eric Delcroix, Martine Hausberger, Laurence Henry, Erick Letourneur, Anne-Sophie Leze, Richard Preziosi, Sonia Said et Craig Symes. Vous m'avez tous donné, chacun à votre façon, l'envie, la motivation et les compétences pour me lancer dans la grande épreuve de la thèse.

Je remercie Paco Bustamante et Christelle Lefrançois pour leurs conseils lors de mon comité de thèse de 2ème année.

Je remercie Christian Goichon. J'ai adoré faire *Ma thèse en 180 secondes* à tes côtés. C'était vraiment une super aventure et ça a grandement influencé mes choix professionnels.

Je remercie Frédérique Deloffre-Vye. Vous avez su trouver et mettre les bons mots sur des pensées qui parcouraient mon esprit depuis longtemps. La formation *Nouveau Chapitre de Thèse* que vous dispensez est, je pense, une véritable chance offerte à tous les doctorants de La Rochelle Université.

Je remercie David Pinault de m'avoir ouvert les portes des statistiques par le biais de ses formations toujours très pédagogiques.

Je remercie Pierre-Yves Henry, pour son impressionnante gestion de la formation *Expérimentation sur Faune Sauvage Non-Hébergée*, et pour son investissement dans l'amélioration du bien-être animal au cours des expérimentations scientifiques.

Je remercie Fernando Pedraza-Diaz d'organiser les activités transversales de l'ED Euclide, que j'ai trouvées très enrichissantes.

Je remercie tous les permanents du CEBC d'une manière générale, et particulièrement toutes les personnes de l'administration : Delphine, Marlène, Martine et Pascale ; de la gestion informatique : Arnaud ; du service logistique : Patrice et Simon ; des élevages : Christian et Elsa ; et de la restauration : Christophe, Arnaud et Charles-Ellie. Vous nous facilitez vraiment la vie au quotidien.

Je remercie l'administration de l'Ecole Doctorale Euclide, Isabelle Hirsch et Jennifer de la Corte Gomez de nous aider à gérer la montagne administrative que représente une thèse.

Je remercie le colloque GTMF et plus particulièrement Jacques Fretey. C'était super de te rencontrer et j'espère qu'on se recroisera bientôt. Ce colloque a été une vraie bonne petite pause dans ma thèse. C'était aussi super chouette de t'y recroiser Sophie Le Loc'h. Toi aussi j'espère te revoir très prochainement. N'hésite pas à passer nous voir à Nantes quand tu reviens en métropole !

Je remercie les photographes et illustrateurs de cette thèse, Lauriane Bégué, Xaali Berkeley O'Reilly, Matthieu Berroneau, Marine Cuminet et Maxime Passerault.

Je remercie tous les gens que j'ai pu (re)croiser, rencontrer, (re)côtoyer, (ré)apprendre à connaitre au cours de cette thèse, Adrien B., Adrien P., Alex, Baptiste, Bertille, Candice, Carin, Carolina, Cécile, Christophe, David, Erika, Eugénie, Florian, Gaëtan, Jade, Joris, Julie, Juliette, Karine, Léa, Léopold, Lucas (#MMA), Manrico, Marie, Marine, Marion, Martin, Mathias, Matthias, Maxime R., Meumeu, Nathan, Pierre, Pierre-Loup, Rémi, Ryan, Sophie, Tim, William, et évidement tous ceux que j'aurais oubliés, car c'est certain j'en aurai oublié (Ne m'en voulez pas svp ! Vous êtes tous au courant

de ma cervelle de moineau pour me souvenir des gens et des prénoms !!). Toutes ces rencontres, c'est incontestablement le point positif de ma thèse.

Je remercie ma promo de thésards, Alex, Candice, Christophe, Erika, Julie et Max. Je n'imagine même pas avoir à vivre tout ça sans personne qui vivrait la même chose à nos côtés au même moment. Je crois qu'on peut tous être fiers de nous-même. En tout cas, moi, je suis fière de nous tous !

Je remercie Erika, Juyette et Sophie mes supers copines de cette aventure. On s'est un peu perdues cette dernière année mais j'espère qu'on arrivera enfin à se faire notre pyjama party très vite !

Je remercie les collègues de l'OFB, anciennement ONCFS, Alexis, Antoine, Cyril, Damien, Hervé et Hervé, Maxime, Sophie et Yoan d'avoir, entre autres, supporté ma présence à votre table durant les périodes où le restaurant du labo était fermé.

Je remercie les gens du club d'escalade de Brioux, et surtout Charly, Maëva, Urbain, Sylvain et Théo. Les moments avec vous au pan me faisaient vraiment respirer.

Je remercie tous les copains de Maxime pour les supers vacances dans le Diois. J'étais très heureuse de vous rencontrer et j'espère que ce n'était que le début de nos escapades montagneuses.

Je remercie mes amis de longue date, Antoine, Camillou, Gaby, Elo, Michael, Marinette, Valou et Xaali. Je vous ai clairement beaucoup trop délaissés pendant cette thèse, mais vous êtes toujours là, fidèles au poste. Promis je vais me rattraper !

Je remercie Soazic. Je suis super heureuse que l'on se soit un petit peu retrouvées. J'espère te voir bientôt, et je te souhaite tout le bonheur possible avec ton petit Aaron et ton chéri.

Je remercie mes frère et sœur, mes merveilleux neveux et nièces, mon tonton et ma tatie, ma mamie, mes cousins préférés (ouai, si, on a le droit d'avoir des préférés :D) et ma famille en général. Vous aussi je vous ai délaissés mais, comme mes amis, vous êtes restés. Vous êtes mes piliers, mes modèles et sans vous, je ne serais pas qui je suis aujourd'hui.

Je remercie mon papa, ma sœur et Maxime pour leurs relectures de mon manuscrit de thèse.

Je remercie toute la famille Passerault. Vous m'avez tous accueillie à bras ouverts et j'ai vraiment de la chance d'avoir une belle-famille aussi chouette !

Je remercie mes parents. Je ne le dirai jamais assez, mais j'ai une chance inouïe de vous avoir. Vous n'êtes évidemment pas parfaits, mais je crois qu'il suffit de regarder vos trois enfants pour être convaincu que vous avez été et que vous êtes de merveilleux parents.

Je remercie Maxime. Je ne m'étalerai pas ici mais sans toi, je ne serais tout simplement pas allée au bout de cette thèse. Tu en mérites presque le statut de co-auteur, tant ton investissement a été démentiel. On va pouvoir souffler, vraiment commencer notre vie à tous les deux, et je sais que de merveilleuses aventures à tes côtés m'attendent.

CONTRIBUTION PERSONNELLE

Conception

J'ai participé à la conception des protocoles expérimentaux ainsi qu'à la construction des différents dispositifs de mesures comportementales (préférences thermiques, performances de locomotion).

Collecte de données

Les protocoles expérimentaux réalisés pour mesurer les performances de locomotion et les préférences thermiques (protocoles effectués en simultané) ont nécessité 4 mois de travail, comprenant le terrain pour les mesures thermiques et capturer les individus, les mesures comportementales en laboratoire et le traitement informatique des vidéos (24h30) et photos (783) recueillies pendant les mesures.

Le protocole expérimental pour mesurer l'impact du traitement thermique prénatal et celui pour mesurer l'influence croisée des traitements pré et postnataux ont représenté un investissement temporel respectif de 4 mois, 7 jours sur 7 en présentiel, et de 14 mois, dont 5 à 7 jours sur 7. Cela comprend le terrain pour capturer les individus, le soin aux animaux (nourrissage, changement d'eau, nettoyage des aquariums et terrariums individuels), les relevés phénologiques (2018 : suivi de 16 mâles puis 96 têtards ; 2019 : suivi de 30 mâles puis 270 têtards), ainsi que le traitement informatique des vidéos et images recueillies pendant les mesures morphométriques (2018 : 1013 photos) et comportementales (2018 : rythme cardiaque - 45 min ; locomotion (automatisé) - 48h). NB : en 2019 et 2020, ces mesures ont été réalisées en direct ou traitées informatiquement grâce à la participation de stagiaires.

J'ai participé activement à toutes ces étapes, mais j'ai également travaillé en équipe avec de nombreuses personnes qui me sont venues en aide au cours des expérimentations (stagiaires, CDD, techniciens expérimentation sur faune sauvage, doctorants, post-doctorants, …).

Analyse des données et rédaction d'articles scientifiques

J'ai réalisé les analyses statistiques et la rédaction de 3 articles scientifiques en premier auteur.

Encadrement

Au total, j'ai encadré 7 stagiaires (5 L3, 2 M1) dans le cadre de stages universitaires volontaires ou obligatoires, dont une étudiante sur trois périodes de stage différentes.

Enseignements

J'ai dispensé au total 92h30 d'enseignements dans diverses matières de L2 et L3, telles que « technique de laboratoire en physiologie végétale », « biologie animale », « biologie de la reproduction et développement, « physiologie végétale », « techniques biologiques », « physiologie de la reproduction » ou encore « stratégie d'échantillonnage », dans le cadre d'un contrat d'activités complémentaires au doctorat avec La Rochelle Université.

Formations

J'ai suivi plusieurs formations :

- Modélisation sur R (3 jours – 21 heures)
- Expérimentation sur faune sauvage non-hébergée (2 semaines - 57 heures)
- QGis (3 jours – 21 heures)
- MT180s (~20 heures)
- Colloque des 2èmes années (1 journée + ~20 heures)
- Nouveau chapitre de thèse (~1 journée)

ARTICLES INCLUS DANS CE MANUSCRIT

- Lange, L., Brischoux, F., Lourdais, O. (2020): Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties. *Amphibia-Reptilia*, *41*(2), 275-280. (ANNEXE 1)

- Lange, L., Bégué, L., Brischoux, F., Lourdais, O. *Submitted to Biologicial Journal of the Linnean Society*. The costs of being a good dad: egg-carrying and clutch size impair locomotor performances in males midwife toad, *Alytes obstetricans*. (ANNEXE 2)

- Lange, L., Brischoux, F., Lourdais, O. *In preparation for Animal Behaviour*. Benefits of paternal thermoregulation: male midwife toads select warmer temperatures to shorten embryonic development. (ANNEXE 3)

Ces articles sont présentés sous deux formats : dans le format de la thèse, intégrés aux chapitres, et dans leur version “finale, soumise ou en préparation”, en annexe.

.

PRESENTATIONS ORALES LORS DE CONGRES SCIENTIFIQUES

- 4ème Colloque d'Ecophysiologie Animale, Rennes, France, 2019. « Influences environnementales précoces et plasticité phénotypique : étude d'un modèle amphibien avec soins parentaux prénataux »

PARTICIPATION A DES ACTIONS DE COMMUNICATION SCIENTIFIQUE

- Création et animation d'un atelier à l'occasion de la fête de la science (ANNEXE 4)

- Participation au concours « Ma thèse en 180s » (ANNEXE 5)

- Présentation d'un poster au colloque de vulgarisation scientifique des doctorants de deuxième année de l'école doctorale Euclide – Prix du meilleur poster (ANNEXE 6)

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS i

CONTRIBUTION PERSONNELLE v

ARTICLES INCLUS DANS CE MANUSCRIT vii

PRESENTATIONS ORALES LORS DE CONGRES SCIENTIFIQUES ix

PARTICIPATION A DES ACTIONS DE COMMUNICATION SCIENTIFIQUE xi

TABLE DES MATIERES xiii

LISTE DES TABLEAUX xxi

LIST OF TABLES xxi

LISTE DES FIGURES xxiii

LISTE DES ABBREVIATIONS xxix

INTRODUCTION GENERALE 1

A. Variations environnementales et soins parentaux 3

1. Contraintes de l'environnement : fluctuations biotiques et abiotiques 3

2. Effets et soins parentaux 3

3. Approche coûts-bénéfices des influences parentales 6

a. Généralités 6

b. Bénéfices et implications évolutives 6

c. Coûts et compromis 8

B. Soins parentaux mâles et inversement des rôles sexuels 9

C. Diversification des soins et des rôles parentaux : le modèle amphibien 11

D. Les influences thermiques au cœur de l'évolution des ectothermes 14

1. Variations environnementales : importance de la température 14

2. La thermorégulation 14

3. Acclimatation et variations thermiques 15

4. Sensibilité du développement 16

a. Effets phénologiques 16

b. Effets phénotypiques à court et long termes 17
5. Les effets thermiques parentaux 19
E. Objectifs de la thèse 21
MATERIEL & METHODES 25
A. Origine et évolution des amphibiens 27
B. Cycle de vie 28
C. Le genre *Alytes* 29
D. Le crapaud accoucheur 32
1. Répartition 32
2. Morphologie et écologie 33
3. Reproduction 33
4. Développement des têtards 33
E. Le suivi de population 35
1. La population étudiée 35
2. Le marquage individuel des adultes 35
3. Refuges artificiels 36
4. Variables collectées sur le terrain 37
F. Dispositifs expérimentaux en laboratoire 38
1. Conditions de maintien en captivité 38
2. Le gradient thermique 40
3. Mesures de locomotion des adultes 41
a. Les performances de saut 41
b. Le temps de retournement 42
c. La réponse musculaire à la charge 43
d. La locomotion libre 43
4. Manipulation des conditions de développement 44
a. Enceintes climatiques et régimes thermiques imposés 44

b. Le suivi du développement 46
5. Mesures réalisées sur les œufs, les têtards, les métamorphes et les crapelets 47
a. Morphologie 47
b. Mesures de fréquences cardiaques 48
Au stade œuf 49
Au stade AAP 49
Au stade AMA 49
Aux stades postérieurs à la sortie de l'eau 50
c. Mesures de comportement chez les jeunes 51
Mesure de la locomotion au stade têtard 51
Mesure des performances de saut au stade crapelet 52
Mesure des préférences thermiques au stade métamorphe et crapelet 53
G. Résumé des variables collectées 53
CHAPITRE I : Caractérisation des contraintes thermiques 55
A. Préambule 57
B. Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties 58
1. Introduction 58
2. Materials and methods 59
3. Results 60
4. Discussion 63
C. Benefits of paternal thermoregulation: male midwife toads select warmer temperatures to shorten embryonic development 64
1. Introduction 64
2. Materials and methods 66
a. Study species 66
b. Study site and captures 66
c. Variables measured 67

Temperature measurements in the field 67
Thermal preferences in laboratory conditions 67
Thermal dependence of embryonic development 68
d. Statistics 68
3. Results 69
a. Phenology of carrying male observations 69
b. Variations in body temperatures 71
Determinant of field body temperatures 71
Thermal preference of carrying and non-carrying males 72
c. Influence of temperature on development duration 72
4. Discussion 73
5. Conclusion 76
CHAPITRE II : Coûts des soins parentaux, fécondité et désertion parentale 77
A. Préambule 79
B. The costs of being a good dad: egg-carrying and clutch size impair locomotor performances in males Midwife toad, *Alytes obstetricans* 80
1. Introduction 80
2. Materials and methods 82
a. Study species 82
b. Capture, housing and sex identification 82
c. Clutch size of carrying males 83
d. Locomotor performances 83
Hopping performance 83
Righting-response 83
Muscular response to egg burden 84
Volontary activity 84
e. Statistics 84

3. Results 85
a. Male morphology and clutch size 85
b. Influence of reproductive status on performances 86
Hopping performance 86
Righting-response 89
Muscular response to egg burden 91
Voluntary locomotion 91
c. Clutch desertion 92
Determinant of desertion 92
Influence on performances 92
4. Discussion 92
a. Locomotor costs of egg carrying 93
b. Clutch size-dependence of locomotor costs 93
c. Determinant of clutch desertion 94
d. Ecological and evolutionary implications 95
5. Conclusion 96
CHAPITRE III : Influences thermiques pré et postnatales sur le développement 97
A. Préambule 99
B. Influences à court terme et effets persistants sur le développement – Résultats préliminaires 99
1. Contexte général 99
2. Matériel et méthodes 101
a. Capture et maintenance 101
b. Plan expérimental 102
Traitements thermiques 102
Identification des stades de développement 103
c. Variables mesurées 104

Morphologie du père et taille des œufs 104
Stades et durées du développement 105
Mesures au cours du développement postnatal 105
Mesures un mois après la métamorphose 107
d. Analyses statistiques 108
3. Résultats 110
a. Durée de développement 110
Effet traitement 110
Effet de covariable 114
b. Phénotype 115
Morphologie 115
Physiologie 119
c. Performances 121
Performances de nage 121
Préférences thermiques 124
d. Mesures un mois après la métamorphose 125
Morphologie 125
Physiologie 125
Saut 126
Préférences thermiques 128
4. Discussion – Conclusion 139
a. Effets sur la durée de développement 139
b. Effets morphologiques 140
c. Effets physiologiques 141
d. Effets sur les performances 142
e. Effets sur les préférences thermiques 142
f. Effets persistants un mois après la sortie 142

SYNTHESE DES RESULTATS 145
A. Evidences de la sélection de l'habitat 147
B. Evidences de thermorégulation 147
C. Coûts des soins parentaux 148
1. Altération de la locomotion et déterminants de la désertion 148
2. Compromis basé sur la fécondité 148
D. Influences des conditions thermiques pré et post natales 149
1. Effet du traitement prénatal 149
2. Effet du traitement postnatal 149
3. Effets croisés des traitements pré et postnataux 150
DISCUSSION GENERALE 151
A. Soins parentaux et contraintes de la reproduction chez l'Alyte accoucheur 153
1. Evidences de la sélection d'habitat 153
2. Evidences de thermorégulation 154
3. Contraintes et coûts des soins parentaux 158
a. Altération de la locomotion 158
b. Compromis et désertion des pontes 160
B. Thermorégulation et sensibilité du développement 160
1. Effets parentaux 160
2. Sensibilité thermique de trajectoires de développement 162
3. Plasticité et voies de développement alternatives 163
C. Apports et spécificités du modèle Alytes 166
1. Implications évolutives potentielles 166
2. Influences environnementales et modulation des soins paternels 168
D. Perspectives 170
1. Fluctuations thermiques 170
2. Corrélats physiologiques et hormonaux 171

3. Implications de l'habitat et des conditions climatiques 172
E. Conclusion générale 174
BIBLIOGRAPHIE 175
ANNEXE 1 : Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties 207
ANNEXE 2 : Benefits of paternal thermoregulation: male midwife toads select warmer temperatures to shorten embryonic development 213
ANNEXE 3 : The costs of being a good dad: egg-carrying and clutch size impair locomotor performances in males Midwife toad, *Alytes obstetricans* 246
ANNEXE 4 : Visuels créés pour l'animation d'un atelier dans le cadre de la fête de la science 288
ANNEXE 5 : Participation au concours MT180s (capture d'écran, lien et visuel) 289
ANNEXE 6 : Poster réalisé pour le colloque de vulgarisation scientifique des doctorants de 2ème année de l'école doctorale Euclide – Prix du meilleur poster 290

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Tableau récapitulatif des données collectées et de leur utilisation. 53
Tableau 2. Tableau de synthèse des résultats aux analyses statistiques du chapitre III. 129

LIST OF TABLES

Table 1. Statistical models used to test for the influence of refuge type and substrate on toad presence and abundance. 62
Table 2. Statistical output of the models used to test for the influence of reproductive status (deserting males not included), SVL, and trial on midwife toad locomotor performances. 88
Table 3. Statistical output of the models used to test for the influence of relative clutch size (RCS), SVL, and trial on locomotor performances in carrying males. 89

LISTE DES FIGURES (LIST OF FIGURES)

Figure 1. Evolution des diverses stratégies de soins parentaux dans le règne animal. 5
Figure 2. Exemple d'une approche coûts-bénéfices hypothétique pour expliquer l'émergence des comportements parentaux chez Eutropis longicaudata. 6
Figure 3. Exemple de l'amélioration de la survie des jeunes grâce aux soins parentaux chez la grenouille de verre (Ikakogi tayrona). 7
Figure 4. Exemple de coût de la reproduction sur la longévité chez Euprymna tasmanica. 8
Figure 5. Exemples de soins parentaux mâles. 9
Figure 6. Exemples de soins parentaux chez les amphibiens. 11
Figure 7. Exemple de taux des réactions chimiques en fonction de la température chez des ectothermes. 14
Figure 8. Effet de la température sur la vitesse de nage maximum sur les têtards de Xenopus laevis acclimatés à 12°C ou 30°C pour une période de 4 semaines (n =12). 15
Figure 9. Durée de gestation en fonction du traitement thermique chez Vipera aspis. 16
Figure 10. Taux de croissance et de développement de copépodes en fonction de la température. 18
Figure 11. Relation entre température ambiante, taille de ponte et probabilité d'arrêter les soins chez Belostoma flumineum. 20
Figure 12. Relations entre les tétrapodes 27
Figure 13. Cadre conceptuel montrant les effets prolongés (positifs '+' ou négatifs '-') des conditions environnementales pendant la croissance larvaire sur les traits relatifs à l'aptitude, les traits comportementaux et les traits de locomotion. 28
Figure 14. Morphologie des Alytes. 29
Figure 15. Distribution des cinq espèces d'Alytes et des quatre sous-espèces d'Alytes obstetricans. 30
Figure 16. Photo d'un crapaud accoucheur mâle portant sa ponte accrochée à ses membres postérieurs. 31
Figure 17. Cycle de vie du crapaud accoucheur. 32
Figure 18. Table de développement des têtards d'Alytes obstetricans à une température constante de 20°C. 34
Figure 19. Photo de terrain de la population étudiée. 35
Figure 20. Photo d'un nano transpondeur utilisé pour le marquage individuel. 36

Figure 21. Photo d'une série de 4 refuges artificiels placés sur le site d'étude en 2016 présentant les 2x2 modalités. 36
Figure 22. Photo des refuges artificiels placés sur le site d'étude en 2017 présentant les trois modalités. 37
Figure 23. Schéma des points de prise de température du substrat sous les refuges artificiels. 37
Figure 24. Photo d'un terrarium individuel pour mâle adulte. 38
Figure 25. Photos des aquariums et terrariums adaptés au stade de développement des jeunes. 39
Figure 26. Photo d'un meuble d'élevage disposant d'un cordon chauffant à température réglable 40
Figure 27. Photo du dispositif de gradient thermique. 40
Figure 28. Schéma expliquant le montage du dispositif de gradient thermique. 41
Figure 29. Photo d'un mâle sans œufs pendant une session de mesure des performances de saut. 42
Figure 30. Photos illustrant la réponse de retournement d'un mâle avec ses œufs. 42
Figure 31. Photos illustrant la réponse d'un mâle avec des œufs à la mesure de réponse musculaire à la charge. 43
Figure 32. Photo illustrant le dispositif de mesure de la locomotion libre. 44
Figure 33. Enceinte climatique utilisée pour contrôler les conditions de développement des jeunes. 45
Figure 34. Schéma du protocole expérimental de manipulation des conditions thermiques pré et postnatales croisées. 46
Figure 35. Frise chronologique du développement des jeunes et des stades auxquels les différentes mesures ont été réalisées. 47
Figure 36. Exemple d'une photo réalisée pour mesurer le diamètre des œufs à la capture. 47
Figure 37. Schéma des mesures de morphologie réalisées sur un têtard au stade AMA. 48
Figure 38. Photo du dispositif permettant de filmer les têtards par dessous afin de mesurer leur fréquence cardiaque. 49
Figure 39. Photo schématique de la sortie d'une branchie au niveau de l'orifice formé par la sortie du membre antérieur gauche d'un têtard au stade AMA. 50
Figure 40. Photo d'une mesure de fréquence cardiaque par échographie cardiaque d'un métamorphe. 50
Figure 41. Photo du dispositif de mesure de la locomotion au stade têtard. 52

Figure 42. Photo du dispositif de mesure de la distance de saut au stade crapelet. 52
Figure 43. Effect of (a) substrate and (b) refuge type on detection probability. (c) Influence of temperature and artificial refuge type on detection probability. 61
Figure 44. Variations in the mean number of observations of carrying males and total number of adults per two weeks periods over the fiel season. 70
Figure 45. Variations in mean T_{body} (°C) of carrying males and mean air temperatures during the field season. 70
Figure 46. Relation between T_{body} (°C) of carrying males and $T_{substrate}$ in the field. 71
Figure 47. Thermal preferences (T_{pref} °C) measured in carrying males, non-carrying males and unsexed adults. 72
Figure 48. Embryonic development duration in days in function of thermal treatment. 73
Figure 49. Relation between estimated clutch size and snout-vent length (SVL). 86
Figure 50. Effect of reproductive status on hopping distance. 87
Figure 51. Influence of relative clutch size on hop distance. 87
Figure 52. Effect of reproductive status on righting-response. 90
Figure 53. Influence of relative clutch size on righting-response. 90
Figure 54. Effect of reproductive status on proportions of leg dropping. 91
Figure 55. Plan expérimental utilisé pendant le développement. 103
Figure 56. Frise chronologique des stades de référence choisis pendant le développement prénatal et le développement postnatal. 104
Figure 57. Chronologie des mesures des effets persistants. 108
Figure 58. Durée de développement des périodes initial-précoce, précoce-intermédiaire, intermédiaire-tardif, tardif-naissance en fonction du traitement prénatal. 111
Figure 59. Durée de développement des périodes naissance-AAP, AAP-AMA, AMA-sortie, sortie-régression en fonction du traitement postnatal. 112
Figure 60. Durée de développement pour la période naissance-AAP en fonction du traitement prénatal, par groupe de traitement postnatal. 113
Figure 61. Durée de développement totale (initial-régression) en fonction des traitements pré et postnataux. 114
Figure 62. Durée de développement pour la période tardif-naissance en fonction de la fréquence cardiaque mesurée au stade tardif et du traitement prénatal. 114
Figure 63. Longueur totale en fonction du traitement postnatal. 115
Figure 64. Longueur museau-cloaque relative à la longueur totale en fonction du traitement postnatal. 116

Figure 65. Largeur du corps relative à la longueur totale en fonction du développement postnatal. 116
Figure 66. Masse en fonction du traitement postnatal. 117
Figure 67. Proportion du premier membre antérieur sorti en fonction de la latéralité et du traitement postnatal. 118
Figure 68. Vitesse de régression de la queue en fonction du traitement postnatal..... 118
Figure 69. Longueur totale en fonction de la taille moyenne des œufs au stade initial. 119
Figure 70. Fréquence cardiaque en fonction du traitement prénatal. 119
Figure 71. Fréquence cardiaque en fonction du traitement postnatal. 120
Figure 72. Profil cardiaque prénatal en fonction de la taille de ponte (nombre d'œufs par mâle). 121
Figure 73. Fréquence cardiaque à la naissance en fonction de la longueur totale à la naissance. 121
Figure 74. Taux de mobilité au stade AAP en fonction du traitement postnatal. 122
Figure 75. Distance totale parcourue au stade AAP en fonction du traitement postnatal..... 122
Figure 76. Vitesse moyenne en déplacement au stade AAP en fonction du traitement postnatal. 123
Figure 77. Taux de mobilité au stade AAP en fonction de la fréquence cardiaque au stade AAP et du traitement postnatal. 124
Figure 78. Distance totale parcourue au stade AAP en fonction de la fréquence cardiaque au stade AAP et du traitement postnatal. 124
Figure 79. Préférences thermiques au stade régression en fonction du traitement postnatal. 125
Figure 80. Fréquence cardiaque mesurée un mois après la métamorphose en fonction du traitement postnatal et de la température de test. 126
Figure 81. Fréquence cardiaque mesurée un mois après la métamorphose en fonction de la température de test et du traitement postnatal. 126
Figure 82. Distance de saut mesurée un mois après la métamorphose en fonction du traitement postnatal et de la température de test. 127
Figure 83. Distance de saut mesurée un mois après la métamorphose en fonction de la température de test et du traitement postnatal. 128
Figure 84. Préférences thermiques mesurées un mois après la métamorphose en fonction du traitement postnatal. 128
Figure 85. Succès à l'éclosion en fonction de la fécondité résiduelle des mâles..... 148

Figure 86. Effet du taux d'humidité du substrat (en kPa) sur la masse des œufs de Graptemys ouachitensis (symbôles pleins) et G. pseudogeographica (symbôles ouverts). 153
Figure 87. Photo de terrain d'un alyte dans sa loge caractéristique. 155
Figure 88. Température corporelle quotidienne moyenne (°C) mesurée chez des femelles gravides et des femelles non-reproductives d'Antaresia childreni. 156
Figure 89. Destin des pontes de Chiromantis hansenae dans une expérience de retrait de l'adulte 157
Figure 90. Photo d'un Alyte accoucheur immergeant sa ponte récente (coloration jaune vs. marron) dans l'eau. 158
Figure 91. Distance moyenne parcourue de mâles araignée de mer non-porteurs (diamants pleins) et porteurs (diamants ouverts). 159
Figure 92. Schéma des intégrations potentielles des différents traits le long d'un continuum rythme de vie. 164
Figure 93. Diagramme montrant la présence ou l'absence de têtards (carrés gris) et la présence de têtards au stade AMA (croix) pour chaque espèce dans une aire méditerranéenne. 165
Figure 94. Amplexus d'Alyte accoucheur. 167
Figure 95. Effet de la présence de mâles périphériques (traduit de l'anglais, sneak males) sur la désertion des mâles de Onthophagus taurus. 168
Figure 96. Effet de l'altitude sur l'investissement paternel des mésanges bleues. 169
Figure 97. Survie cumulative (%) d'animaux provenant de populations de haute et basse altitudes acclimatés à des conditions expérimentales avec un milieu thermique fluctuant entre 32 et 16°C (24°C ± 8). 170
Figure 98. Taux d'androgènes dans le sang de mâle Eleutherodactylus coqui. 172
Figure 99. Durée des soins en fonction du milieu de reproduction aquatique ou terrestre et du sexe chez les grenouilles. 173

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAP : apparition des articulations postérieures

AMA : apparition des membres antérieurs

Comm. pers. : commentaire personnel

Ddl : degré de liberté

ES : erreur standard à la moyenne

FC : fréquence cardiaque

IUCN : union internationale pour la conservation de la nature

M&M : matériel et méthodes

N.S. : non-significatif

PVC : polyvinyl chloride

SPM : soins parentaux mâles

Vs. : versus

LIST OF ABBREVIATIONS

AR : artifical refuges

Est. : estimate

Juv. : juveniles

Loc. : locomotion

MPC : male parental care

Pers. obs. : personal observations

PC : parental care

RCS : relative clutch size

R^2c : conditional R square

R^2m : marginal R square

RFID : radio frequency identification

SD : standard deviation

SE : standard error

SVL : snout-vent length

T_{body} : body temperature

Temp. : temperature

T_{pref} : preferred temperature

$T_{substrate}$: substrate temperature

INTRODUCTION GENERALE

Illustration de M. Cuminet inspirée de la photo de M. Berroneau

« Je refuse que la peur de l'échec m'empêche de faire ce qui m'importe vraiment. » - Emma Watson

A. Variations environnementales et soins parentaux

1. Contraintes de l'environnement : fluctuations biotiques et abiotiques

Le milieu naturel est la résultante de facteurs biotiques (*i.e.*, les prédateurs, les proies, les congénères, les compétiteurs, etc.) et de facteurs abiotiques (*i.e.*, la lumière, l'humidité, la température, etc.) qui peuvent varier dans le temps et dans l'espace. Ces changements imposent des contraintes sur les organismes vivants. En particulier, les conditions environnementales précoces, c'est-à-dire l'environnement rencontré pendant les premiers stades de vie, peuvent avoir un impact remarquable (Van den Bergh et al., 2015). En effet, les contraintes environnementales n'ont pas les mêmes conséquences ni en fonction du stade de développement auquel se trouve l'individu au moment où elles sont imposées, on parle de fenêtre de sensibilité, ni en fonction de la durée sur laquelle elles s'exercent (Eyck et al., 2019). Selon l'environnement, une plasticité phénotypique peut se mettre en place, c'est-à-dire une expression différentielle du génotype afin de modifier le phénotype de l'individu (Hallson & Björklund, 2012; Miner et al., 2005). Cette plasticité peut être réversible, on parle alors de flexibilité phénotypique, ou permanente, alors appelée plasticité développementale (Piersma & Drent, 2003). La plasticité phénotypique peut ainsi influencer le comportement, la physiologie, la morphologie mais aussi les traits d'histoire de vie des individus (Miner et al., 2005). Elle permet parfois une meilleure adaptation de l'individu à son environnement (Hallson & Björklund, 2012; Miner et al., 2005).

2. Effets et soins parentaux

Dans ce contexte, il peut être avantageux pour les individus d'atténuer les effets de l'environnement sur leur progéniture. Les effets parentaux, c'est-à-dire l'influence sur le phénotype du jeune par le(s) parent(s), indépendamment de l'influence génétique, peuvent permettre de tamponner un environnement défavorable, notamment quand les effets parentaux sont adaptatifs (Royle et al., 2012). Bien que certains aspects des définitions des soins parentaux puissent varier, elles s'accordent toutes sur le fait que les soins parentaux soient définis par une association entre un parent et son jeune qui améliore la survie de ce dernier (Clutton-Brock, 1991; Crump, 1996; Royle et al., 2012; Trivers, 1972; Wittenberger, 1981). Les définitions peuvent alors inclure une notion de coût pour le parent, notamment au niveau de la possibilité de s'investir dans une autre progéniture (Trivers, 1972), ou non (Clutton-Brock, 1991). Elles peuvent également réduire l'investissement à certains stades de développement, comme après l'éclosion, la naissance ou encore la production des gamètes (Crump, 1996; Wittenberger,

1981). Enfin, elles peuvent aussi inclure une notion évolutive, en précisant que les soins parentaux sont façonnés par des pressions sélectives qui favorisent l'émergence et le maintien des comportements permettant d'améliorer la survie de la progéniture (Alonso-Alvarez & Velando, 2012) et donc l'aptitude (traduit de l'anglais, *fitness*) à l'échelle de la vie de l'individu. Dans ce manuscrit de thèse, les soins parentaux seront définis comme toute forme de comportement d'un parent qui améliore la survie de sa progéniture, comme défini par Clutton-Brock, 1991.

Les soins parentaux ont attiré l'attention des biologistes de l'évolution dès Darwin, mais ce n'est que plus récemment que l'écologie comportementale et la sociobiologie se sont intéressées à la diversité d'expression des soins parentaux (Pitcher, 1986). Les soins parentaux sont apparus à plusieurs reprises au cours de l'évolution des vertébrés et des invertébrés, qu'ils soient maternels, paternels, ou biparentaux (Dulac et al., 2014) ; (Figure 1). Différents traits d'histoire de vie pourraient avoir favorisé leur émergence, tel qu'un taux de mortalité des œufs élevés en l'absence de soins, une survie des juvéniles faible en l'absence de soins, un taux de mortalité des adultes élevé, un taux de maturation des œufs faible et une durée au stade juvénile courte (Klug & Bonsall, 2009). De plus, les facteurs facilitant leur émergence ne sont pas les mêmes que ceux favorisant leur évolution, leur diversification ou encore leur maintien (Royle et al., 2016). Le taux de mortalité des adultes, le degré de parenté ou encore la sélection sexuelle semblent alors être des facteurs déterminants dans ces contextes (Royle et al., 2016).

Les soins parentaux dispensés sont très variables aussi bien entre espèces, populations ou sexes mais aussi entre individus du même sexe, voire chez un même individu (Westneat & Sargent, 1996). Cependant, ils génèrent toujours un compromis entre la progéniture actuelle et la reproduction future (Pingault & Goldberg, 2008) et bien qu'ils puissent apporter des bénéfices adaptatifs, ils peuvent également entrainer des conflits transgénérationnels parent-enfant (Crespi & Semeniuk, 2004; Furness et al., 2015; Trivers, 1972). Ces conflits apparaissent notamment lorsque certains traits présentent des optimums différents entre les parents et les jeunes (Dupoué et al., 2015; Trivers, 1972) ou ne sont pas compatibles (Furness et al., 2015). Le cannibalisme filial en est un exemple (Furness et al., 2015).

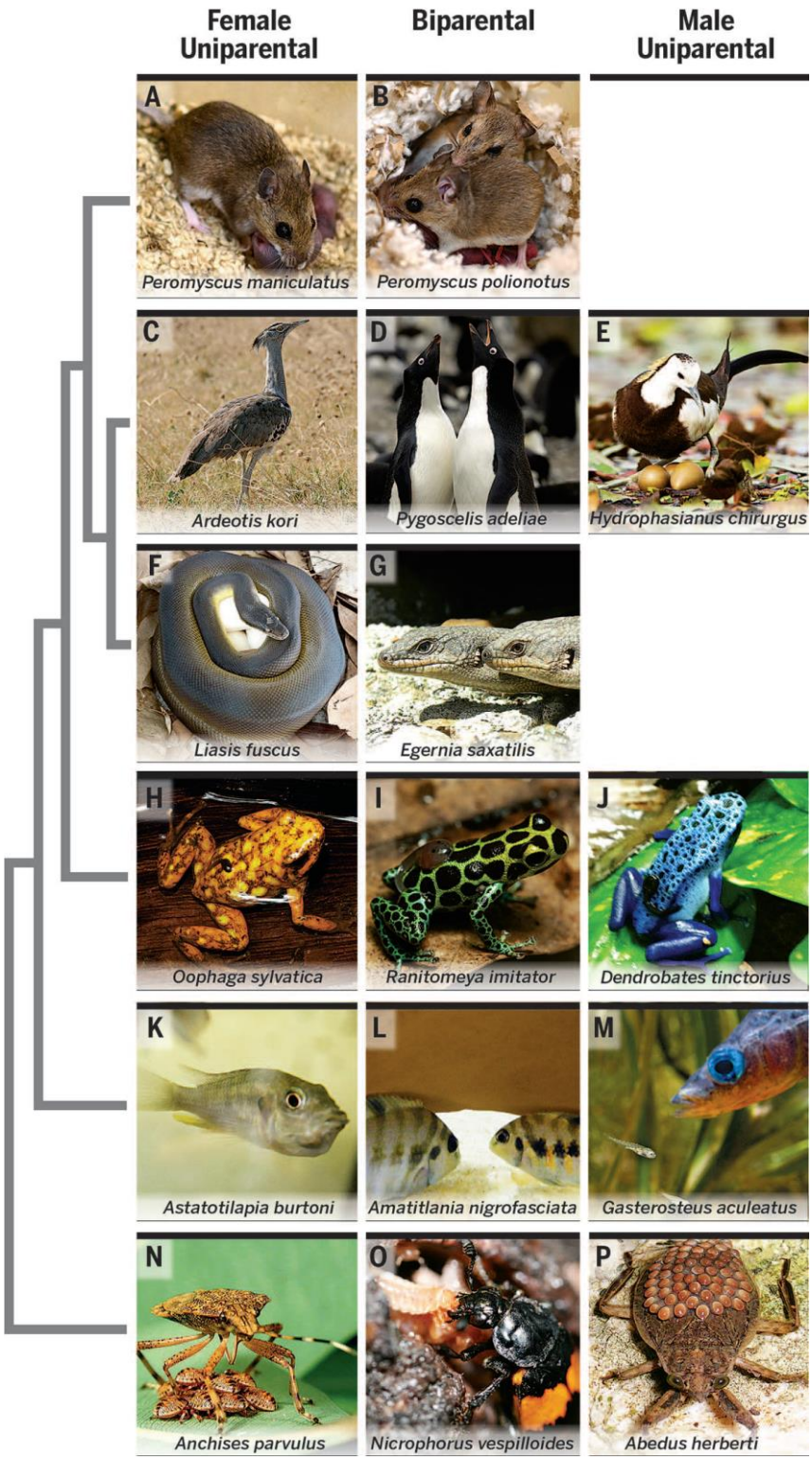


Figure 1. Evolution des diverses stratégies de soins parentaux dans le règne animal. (A) Peromyscus maniculatus. (B) Peromyscus polionotus. (C) Ardeotis kori. (D) Pygoscelis adeliae. (E) Hydrophasianus chirurgus. (F) Liasis fuscus. (G) Egernia saxatilis. (H) Oophaga sylvatica. (I) Ranitomeya imitator. (J) Dendrobates tinctorius. (K) Astatotilapia burtoni. (L) Amatitlania nigrofasciata. (M) Gasterosteus aculeatus. (N) Anchises parvulus. (O) Nicrophorus vespilloides. (P) Abedus herberti. [Crédit photos : Andrés Bendesky (A and B),Tamas Szekely (C), Oliver Kruger (D), Ghulam Rasool (E), Zachary Stahlschmidt (F), Alan Couch (G), Elicio E. Tapia (H), Evan Twomey (I), Lauren A. O'Connell (J), Rayna Harris (K), Bryan J. Matthews (L), Dwight Kuhn (M), Peter Chew at www.brisbaneinsects.com (N), Allen Moore (O), Michael Bogan (P)] (Dulac et al., 2014)

3. Approche coûts-bénéfices des influences parentales

a. Généralités

Afin de mieux comprendre la diversité des soins parentaux, il est important de développer une approche coûts-bénéfices (Alonso-Alvarez & Velando, 2012; Huang & Pike, 2013). En effet, d'après le principe de Williams, si les soins parentaux, ainsi que la reproduction en général, sont associés à des bénéfices, des coûts sur l'aptitude (traduction de l'anglais, *fitness*) existent également. Appliquer ce principe et décrire les normes de réactions respectives des coûts et des bénéfices est essentiel pour mieux comprendre les déterminants de l'émergence et du maintien des soins parentaux (Gross, 2005). L'hypothèse générale associée est que l'émergence des soins parentaux est favorisée lorsque leurs bénéfices dépassent leurs coûts potentiels (Huang & Pike, 2013) ; (Figure 2).

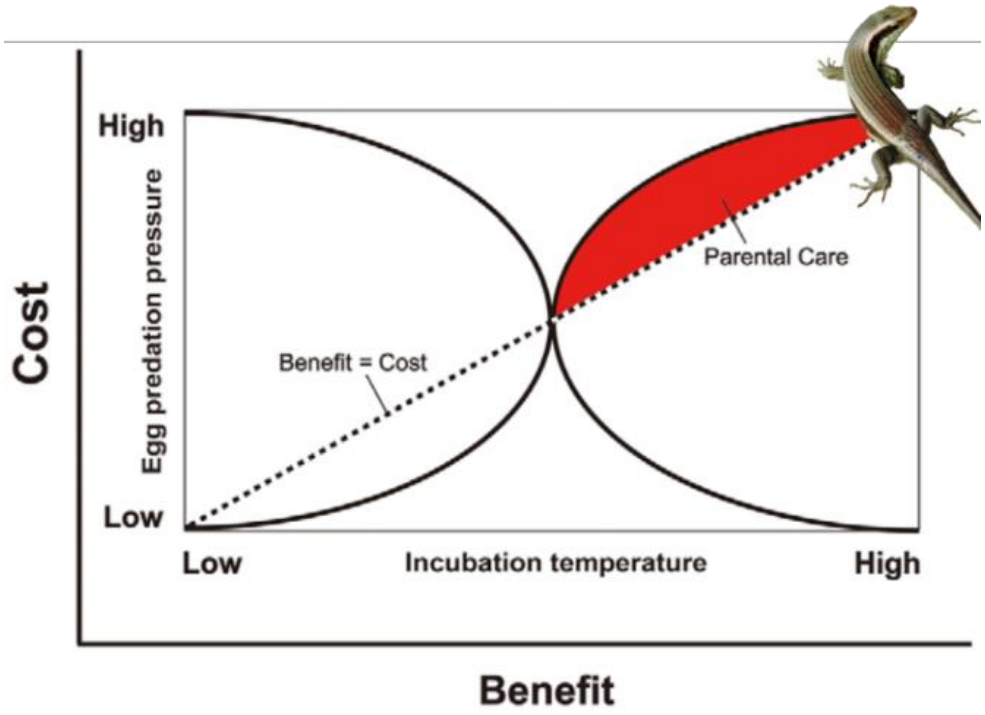


Figure 2. Exemple d'une approche coûts-bénéfices hypothétique pour expliquer l'émergence des comportements parentaux chez Eutropis longicaudata.
[Crédit photo : Howard F. Cunningham] (Huang & Pike, 2013)

b. Bénéfices et implications évolutives

Les bénéfices à court terme des soins parentaux sont souvent une augmentation de la survie pendant le développement embryonnaire (Alonso-Alvarez & Velando, 2012) ; (Figure 3). Cette augmentation peut apparaître lorsque le parent exerce un rôle protecteur, en limitant l'intervention de prédateurs, de congénères ou encore de pathogènes, mais aussi lorsqu'il

apporte ou régule des ressources essentielles au développement, tels que la température, l'eau, l'oxygène ou les nutriments (Alonso-Alvarez & Velando, 2012). Les soins parentaux peuvent aussi être bénéfiques lorsqu'ils influent sur la vitesse de développement (Klug & Bonsall, 2014). Les bénéfices adaptatifs apportés par l'augmentation de la vitesse de développement pourraient même être supérieurs à ceux apportés par l'amélioration de la survie, de la qualité et du succès reproducteur (dans le cas où le parent et le jeune restent ensemble à l'âge adulte) ; (Klug & Bonsall, 2014).

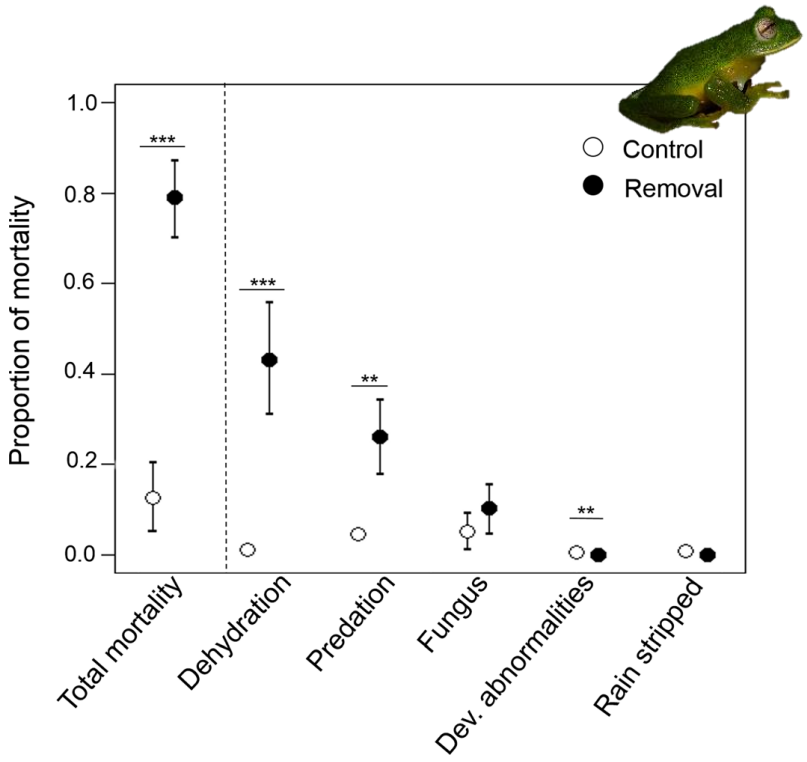


Figure 3. Exemple de l'amélioration de la survie des jeunes grâce aux soins parentaux chez la grenouille de verre (Ikakogi tayrona).
*Situation contrôle comparée à un traitement de retrait du parent (n=25 et 29, respectivement). Les cercles indiquent la moyenne et les barres les intervalles de confiance à 95% depuis des analyses bootstrap. *** p < 0.0001 ; p < 0.001. [Crédit photo : Luis Alberto Rueda Solano]* (Valencia & Delia, 2016)

Les bénéfices peuvent aussi apparaître sur le long terme dans la trajectoire de vie de la progéniture avec une augmentation de la survie et une augmentation de la fécondité (Alonso-Alvarez & Velando, 2012). Un effet de cuillère d'argent (traduit de l'anglais, *silver-spoon effect*) peut s'installer, notamment quand les individus ayant rencontré des conditions favorables pendant leur développement, par le biais de leurs parents par exemple, présentent à l'âge adulte des aptitudes générales supérieures à leurs congénères ayant rencontré des conditions moins favorables (Monaghan, 2008). Les influences parentales, particulièrement par le biais des comportements parentaux, sont donc d'une importance majeure dans un monde en constante variation (Badyaev & Ghalambor, 2001; Uller, 2008).

c. Coûts et compromis

Les coûts des soins parentaux sont intrinsèquement liés aux coûts de la reproduction. Ainsi, une espèce avec un fort niveau de soins parentaux devrait rencontrer les coûts de reproduction les plus élevés (Bleu et al., 2016). Une relation négative entre reproduction et longévité peut notamment apparaître chez certaines espèces (Dugas et al., 2015; Franklin & Stuart-Fox, 2017) ; (Figure 4).

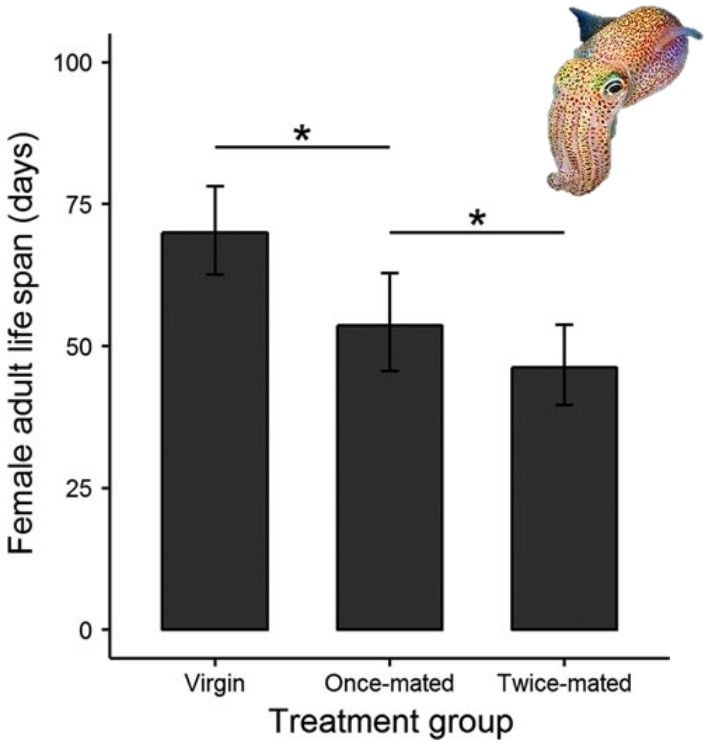


Figure 4. Exemple de coût de la reproduction sur la longévité chez Euprymna tasmanica. Effet du statut d'accouplement (virgin = vierge, once-mated : premier accouplement ; twice-mated : second accouplement) sur la durée de vie de femelles d'Euprymna tasmanica. Le graphique montre les valeurs attendues (maximum de vraisemblance, intervalles de confiance à 95%) quand la masse totale de la ponte et la température moyenne de l'adulte sont maintenues constantes [masse totale de la ponte = 0g ; température moyenne = 17.2°C (moyennes des valeurs rencontrées chez tous les calamars)]. La durée de vie à l 'âge adulte a été calculée entre la maturité sexuelle et la mort. Un astérisque indique une différence statistique significative entre les différents groupes. [Crédit photo : Doug Perrine] (Franklin & Stuart-Fox, 2017)

Les effets parentaux induisent fréquemment des compromis parent-jeune qui peuvent être sous-optimaux pour le(s) parent(s), le jeune, voire les deux (Uller, 2008). Les coûts des soins parentaux sont alors souvent fonction de la fécondité (Stearns, 1992). L'impact de la fécondité a beaucoup été étudié chez les oiseaux (Royle et al., 2012) mais est également observable chez les amphibiens (Dugas et al., 2016). Cet impact serait différent en fonction du sexe, notamment à cause de l'anisogamie, *i.e.*, la production des gamètes plus coûteuse dans les ovaires que dans les testicules (Hayward & Gillooly, 2011). Cependant, les soins parentaux mâles (SPM)

peuvent aussi avoir des coûts sur la survie et le futur succès reproducteur des mâles (Burris, 2011). Une approche intéressante pour identifier les coûts et bénéfices associés aux soins parentaux peut alors être de comparer deux espèces à la biologie très proche mais différentes dans le sexe de celui qui prodigue les soins (Gilbert et al., 2010). Enfin, les soins s'exerçant sur plusieurs stades de développement, et donc sur un laps de temps plus long, semblent plus coûteux (Úbeda & Nuñez, 2006). Dans ce contexte, il est aujourd'hui essentiel d'approfondir l'identification des coûts des comportements parentaux, dépendant des sexes, de la fécondité ou encore du contexte environnemental (Royle et al., 2012).

B. Soins parentaux mâles et inversement des rôles sexuels

Figure 5. Exemples de soins parentaux mâles.
(A) Abedus herberti. (B) Hyloxalus nexipus. (C) Gorilla beringei beringei. [Crédit photos : Ivan Phillipsen (A), Adam Stuckert (B), Lubert Stryer (C)] (Dulac et al., 2014)

Bien que les femelles délivrent généralement les soins parentaux, les mâles peuvent également être impliqués, voire les délivrer de manière exclusive (Royle et al., 2016). Les SPM apparaissent notamment dans de nombreux taxons (Dulac et al., 2014; Royle et al., 2016) ; (Figure 5). Comme chez les femelles, les soins parentaux entrainent des modifications

profondes, notamment neurologiques, des mâles (Bukhari et al., 2019; Dulac et al., 2014). Les mâles peuvent défendre leur progéniture vis-à-vis des prédateurs et des infections, répondre aux besoins trophiques, et réguler les conditions abiotiques, telles que la température ou encore l'humidité (Chuang et al., 2019; Vockenhuber et al., 2009). Cependant, ces comportements sont souvent associés à des coûts reportés sur la condition physique et la survie des mâles (Burris, 2011; Nazareth & Machado, 2010). Des stratégies comportementales peuvent alors émerger pour compenser ces coûts. Des désertions temporaires peuvent apparaître, notamment quand les conditions abiotiques deviennent trop contraignantes et/ou selon le risque de prédation (Consolmagno et al., 2016). La certitude de paternité est un paramètre important pour déterminer l'investissement et les stratégies parentales des mâles. Pour éviter de s'investir dans une descendance qui n'est pas la sienne, un mâle peut alors construire un nid commun pour plusieurs pontes, afin de réduire les coûts des soins sans parenté (Birks, 1997).

Différents facteurs semblent associés à l'émergence des SPM. Tout d'abord, l'anisogamie (Hayward & Gillooly, 2011), favoriserait l'émergence des soins maternels (Westneat & Sargent, 1996). A l'inverse, la fécondation externe favoriserait un investissement du mâle (Kahn et al., 2013). En effet, la femelle, en émettant ses gamètes la première, serait ensuite libre de partir en laissant le mâle avec l'obligation de s'occuper des jeunes (Kahn et al., 2013). Chez les oiseaux, les SPM exclusifs semblent être favorisés par une faible probabilité de reproduction future (Owens, 2002). Au contraire, les SPM peuvent être soumis à la sélection sexuelle, notamment lorsqu'ils augmentent l'attractivité du mâle. Par exemple, chez certaines espèces, les femelles choisiront préférentiellement un mâle délivrant d'ores et déjà des soins, soit par la construction d'un nid (Tallamy, 2000), soit par la protection des jeunes d'une autre femelle (Nazareth & Machado, 2010; Tallamy, 2000). Dans ce cas, il est alors possible d'observer des mâles adopter les nids abandonnés par d'autres mâles afin d'augmenter leurs chances d'accouplement (Quesada-Hidalgo et al., 2019). A l'inverse, lorsque les SPM n'augmentent pas l'attractivité, une probabilité élevée de paternité peut alors être déterminante. Par exemple, quand les SPM sont facultatifs, le mâle peut s'investir lorsque les chances de reproduction future sont faibles et que les probabilités de paternité sont hautes (Alissa et al., 2017). De la même manière, un mâle peut s'occuper de toutes les pontes situées sur son territoire, là où les chances de paternité sont hautes, mais les prédater à l'établissement d'un nouveau territoire, lorsque les chances de paternité sont quasi-nulles (Bose et al., 2019; Ringler et al., 2017). Enfin, un dernier facteur est celui de l'hypothèse de la fécondité augmentée, c'est-à-dire l'hypothèse que les SPM pourraient permettre de libérer les femelles de la contrainte des soins maternels,

afin qu'elles investissent de l'énergie à la production de nouveaux gamètes le plus rapidement possible (Tallamy, 2000). Dans certains cas, l'investissement paternel est tel que les rôles sexuels sont inversés ; la compétition s'exerce alors entre femelles pour l'accès aux mâles (Eens & Pinxten, 2000).

Les SPM sont donc fréquents et induisent des bénéfices et des coûts. Ces derniers ont moins été étudiés comparativement à ceux associés aux soins maternels (Bleu et al., 2016). Approfondir les études concernant les SPM est donc essentiel pour mieux comprendre l'évolution et le maintien des comportements parentaux chez les animaux.

C. Diversification des soins et des rôles parentaux : le modèle amphibien

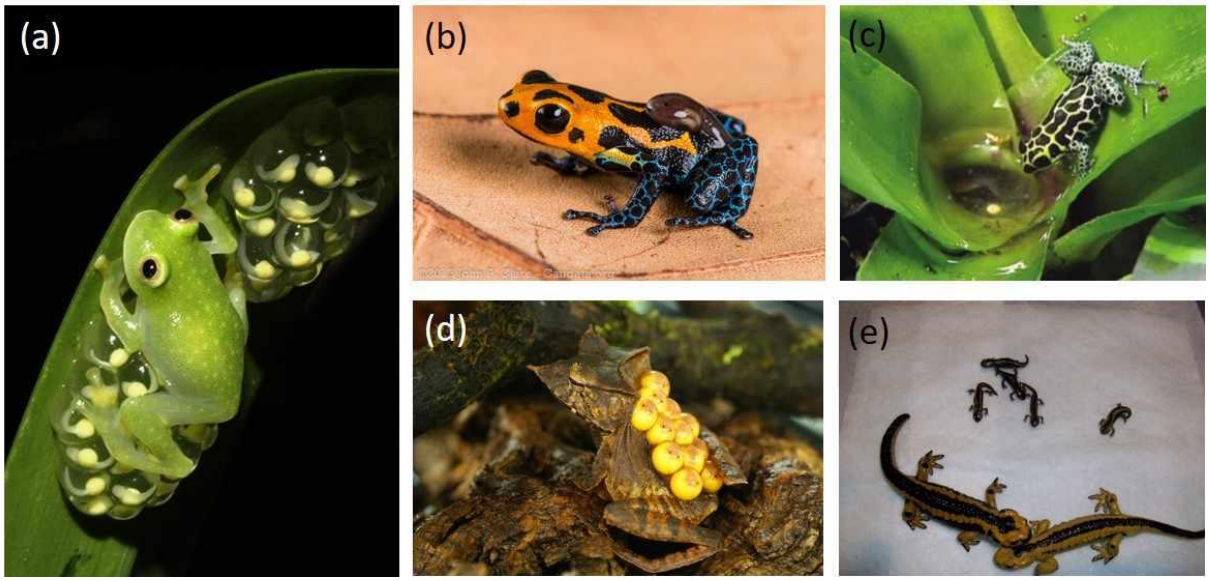


Figure 6. Exemples de soins parentaux chez les amphibiens.
(a) protection des œufs, (b) transport des têtards, (c) nourrissage des têtards, (d) transport des œufs, (e) viviparité. [Crédit photos : Jesse Delia (a), John P. Clare (b), BBC Naturel History Unit (c) Edgardo Griffith (d), Billy James (e)] (Furness & Capellini, 2019)

Les amphibiens présentent la plus grande diversité de mode de reproduction de tous les vertébrés tétrapodes (Crump, 2015; Portik & Blackburn, 2016), avec 39 modes de reproduction décrits à ce jour (Crump, 2015). Les soins parentaux sont bien distribués phylogénétiquement et environ 20% des espèces en réalisent (Lehtinen & Nussbaum, 2003).

Selon les auteurs, les soins parentaux chez les amphibiens sont classés en six à 10 catégories (Crump, 1996; Lehtinen & Nussbaum, 2003; Poo & Bickford, 2013). Cinq catégories sont communes à tous les auteurs : (1) la présence auprès des œufs (traduit de l'anglais, *attendance*), (2) le transport des œufs, (3) la présence auprès des têtards, (4) le transport des têtards et (5) le nourrissage des têtards (Crump, 1996; Lehtinen & Nussbaum, 2003; Poo & Bickford, 2013) ;

(Figure 6). Le transport des métamorphes a été découvert plus récemment et a donc ensuite été ajouté (Lehtinen & Nussbaum, 2003; Poo & Bickford, 2013). Certains auteurs considèrent également la construction de nid comme un comportement parental (Lehtinen & Nussbaum, 2003). Enfin, les principales distinctions s'exercent sur le mode de reproduction avec gestation interne (Crump, 1996), avec parfois une distinction entre incubation des œufs et incubation des têtards (Lehtinen & Nussbaum, 2003; Poo & Bickford, 2013).

Le soin aux œufs est probablement la forme de soins la plus simple (Furness & Capellini, 2019). Sur le plan évolutif, cette forme de soin émerge et disparaît plus rapidement en comparaison à toute autre forme de soins chez les amphibiens (Furness & Capellini, 2019). Le soin aux œufs est ainsi présent dans 14 des 54 familles d'anoures (Lehtinen & Nussbaum, 2003). Au contraire, l'incubation interne et la viviparité semblent être les modes de soins les plus complexes, émergeant le plus rarement mais étant également perdus à un taux très faible (Furness & Capellini, 2019). L'évolution vers des modes de reproduction complexes se fait généralement en passant par des modes à complexité intermédiaire (Portik & Blackburn, 2016).

Chez les espèces d'anoures avec soins monoparentaux, les soins sont aussi souvent maternels que paternels (Valencia & Delia, 2016). Les pressions de sélection s'exerçant sur le sexe de celui qui prend soin des jeunes sont les mêmes que pour les autres taxons (Lehtinen & Nussbaum, 2003). De plus, d'après les études phylogénétiques sur les dendrobates, les soins maternels n'auraient pas dérivé depuis les soins biparentaux, mais plutôt depuis les SPM (Lehtinen & Nussbaum, 2003). Lorsque les soins sont biparentaux, chaque sexe peut avoir des tâches différentes avec, par exemple, le mâle s'occupant de l'hydratation et de la surveillance, et la femelle s'occupant du transport (Weygoldt, 1980). Cependant, les soins biparentaux sont évolutivement instables, indépendamment du fait que les parents apportent des soins complémentaires ou similaires (Furness & Capellini, 2019).

Les amphibiens disposent de deux grands modes de reproduction : le mode terrestre et le mode aquatique (Lion et al., 2019). Ces modes présentent des contraintes écophysiologiques différentes de perte en eau par évaporation, ce qui impacte leur distribution géographique autour de la planète (Lion et al., 2019). En effet, la diversité des modes de reproduction chez les amphibiens est représentative des différences biologiques entre les espèces et de leur distribution à grande échelle (da Silva et al., 2012). Ce sont notamment des changements dans l'utilisation des microhabitats, associés à des modifications écomorphologiques qui favorisent l'émergence de nouveaux comportements de reproduction, d'oviposition ou encore de développement larvaire (Portik & Blackburn, 2016). Par exemple, l'évolution de la présence

auprès des œufs vers le nourrissage des têtards est souvent en lien avec des changements de conditions environnementales (Lehtinen & Nussbaum, 2003). Enfin, les pressions de sélection diffèrent selon les spécificités des microhabitats, la dessiccation étant le facteur le plus limitant dans le milieu arboricole et la prédation étant le facteur le plus limitant dans le milieu terrestre (Bickford, 2004).

Les amphibiens ont ainsi développé des comportements parentaux remarquables. Ils peuvent construire des nids de boue (Gururaja et al., 2014) ou de bulles d'air (Méndez-Narváez et al., 2015). Ces derniers permettent de réguler la température et peuvent être terrestres ou aquatiques, les terrestres permettant une meilleure régulation thermique que les aquatiques (Lantyer-Silva et al., 2014). Lorsque les adultes ne construisent pas de nid, ils peuvent alors utiliser l'environnement comme site d'élevage. Ils peuvent par exemple utiliser des broméliacées ou les nœuds des bambous pour la ponte, le développement et le nourrissage des têtards (Lantyer-Silva et al., 2014; Seshadri et al., 2015). Ils peuvent même utiliser leur corps comme site d'incubation avec par exemple des poches dorsales (Fernandes et al., 2011). Des changements profonds de la structure de la peau s'opèrent alors, avec notamment des changements au niveau de la vascularisation, suggérant ainsi des échanges avec les embryons (Fernandes et al., 2011). Le développement des embryons et des larves peut également prendre place dans l'estomac (Corben et al., 1974). Les sécrétions gastriques et les processus de digestion sont alors inhibés le temps du développement (Corben et al., 1974). Ces comportements parentaux induisent des comportements sociaux parfois complexes. Par exemple, des comportements de cannibalisme par les adultes sur les jeunes, comme chez les grands carnivores et les primates, peuvent apparaître (Ringler et al., 2017). Enfin, de nouveaux modes de reproduction sont toujours régulièrement découverts au 21ème siècle (Crump, 2015).

Cependant, malgré cette diversité importante en soins parentaux chez les amphibiens, ils n'ont été que relativement peu étudiés comparés aux soins parentaux chez les mammifères et les oiseaux (Delia et al., 2017). Ils peuvent cependant être complexes et il est alors essentiel d'approfondir les connaissances dans ce domaine afin de mieux comprendre l'évolution et le maintien des comportements parentaux chez les animaux.

D. Les influences thermiques au cœur de l'évolution des ectothermes

1. Variations environnementales : importance de la température

La température est probablement un des facteurs environnementaux impactant le plus les êtres vivants en général, et notamment le développement. Les effets de la température ont été démontrés sur de nombreux traits comme la croissance, la survie, la reproduction ou encore les modèles spatiaux de taille corporelle et également les patrons de densité de population et même de diversité spécifique (Angilletta, 2009). La température peut ainsi avoir des effets drastiques sur le phénotype des ectothermes de par ses effets directs sur le taux des réactions biochimiques (Singh et al., 2020). En effet, ces dernières se caractérisent par une température optimale à laquelle les performances sont maximisées ainsi qu'une température critique minimale et maximale auxquelles les performances déclinent à zéro (Singh et al., 2020) ; (Figure 7).

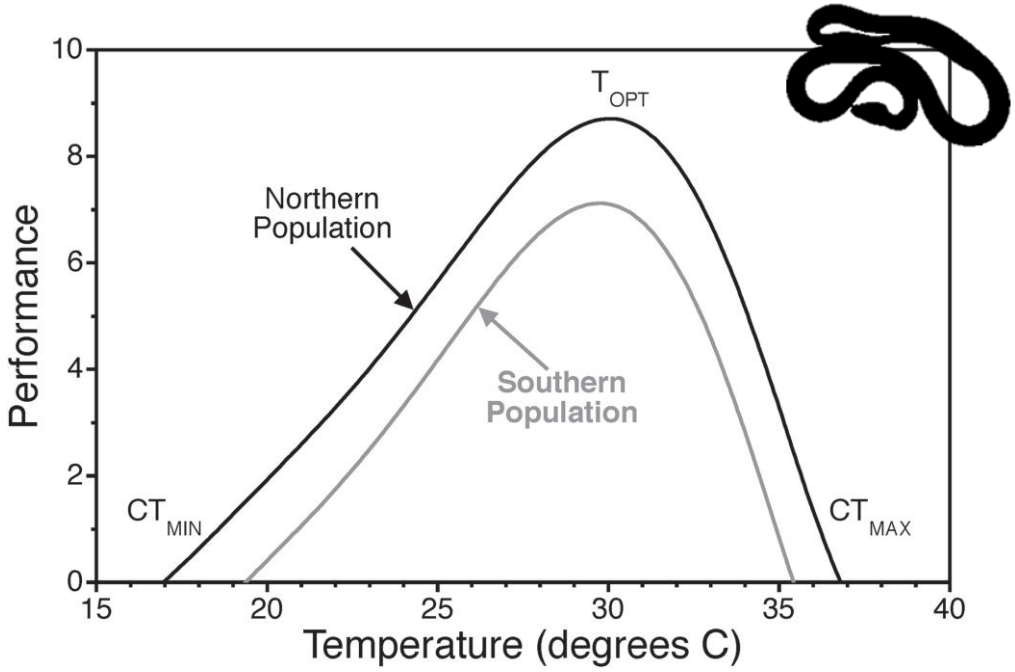


Figure 7. Exemple de taux des réactions chimiques en fonction de la température chez des ectothermes. T_{OPT} : température optimale ; CT_{MN} : température critique minimale ; CT_{MAX} : température critique maximale. Les échelles des axes x et y sont arbitraires et simplement utilisées pour illustrer le modèle général de la réponse thermique. (Singh et al., 2020)

2. La thermorégulation

D'une manière générale, il est souvent attendu que les ectothermes thermoconforment aussi longtemps que les conditions thermiques restent dans une gamme optimale dans le but de limiter les coûts associés à la thermorégulation (Basson et al., 2017; Bouazza et al., 2016; Huey & Slatkin, 1976). Cependant, l'environnement thermique peut fréquemment sortir de cette gamme et la thermorégulation devient alors avantageuse. Les ectothermes thermorégulent

principalement par des moyens comportementaux (Bouazza et al., 2016). Cependant, des modes de thermorégulation physiologiques existent également (Amiel et al., 2011). La thermorégulation entraine souvent des coûts énergétiques (Basson et al., 2017; Huey & Slatkin, 1976) et parfois un conflit entre température et taux d'humidité peut apparaître (Anderson & Andrade, 2017; Köhler et al., 2011; Mitchell & Bergmann, 2016).

3. Acclimatation et variations thermiques

Les effets de la température peuvent également être modulés par le phénomène d'acclimatation. Ce dernier est une réponse réversible qui apparaît sur plusieurs jours voire semaines, en association avec les changements thermiques saisonniers (Singh et al., 2020). C'est donc une forme de flexibilité phénotypique et non pas de plasticité développementale (Singh et al., 2020). L'acclimatation dépend notamment de la temporalité du changement environnemental mais aussi de la tolérance et des capacités physiologiques des espèces et des populations (Zamorano et al., 2017). Les courbes de performances sont modifiées en fonction de l'acclimatation (Seebacher & Grigaltchik, 2014). Ainsi, les performances de nage au froid de têtards acclimatés au froid sont supérieures à celles de ceux acclimatés au chaud et inversement (Seebacher & Grigaltchik, 2014; Wilson et al., 2000) ; (Figure 8).

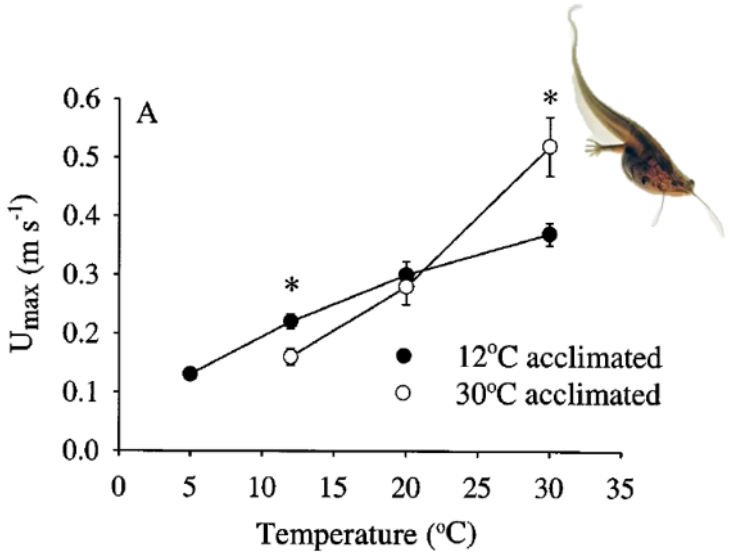


Figure 8. Effet de la température sur la vitesse de nage maximum sur les têtards de Xenopus laevis acclimatés à 12°C ou 30°C pour une période de 4 semaines (n =12).
Un astérisque indique une différence statistique significative entre les groupes acclimatés à une température de test spécifique. Taux de significativité : P < 0.05. [Crédit photo : David Bay] (Seebacher & Grigaltchik, 2014)

A l'âge adulte, les individus acclimatés au froid sont également plus performants au froid que ceux acclimatés au chaud (Wilson et al., 2000). Cependant, les différences ne sont pas aussi marquées en ce qui concerne les performances au chaud (Wilson et al., 2000).

4. Sensibilité du développement

Les stades précoces sont d'autant plus sensibles à la température que les jeunes ne peuvent pas toujours thermoréguler par eux-mêmes et qu'ils sont en plein développement (Li et al., 2018). Les modifications de température pendant les stades précoces ont des effets sur la durée de développement, la survie et le phénotype (Lourdais et al., 2004), mais aussi sur la taille corporelle, la forme corporelle, les performances de locomotion (Kaplan & Phillips, 2006), et même sur les taux de contamination à certains champignons, comme les chytrides (Fernández-Beaskoetxea et al., 2015). Les changements peuvent apparaître en fonction de l'environnement connu pendant le développement mais aussi en fonction de l'environnement connu par les parents, c'est-à-dire par des effets transgénérationnels (So & Schwanz, 2018).

a. Effets phénologiques

Un des effets majeurs de la température s'exprime au niveau de la phénologie. En effet, d'une manière générale, plus la température augmente, plus l'embryon se développe vite et éclot tôt (Singh et al., 2020) et ce, même avec de petites variations (Foucart et al., 2018). Ce phénomène apparaît même chez les endothermes (Hepp et al., 2006). L'effet de la température sur le développement est donc un phénomène général.

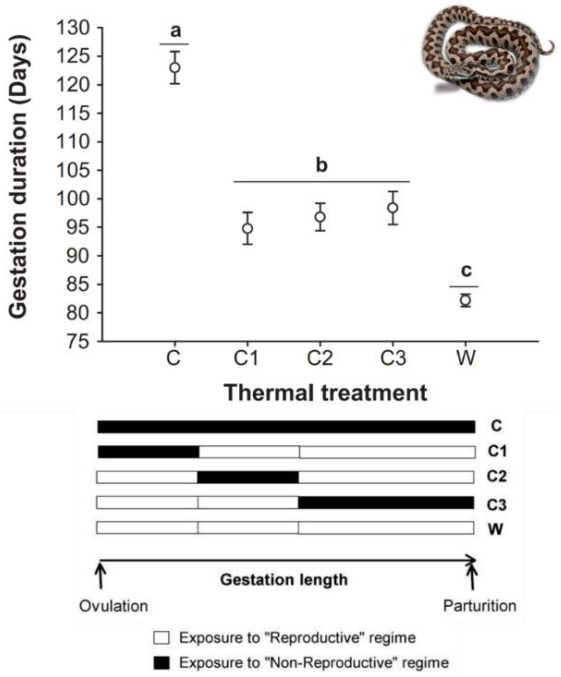


Figure 9. Durée de gestation en fonction du traitement thermique chez Vipera aspis.
Les cinq traitements thermiques correspondent à différentes fréquences et à différents temps d'exposition au cycle thermique mesuré en milieu naturel de femelles reproductives. Les barres noires et blanches représentent l'exposition au traitement reproductif et au traitement non-reproductif, respectivement. Les barres d'erreurs représentent les ES. Les symboles non connectés par la même lettre sont significativement différents. [Crédit photo : Matthieu Beronneau] (Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013)

Un facteur déterminant est notamment la température préférée. Cette dernière, lorsqu'elle est choisie par un adulte reproducteur, covarie généralement de façon adaptative avec l'optimum embryonnaire (Shine, 1995). La température préférée est d'une importance capitale pour la durée de développement (Lorioux et al., 2012; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013) ; (Figure 9). Par exemple, lorsque la température environnementale se maintient en-dessous de la température de préférence, les taux de développement sont ralentis, indépendamment du stade précoce pendant lequel la contrainte est rencontrée (Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013). La fenêtre temporelle où survient la naissance a des conséquences sur l'aptitude des individus (Le Henanff et al., 2013; Wapstra et al., 2010; Warner & Shine, 2007). Naitre plus tôt dans la saison permet par exemple d'augmenter les taux de croissance, ainsi que la survie (Warner & Shine, 2007). Ainsi, quand les parents manipulent l'environnement thermique et que les jeunes naissent plus tôt, ils ont de meilleures chances de survivre au premier hiver et sont plus grands à la fin de l'hibernation (Wapstra et al., 2010). C'est notamment dû au fait que la période d'activité avant l'hiver est réduite pour les jeunes nés plus tardivement (Le Henanff et al., 2013).

b. Effets phénotypiques à court et long termes

L'environnement thermique prénatal peut avoir des effets à court terme. De la même manière que tout autre paramètre environnemental, les effets ne seront pas les mêmes si ce paramètre est rencontré pendant ou en dehors de la fenêtre de sensibilité. Par exemple, chez les embryons de poisson, cette fenêtre de sensibilité se situe au moment de l'organogénèse (Eme et al., 2015). Nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'une température plus haute entraînait un développement plus rapide. Cependant, un autre phénomène souvent rencontré chez les ectothermes est celui de la « règle température-taille » (traduit de l'anglais, *temperature-size rule*) ; (Walczyńska et al., 2016). Ainsi plus la température environnementale pendant le développement sera basse et plus l'individu aura une taille corporelle importante à la fin de son développement (Walczyńska et al., 2016). Cela s'explique par le fait que le taux de croissance (ou accumulation de biomasse) et le taux de développement dépendent tous deux de la température mais de manière différente (Forster et al., 2011; Zuo et al., 2012) ; (Figure 10). Cette règle est également observable chez les endothermes (Hepp et al., 2006). Cependant, des contre exemples existent et la relation inverse peut être observée, notamment lorsque cela présente des avantages adaptatifs (Walters & Hassall, 2006). De plus, la température moyenne est importante, mais la fluctuation de la température l'est également (Colinet et al., 2015; J. K. Webb et al., 2001). Par exemple, un environnement thermique fluctuant impactera la taille et la forme à l'éclosion mais aussi le comportement (J. K. Webb et al., 2001).

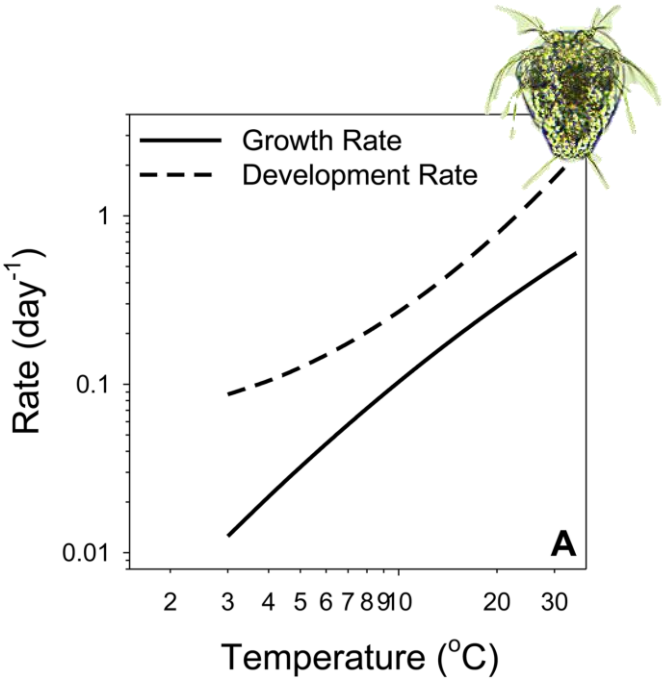


Figure 10. Taux de croissance et de développement de copépodes en fonction de la température. Le taux de développement est représenté en trait pointillé et le taux de croissance en trait plein. Comparaison des modèles allométriques complexes dérivés des données de croissance ($\ln g = -1.65_{(0.14)} + 1.47_{(0.20)} * \ln T_c - 0.14_{(0.16)} * \ln T^2_c$) et des taux de développement ($\ln D = -0.73_{(0.06)} + 1.57_{(0.06)} * \ln T_c + 0.32_{(0.04)} * \ln T^2_c$). Les données des nauplius et de copépodites ont été utilisées pour la croissance, et les données des œufs, des nauplius et des copépodites pour le développement. [Crédit photo : Maurice Loir] (Forster et al., 2011)

L'environnement thermique peut avoir des effets à long terme. Nous avons abordé les effets de cuillère d'argent dans un chapitre précédent mais des effets de report (traduit de l'anglais, *carry-over effects*) peuvent également apparaître (Monaghan, 2008). Par exemple, l'environnement thermique prénatal programme la production hormonale postnatale, ainsi que la physiologie de la croissance, ce qui peut profondément impacter l'aptitude sur le long terme (Singh et al., 2020). De même, un environnement thermique postnatal plus froid peut modifier les comportements de défense sur le long terme et ainsi rendre les individus plus agressifs (Aïdam et al., 2013). Ici aussi, la moyenne, mais aussi la fluctuation de la température, peuvent être déterminantes (J. K. Webb et al., 2001). Un environnement plus fluctuant peut par exemple améliorer les performances de locomotion (J. K. Webb et al., 2001).

Les conditions thermiques de développement peuvent donc avoir des effets à court et long termes, et ce, qu'il s'agisse de l'environnement pré ou postnatal. Des effets croisés des conditions thermiques pré et postnatales existent également (Watkins & Vraspir, 2006). L'interaction des conditions thermiques pré et postnatales peut par exemple modifier certains critères morphologiques indépendants de la taille corporelle (Watkins & Vraspir, 2006). Elle peut aussi modifier certains paramètres comportementaux, comme les performances

d'accélération (Watkins & Vraspir, 2006). Il est alors possible que les individus soient capables de modifier leurs préférences thermiques dans l'objectif de compenser l'environnement thermique prénatal rencontré (Watkins & Vraspir, 2006). Certains effets des conditions précoces peuvent être persistants. Par exemple, des jeunes soumis à un environnement thermique froid au stade prénatal peuvent ne jamais atteindre la taille de ceux soumis à un environnement thermique chaud et ce, indépendamment de la température rencontrée pendant le développement postnatal (G. D. Smith et al., 2015).

L'étude des effets des conditions thermiques s'est principalement concentrée sur des régimes thermiques constants au cours du développement (Farmer, 2000). Cependant, ces aspects ont rarement été examinés dans un contexte d'interaction en séparant les stades de développement (mais voir Goldstein et al., 2017; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Watkins & Vraspir, 2006). Dans ce contexte, il semble alors nécessaire d'étudier les effets des environnements thermiques pré et postnataux en interaction afin d'identifier plus clairement la sensibilité relative de chacun des stades du développement, ainsi que des effets potentiels à long terme et en interaction.

5. Les effets thermiques parentaux

Les conditions thermiques peuvent donc impacter les embryons et les jeunes de manière directe, mais aussi par l'intermédiaire de son parent. Par exemple, la température maternelle pré oviposition peut modifier la durée d'incubation et potentiellement le stade de développement à l'oviposition (oviposition à un stade plus précoce quand la température est plus haute) ; (Du et al., 2005). A une température plus élevée, les femelles peuvent ainsi répéter les évènements reproducteurs au cours de la saison et obtenir de meilleures performances de reproduction, tout en limitant les impacts sur les jeunes (Du et al., 2005). En effet, le traitement thermique ne semble pas modifier la taille des jeunes à l'oviposition (Du et al., 2005). Chez d'autres espèces, un environnement thermique plus chaud peut également augmenter le succès à l'éclosion ainsi que la taille corporelle des jeunes (Telemeco et al., 2010). Ces effets thermiques parentaux peuvent être observés en situation contrôlée en laboratoire mais aussi en milieu naturel sur le terrain (Telemeco et al., 2010).

Les parents peuvent manipuler l'environnement thermique et il a été mis en évidence chez de nombreuses espèces une modification des préférences thermiques parentales pendant la période de reproduction (Foucart et al., 2018; Le Galliard et al., 2003; Lorioux, Lisse, et al., 2013; Lourdais et al., 2008). Les parents peuvent aussi intervenir pour réguler l'environnement thermique de leurs jeunes, même quand ils ne partagent pas le même milieu. Par exemple, il a

été montré que certains amphibiens peuvent construire des canaux pour irriguer les points d'eau dans lesquels se développent leurs jeunes afin d'en faire baisser la température (Cook et al., 2001). Les parents peuvent aussi sélectionner le site d'oviposition en fonction de la température (Dvořák & Gvoždík, 2009).

Les conditions thermiques peuvent induire de la plasticité dans l'expression des comportements parentaux. Par exemple, la précision des comportements de thermorégulation peut être plus importante lorsque les contraintes sont plus élevées (Bouazza et al., 2016). Le comportement d'incubation peut aussi être ajusté en fonction des conditions thermiques (Stahlschmidt & DeNardo, 2009) et la reproduction peut même être reportée quand les conditions environnementales sont trop drastiques (Reed et al., 2009). La répartition des espèces pourrait même être parfois dépendante des prérequis thermiques des embryons (Lourdais et al., 2004). Enfin, l'environnement thermique peut aussi inciter certains parents à abandonner leurs œufs, notamment lorsque les températures sont trop chaudes et que la taille de ponte est trop faible (Kight et al., 2006) ; (Figure 11).

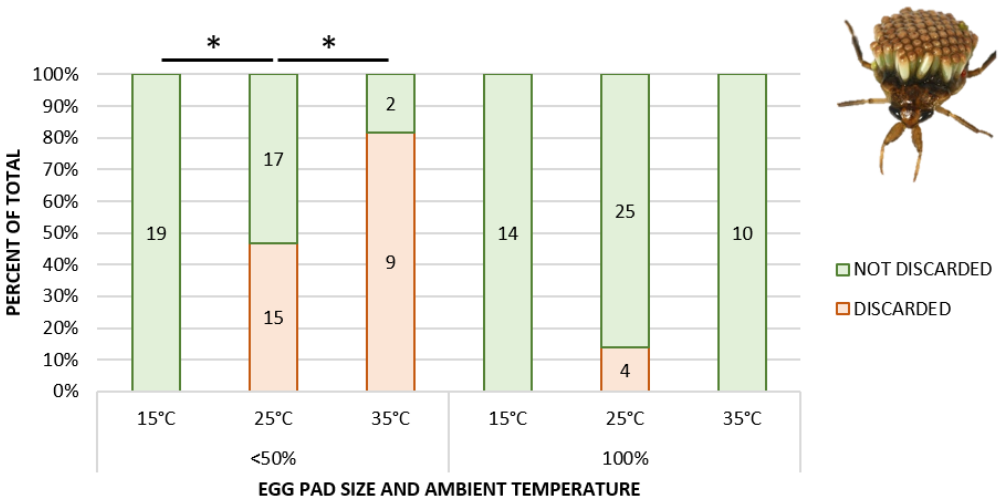


Figure 11. Relation entre température ambiante, taille de ponte et probabilité d'arrêter les soins chez Belostoma flumineum.
[Crédit photo : Joshua Daskin] Modifié d'après (Kight et al., 2006).

D'un point de vue évolutif, différentes hypothèses ont été formulées sur les répercussions de la régulation thermique du développement. Ainsi, le contrôle parental des conditions thermiques pourrait avoir un rôle majeur dans la transition évolutive vers l'endothermie (Angilletta & Sears, 2003; Farmer, 2000) ou dans l'évolution de la viviparité (Shine, 2005). Approfondir les connaissances au sujet des liens existant entre environnement thermique et soins parentaux pourrait ainsi permettre d'apporter certaines réponses quant à l'évolution des comportements parentaux et le contrôle de la température par les animaux.

E. Objectifs de la thèse

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans la problématique de compréhension des impacts de l'environnement abiotique, et notamment thermique, sur la phénologie, la morphologie, la physiologie et le comportement d'une espèce d'amphibien avec SPM exclusifs à savoir, l'Alyte accoucheur (*Alytes obstetricans*). Ce dernier est un petit crapaud fouisseur qui utilise des refuges diurnes pour se protéger des contraintes environnementales biotiques et abiotiques. Pendant l'accouplement, qui a lieu à terre, le mâle aide la femelle à émettre les œufs, puis, les accroche à ses membres postérieurs. Il les porte ensuite pendant tout le développement embryonnaire. Une fois le développement embryonnaire achevé, le mâle rejoint un point d'eau où il dépose sa ponte et ses têtards prêts à éclore.

Mon travail se structure en trois chapitres visant à comprendre les coûts et bénéfices de cette stratégie de reproduction. **Mon hypothèse générale est que les influences des conditions thermiques et la sensibilité des embryons aux stades précoces jouent un rôle clé dans l'expression de cette stratégie de reproduction.**

Chapitre I. Caractérisation des contraintes thermiques

J'ai tout d'abord étudié le lien existant entre les contraintes environnementales et le comportement des Alytes accoucheurs sur le terrain. J'ai commencé par tester l'hypothèse que les contraintes environnementales impactaient leur choix de microhabitats afin de mettre en évidence une thermorégulation active. Pour cela, des refuges artificiels ont été utilisés et l'utilisation de ces refuges par les Alytes accoucheurs a été relevée régulièrement pendant plusieurs semaines. Par la suite, j'ai testé si les mâles modifiaient leurs comportements de thermorégulation en fonction des contraintes environnementales et de leur statut de reproduction. Des relevés de température sur le terrain ont été couplés à des mesures de préférences thermiques en laboratoire pour mesurer les comportements de thermorégulation. Enfin, des mâles avec leur ponte ont été soumis à différents traitements thermiques en enceinte climatique pour mettre en évidence l'effet des préférences thermiques des mâles porteurs sur le développement des embryons jusqu'à la naissance.

Prédictions :

- Les Alytes accoucheurs devraient sélectionner leur refuge diurne en fonction de leurs propriétés hydriques et thermiques et des conditions environnementales (Heard et al., 2008; Mitchell & Bergmann, 2016).

- Les Alytes accoucheurs devraient sélectionner des températures plus chaudes quand ils portent leurs œufs que lorsqu'ils sont seuls pour optimiser leur développement (Cook et al., 2001; Le Henanff et al., 2013; E. Wells et al., 2015).
- La température des mâles devraient varier au cours de la saison de reproduction et les conditions thermiques devraient être plus contraignantes en début de saison (Bouazza et al., 2016; Le Henanff et al., 2013).
- Enfin, une faible augmentation de température devrait permettre de réduire significativement la durée d'incubation (Singh et al., 2020).

Chapitre II. Coûts des soins parentaux, fécondité et désertion parentale

Dans un second temps, j'ai examiné la nature des coûts associés au port des œufs. J'ai notamment examiné l'hypothèse de l'altération des performances de locomotion en relation avec le statut de reproduction et l'influence directe du nombre d'œufs sur ces coûts. J'ai également examiné les déterminants de la désertion des œufs chez les mâles.

Prédictions :

- Les performances de locomotion des mâles porteurs devraient être plus faibles que celles des mâles non-porteurs (Burris, 2011; Ruhland et al., 2016).
- La charge des œufs (taille de ponte relative) devrait négativement influencer la locomotion des mâles (Dugas et al., 2015; Royle et al., 2012; Stearns, 1992).
- L'abandon des œufs devrait être plus fréquent chez les mâles avec des tailles de ponte faibles et impliquant donc des coûts moins importants au niveau de l'aptitude (Consolmagno et al., 2016).

Chapitre III. Influences thermiques pré et postnatales sur le développement

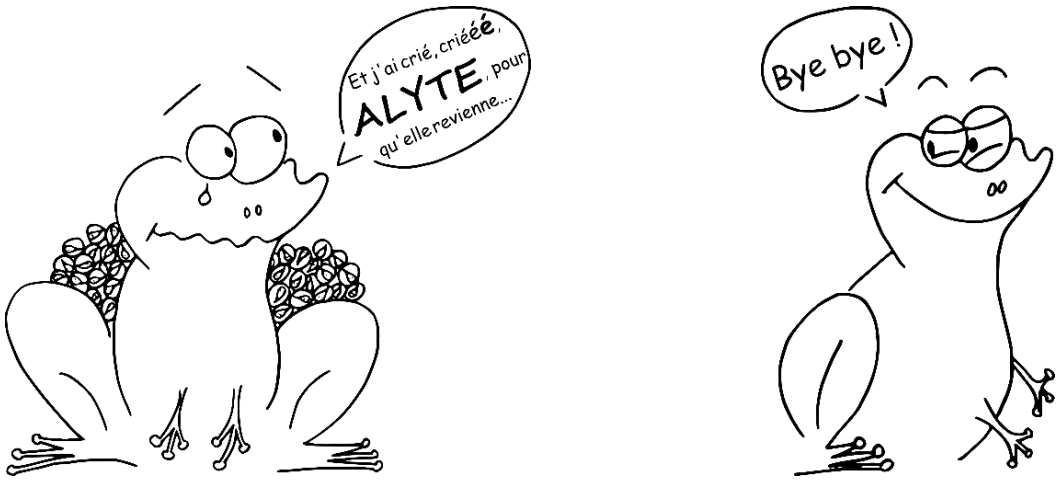
Enfin, j'ai examiné les effets des conditions thermiques aux stades embryonnaire (œuf) et larvaire (têtard) pour comprendre les influences à court terme et les effets persistants sur la vitesse du développement (effets phénologiques) et les caractéristiques des jeunes (effets phénotypiques). Pour cela, des mâles et leur ponte ont été à nouveau placés en enceinte climatique sous différents traitements puis les têtards ont été récupérés à la naissance et redistribués dans les mêmes traitements thermiques afin d'obtenir un plan factoriel complet.

Prédictions :

- Les conditions de vie précoce (stade œuf) devraient fortement influencer la vitesse et la qualité du développement du fait de la forte sensibilité thermique des embryons (Angilletta et al., 2010; Farmer, 2000; Gillooly et al., 2001).
- Les conditions postnatales devraient avoir des effets marqués sur les trajectoires de développement chez cette espèce, dont la saison de reproduction est longue, et donc avec un développement larvaire en milieu aquatique aux conditions thermiques variables (Maciel & Juncá, 2009).
- Des effets d'interaction entre les conditions thermiques embryonnaires et larvaires sont attendus sur la morphologie, la phénologie, la physiologie et/ou le comportement des jeunes (Watkins & Vraspir, 2006).

Les deux premiers chapitres sont présentés sous la forme d'articles dans la suite du manuscrit. Le troisième est lui présenté sous la forme d'une ébauche d'article et de résultats préliminaires ; toutes les données de la dernière expérimentation n'étant pas encore disponibles.

MATERIEL & METHODES



© L. Lange

« Pour réaliser une chose vraiment extraordinaire, commencez par la rêver. Ensuite, réveillez-vous calmement et allez d'un trait jusqu'au bout de votre rêve sans jamais vous laisser décourager. C'est la seule méthode que je connaisse. » - Walt Disney

A. Origine et évolution des amphibiens

Les amphibiens sont une classe de vertébrés tétrapodes non-amniotes qui se situe phylogénétiquement à l'interface entre les poissons et les amniotes (Figure 12). Les amphibiens actuels (Lissamphibiens) regroupent 6824 espèces réparties en trois ordres : les Gymnophiona (183 espèces), les Caudata (580 espèces) et enfin les Anura ou anoures (6061 espèces, soit plus de 88%) ; (d'après les données de l'UICN). Les premiers amphibiens ont ainsi dû acquérir des caractéristiques physiologiques, morphologiques, comportementales et écologiques pour gagner de l'indépendance vis à vis d'une existence purement aquatique (Crump, 2015).

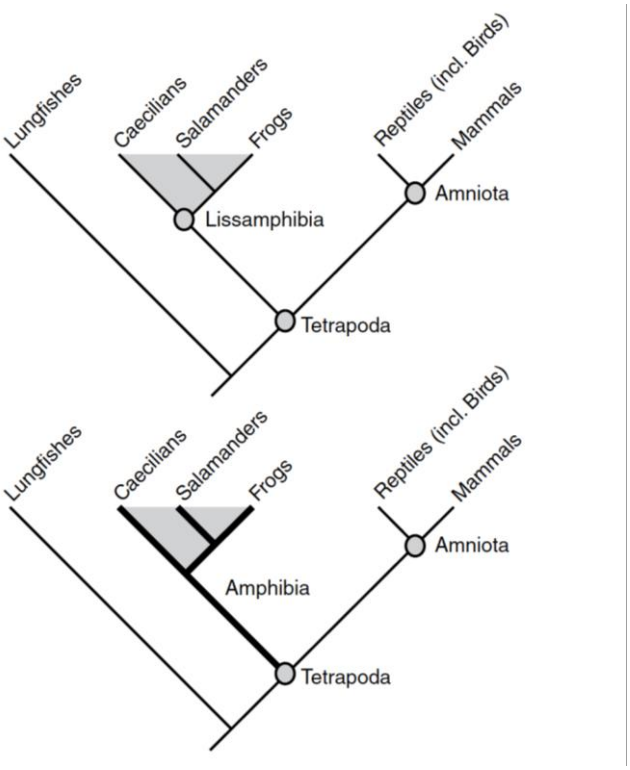


Figure 12. Relations entre les tétrapodes.
Les lissamphibiens sont un groupe monophylétique composé des caecilies (Gymnophyona), des salamandres (Caudata) et des grenouilles (Anura). Le terme Amphibien est plus large et désigne également les groupes parents. (Schoch, 2014)

Les anoures présentent une importante diversité et constituent un groupe de choix pour étudier les adaptations qui ont pu s'opérer pendant la transition vers le milieu terrestre (M. E. Svensson & Haas, 2005). Ces adaptations sont observables sur différents paramètres, par exemple au niveau de la peau (Alibardi, 2003) ou encore au niveau des systèmes nerveux et sensoriel (Fritzsch, 1990). Elles devraient être apparues au cours de processus semblables à ceux induits par la métamorphose des amphibiens actuels (Schoch, 2009, 2014).

B. Cycle de vie

La plupart des lissamphibiens présente la caractéristique d'occuper l'environnement aquatique et terrestre, simultanément et/ou à différents stades de leur cycle de vie. Ils présentent un cycle de vie complexe, influencé par de multiples variables environnementales au cours du développement (vie embryonnaire, larvaire), ce qui peut avoir des conséquences même après la métamorphose (Cayuela et al., 2020) ; (Figure 13). La transition ontogénique à la vie aérienne implique des changements très importants, notamment au niveau des appareils respiratoire et digestif, qui s'opèrent au cours de la métamorphose (Burggren & Infantino, 1994; Hourdry et al., 1996).

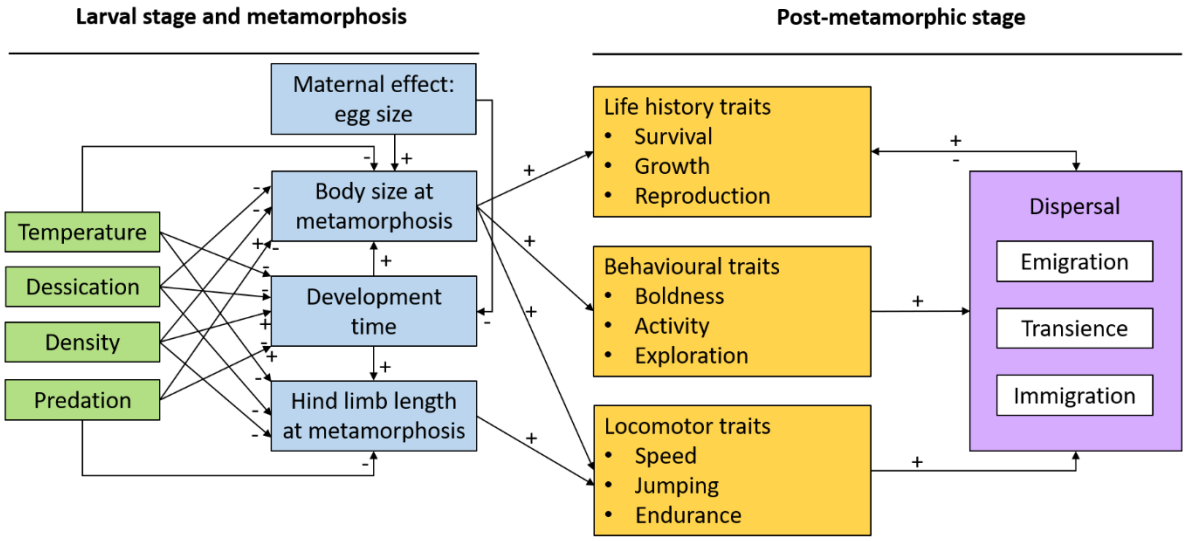


Figure 13. Cadre conceptuel montrant les effets prolongés (positifs '+' ou négatifs '-') des conditions environnementales pendant la croissance larvaire sur les traits relatifs à l'aptitude, les traits comportementaux et les traits de locomotion.
En vert sont représentées les caractéristiques du site de reproduction, en bleu celles du développement larvaire, en jaune les performances post-métamorphoses et en violet les caractéristiques associées à la dispersion. Un symbole « + » indique une influence positive, alors qu'une symbole « - » indique une influence négative.
(Cayuela et al., 2020)

Les lissamphibiens présentent la plus grande diversité en stratégie de reproduction et de soins parentaux chez les vertébrés (Crump, 1996; Duellman & Trueb, 1994). Ils peuvent notamment se reproduire en milieu aquatique ou en milieu terrestre. Cette diversité semble ainsi avoir évolué en réponse aux contraintes hydriques et thermiques qui s'exercent sur les œufs et les embryons en milieu terrestre (Lion et al., 2019; Seymour, 1999; Vági et al., 2019). Ces effets sont également identifiables du point de vue de la distribution spatiale des espèces (Lion et al., 2019).

C. Le genre *Alytes*

Le genre *Alytes* regroupe trois sous-genres et 5 espèces (Maia-Carvalho et al., 2014), toutes de petite taille (<5cm), avec de larges yeux à la pupille verticalement fendue (E. Wells et al., 2015) ; (Figure 14).

Figure 14. Morphologie des Alytes.
(En haut à gauche) Adulte de A. cisternasii ; (en haut à droite) Juvénile de A. cisternasii ; (au milieu à gauche) A. dickhilleni ; (au milieu à droite) Juvénile de A. maurus ; (en bas à gauche) Femelle de A. muletensis ; (en bas à droite) Adulte de A. obstetricans. [Crédits photos : (en haut à gauche) Sergé Bogaerts, (en haut à droite) Sergé Bogaerts, (au milieu à gauche) Wouter Beukema, (au milieu à droite) Rafael Marquez, (en bas à gauche) Benjamin Tapley, (en bas à droite) Benjamin Tapley] (E. Wells et al., 2015)

Le sous-genre *Ammoryctis* est celui de l'espèce *Alytes cisternasii*, espèce endémique au centre et au sud-ouest de la péninsule ibérique (Maia-Carvalho et al., 2014) ; (Figure 15). Le sous-genre *Baleaphryne* regroupe trois espèces : *Alytes muletensis*, provenant de l'ile de Majorque, située dans l'archipel des Baléares ; *Alytes dickhilleni*, espèce endémique aux cordillères bétiques du sud-est de l'Espagne ; et *Alytes maurus*, située en Afrique du Nord, au Maroc et en Algérie (Maia-Carvalho et al., 2014). Enfin, *Alytes obstetricans* (l'Alyte accoucheur) appartient au sous-genre *Alytes* (Maia-Carvalho et al., 2014). Cette espèce est largement distribuée en Europe de l'Ouest (Maia-Carvalho et al., 2014) ; (Figure 15).

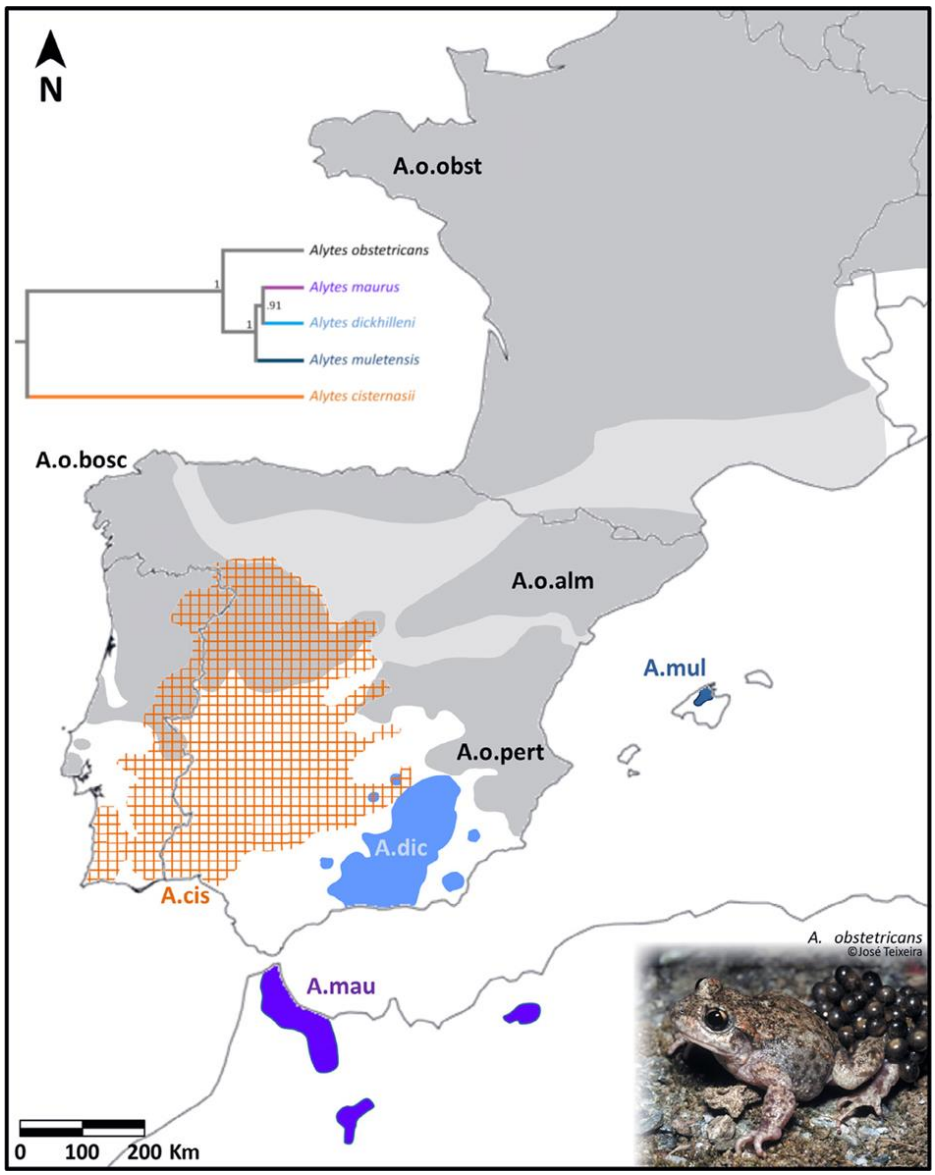


Figure 15. Distribution des cinq espèces d'Alytes et des quatre sous-espèces d'Alytes obstetricans. A.cis : Alytes cisternasii ; A.dic : Alytes dickhilleni ; A.mau : Alytes maurus ; A.mul : Alytes muletensis ; A.o.alm : Alytes obstetricans almogavarii ; A.o.bos : Alytes obstetricans boscai ; A.o.obst : Alytes obstetricans obstetricans ; A.o.pert : Alytes obstetricans pertinax. Les plages en gris clair représentent les aires où l'attribution aux différentes sous-espèces d'Alytes obstetricans est incertaine. Modifié d'après (Maia-Carvalho et al., 2014).

Toutes les espèces d'Alytes sont donc réparties au niveau de l'Ouest paléarctique (Figure 15). Cette zone climatique est contraignante et présente de faibles occurrence et fréquence de reproduction terrestre chez les lissamphibiens en comparaison à d'autres zones biogéographiques (Lion et al., 2019). Le mode de reproduction des Alytes est ainsi unique en Europe (E. Wells et al., 2015) avec des soins parentaux mâles (SPM) exclusifs. Tout d'abord, le mâle émet, en période de reproduction, un chant d'appel, hautement similaire à celui du hibou petit-duc : une note haute, explosive et musicale (Engelmann et al., 1985). Ensuite, l'accouplement (amplexus) et la fécondation ont lieu à terre. Le mâle applique une pression sur le ventre de la femelle pour faire sortir les œufs, attachés les uns aux autres par la gangue ovarienne ; il les collecte, les fertilise et se les attache au niveau de l'articulation distale des membres postérieurs ; les portant ainsi pendant toute la durée du développement embryonnaire (environ 32 jours) ; (Figure 16) ; (Márquez, 1990).

Figure 16. Photo d'un crapaud accoucheur mâle portant sa ponte accrochée à ses membres postérieurs. © M. Berroneau

Ce système de reproduction pourrait permettre de reporter le dépôt des œufs jusqu'à ce que des points d'eau soient disponibles (Márquez, 1992). Le mâle peut porter plusieurs pontes successives pendant la période de reproduction (Márquez, 1992; Pinya & Pérez-Mellado, 2014). Il peut aussi porter plusieurs pontes à la fois mais il est contraint de déposer tous les œufs en même temps, même s'ils ne sont pas au même stade de développement (Márquez,

1992). Les crapauds accoucheurs ont donc un cycle de vie utilisant à la fois l'habitat terrestre et l'habitat aquatique (E. Wells et al., 2015). Les adultes (et les mâles avec des œufs) occupent différents habitats terrestres avec végétation éparse (pierriers, murets, digues) ; (E. Wells et al., 2015) ; (Figure 17) ; les têtards, au contraire, étant déposés par les mâles dans des points d'eau appropriés (Bosch et al., 2009).

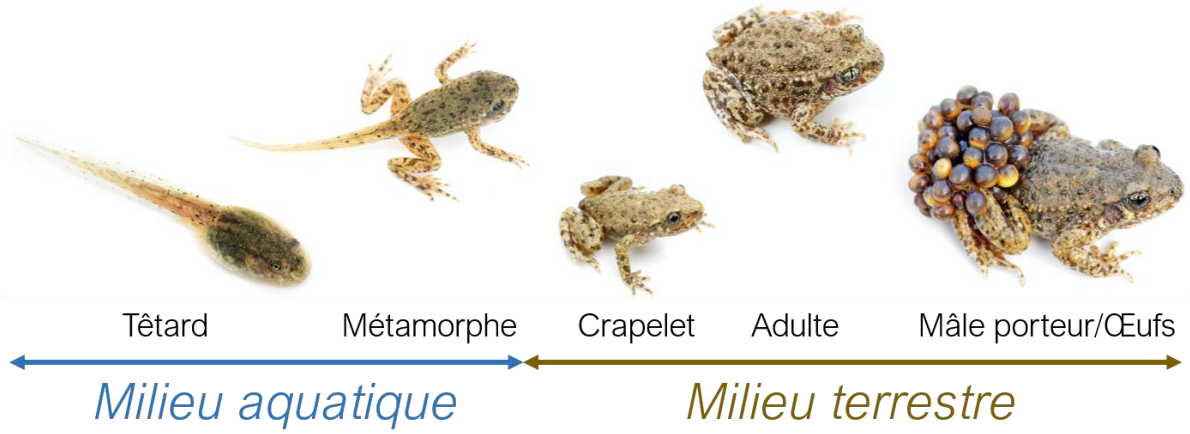


Figure 17. Cycle de vie du crapaud accoucheur.
© Modifié d'après M. Berroneau

D. Le crapaud accoucheur

1. Répartition

L'aire de répartition de l'Alyte accoucheur (*A. obstetricans)* s'étend du nord du Portugal jusqu'au centre de l'Allemagne en passant par le nord de l'Espagne, la France, la Belgique, le Luxembourg et la Suisse (Figure 15) ; (Bosch et al., 2009). Il existe 4 sous-espèces d'*Alytes obstetricans* (*A.obs*) : *A.obs obstetricans*, située en Europe de l'Ouest et au nord de la péninsule ibérique ; *A.obs almogavarii*, distribuée de l'est des Pyrénées au nord de Madrid, *A.obs pertinax*, présente dans le centre et l'est des régions de la péninsule ibérique et *A.obs boscai*, dans le nord et le centre du Portugal, la Galice, l'ouest de la Castille-Leon et le long de la chaine de montagnes du système central (Gonçalves et al., 2015) ; (Figure 15). Cette espèce est observable jusqu'à 2400 m d'altitude (Bosch et al., 2009). Son statut IUCN est « Least concern » (Bosch et al., 2009), bien que certaines populations soient en déclin (E. Wells et al., 2015).

2. Morphologie et écologie

Les individus adultes de cette espèce mesurent de 3 à 5 cm pour 3,7 à 6,8 g. Ce sont des anoures fouisseurs (E. Wells et al., 2015). Ils sont notamment capables de construire des tunnels et des cavités, qu'ils dissimulent en accumulant du substrat à l'extrémité du tunnel, à l'aide de leur tête (L. E. Brown & Crespo, 2000). Les adultes se nourrissent essentiellement d'insectes de taille variant entre 2 et 28 mm (E. Wells et al., 2015).

3. Reproduction

Le développement embryonnaire d'*Alytes obstetricans* dure environ 20 jours à 20°C, à température constante (Cambar & Martin, 1959) et est estimé à une période de 26 à 32 jours en milieu naturel (Márquez, 1992). La taille de ponte est variable entre populations (Pinya & Pérez-Mellado, 2014), avec des variations observées entre cinq et 171 œufs, pour une moyenne d'une soixantaine d'œufs (E. Wells et al., 2015). Enfin, la saison de reproduction varie en fonction de la localisation (E. Wells et al., 2015). Sur le site d'étude, elle peut s'étendre de fin février à fin septembre (comm. pers. Lange). Les mâles d'*Alytes obstetricans* déposent leurs œufs dans des zones d'eau stagnante ou à faible courant.

4. Développement des têtards

Les têtards mesurent 15 mm en moyenne à l'éclosion, *i.e.*, stade IV_5 de la table de développement des Alytes accoucheurs de Cambar & Martin, 1959, et atteignent 80 mm, en milieu naturel, en fin de croissance somatique, *i.e.*, stade IV_{15} (Engelmann et al., 1985; E. Wells et al., 2015) ; (Figure 18).

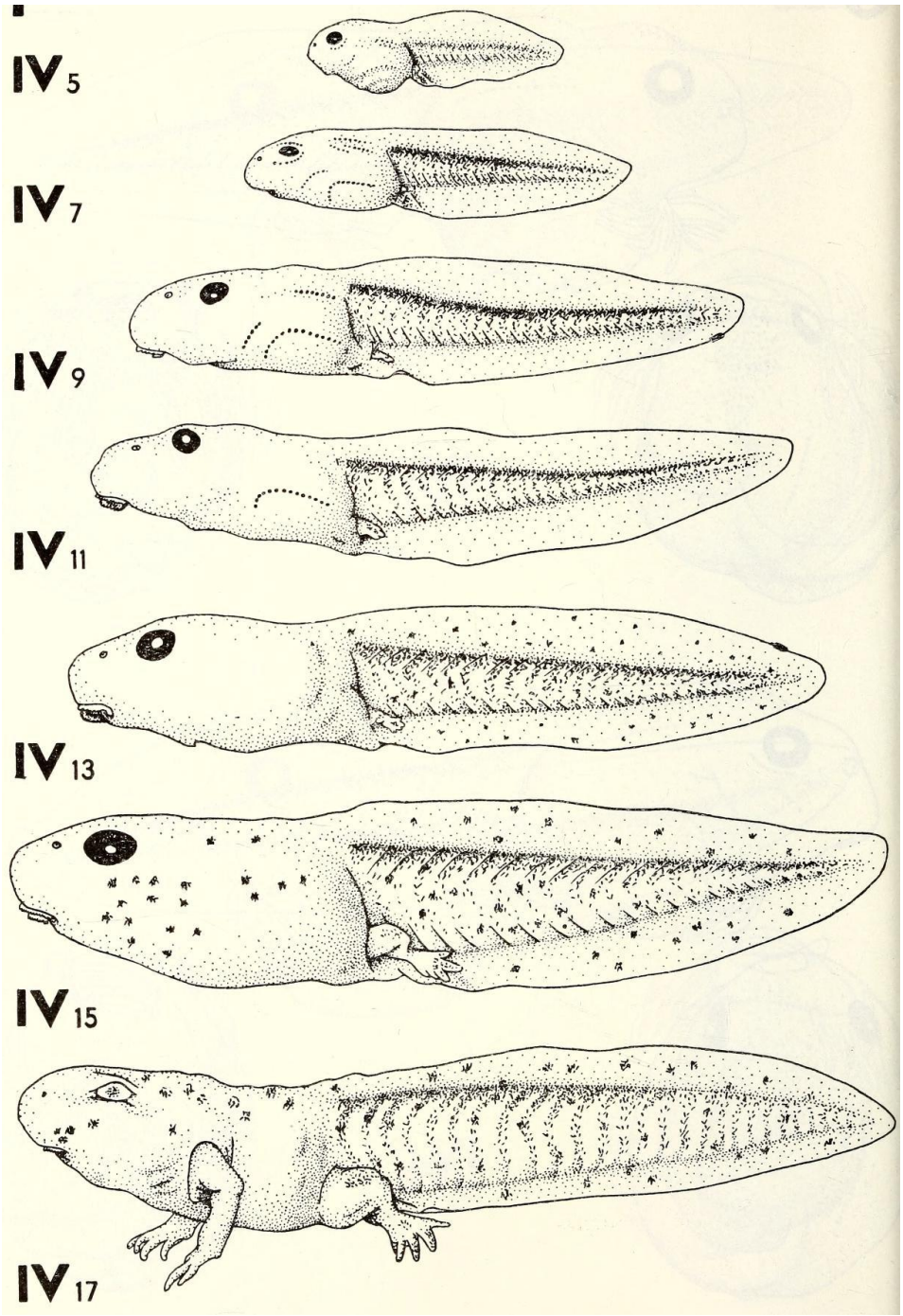


Figure 18. Table de développement des têtards d'Alytes obstetricans à une température constante de 20°C. (Cambar & Martin, 1959)

Cette espèce a la possibilité d'hiverner en phase larvaire, les têtards pouvant survivre même sous une épaisse couche de glace (Campeny & Casinos, 1989; Engelmann et al., 1985). Certains spécimens des Pyrénées françaises ont été recapturés sous forme larvaire trois ans après marquage par implant visible d'élastomère (E. Wells et al., 2015). Ils peuvent alors mesurer jusqu'à 11 cm dans ces conditions (E. Wells et al., 2015). Les têtards sont aussi sensibles aux interactions sociales : la croissance est plus importante et ils se métamorphosent plus tôt en présence de congénères (Guyétant, 1975).

E. Le suivi de population

1. La population étudiée

Tous les individus utilisés dans le cadre de ces travaux provenaient d'une même population : celle établie sur la zone de la scierie Marteau Bois de Villiers en Bois. Ce site est favorable pour l'Alyte accoucheur du fait de l'abondance de refuges favorables, notamment sous le bois et les matériaux stockés, ainsi que de substrat dans lequel ils peuvent s'enfouir, grâce à la sciure de bois présente sur le site (Figure 19).

Figure 19. Photo de terrain de la population étudiée.
© O. Lourdais

2. Le marquage individuel des adultes

Afin d'éviter des mesures multiples d'un même individu au cours d'une expérimentation, nous avons mis en place un protocole de marquage individuel, grâce à l'injection d'un nano transpondeur sous-cutané, en position dorsale (Figure 20). Ce marquage permet une relecture de l'identité de l'individu sur le terrain sans manipulation supplémentaire grâce à un lecteur de RFID (radio frequency identification). Ces transpondeurs ont été posés sur tous les individus ayant participé à des mesures en laboratoire.

Figure 20. Photo d'un nano transpondeur utilisé pour le marquage individuel.
© TROVAN

3. Refuges artificiels

Afin de capturer les individus nécessaires à nos différentes expérimentations, nous avons utilisé des refuges artificiels. Ces derniers ont démontré leur efficacité pour détecter les espèces au mode de vie caché, tels que les reptiles et les amphibiens (Hampton, 2007; Hoare et al., 2009; Latham & Knowles, 2008). En 2016, une première série de refuges avait été installée sur le site d'étude. Deux types de plaque refuge ont été disposés : tapis de carrière ou planche de bois. Sous chaque modalité, deux types de substrat ont été testés : avec sciure de bois ou bien sans substrat (Figure 21). Un total de 17 transects avec ces quatre modalités (pour un total de 68 refuges) a été réparti sur le site. À la suite d'une première expérimentation (CHAPITRE I. A.), l'intérêt du substrat a été démontré pour la sélection d'habitat du crapaud accoucheur (Lange et al., 2020).

Figure 21. Photo d'une série de 4 refuges artificiels placés sur le site d'étude en 2016 présentant les 2x2 modalités.
© G. Mercier

Le dispositif a été modifié en 2017 et du substrat a été ajouté sous tous les refuges. Une modalité a également été ajoutée avec des refuges en « bâche », présentant l'intérêt d'être en plastique comme les tapis de carrière mais de couleur claire (Figure 22). Huit transects de ces quatre modalités, pour un total de 24 refuges artificiels, ont ensuite été utilisés.

Figure 22. Photo des refuges artificiels placés sur le site d'étude en 2017 présentant les trois modalités. © M. Passerault

4. Variables collectées sur le terrain

La température et le taux d'humidité ambiant étaient collectés au début et à la fin de chaque session de terrain avec un thermo-hygromètre (LM-800). Pour chaque refuge artificiel, l'heure de contact était relevée, puis la température du substrat était collectée en soulevant doucement chaque refuge et en prenant la température en trois points équidistants les uns des autres, ainsi que des bords, et en suivant la médiane dans le sens de la longueur (Figure 23).

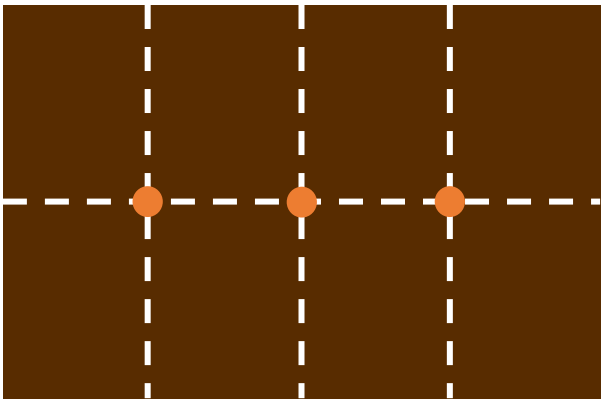


Figure 23. Schéma des points de prise de température du substrat sous les refuges artificiels. Les données étaient collectées au niveau des points orange, i.e., en trois points équidistants les uns des autres et des bords et en suivant la médiane dans le sens de la longueur © L. Lange

Quand des individus étaient présents sous le refuge, leur température dorsale était recueillie, puis la présence d'une puce RFID était recherchée grâce au lecteur de RFID. Leur catégorie d'âge était ensuite déterminée ('juvénile' si taille inférieure à 3 cm ; 'adultes' dans le cas contraire), ainsi que leur sexe ('mâle' si porteur d'œufs et/ou déjà connu ; 'femelle' si présence d'œufs dans la cavité et/ou connu ; à défaut 'non-déterminé'). Les données thermiques du substrat et des individus étaient collectées à l'aide d'un pistolet thermique infrarouge Raytek

Raynger MX2. En complément, les données de température ambiante recueillies par le site internet www.meteociel.fr au niveau de la station météorologique de Niort ont été utilisées (station la plus proche du site d'étude – environ 19 km du site d'étude).

F. Dispositifs expérimentaux en laboratoire

1. Conditions de maintien en captivité

Pendant les expérimentations au laboratoire, les individus étaient gardés individuellement dans des terrariums ou des aquariums, adaptés à leur stade de développement. Les terrariums des adultes contenaient un substrat composé d'un mélange de vermiculite et de tourbe, deux abris refuges sous la forme de tube de PVC coupé dans la longueur et d'un point d'eau destiné à l'immersion et/ou au dépôt des œufs (Figure 24).

Figure 24. Photo d'un terrarium individuel pour mâle adulte.
© L. Lange

Les jeunes étaient placés dans des aquariums, puis dans des terrariums, évoluant au fur et à mesure de leur développement (Figure 25). En dehors des expérimentations utilisant des enceintes climatiques (voir M&M. F. 4. a.), les animaux étaient placés sur un meuble d'élevage disposant d'un cordon chauffant à température réglable (Figure 26). Lorsque la durée de maintien en captivité était supérieure à trois jours, les animaux étaient nourris *ad libitum* avec des grillons de taille adaptée (pour les adultes et les jeunes sortis de l'eau) ou des épinards (pour les têtards).

Figure 25. Photos des aquariums et terrariums adaptés au stade de développement des jeunes. (En haut à gauche) Aquarium du stade naissance au stade apparition des articulations postérieures ; (en haut à droite) aquarium du stade apparition des membres antérieurs à la sortie de l'eau ; (en bas à gauche) terrarium de la sortie de l'eau à la régression de la queue ; (en bas à droite) terrarium de la régression de la queue au relâché en milieu naturel de l'individu. © L. Lange

Figure 26. Photo d'un meuble d'élevage disposant d'un cordon chauffant à température réglable
© L. Lange

2. Le gradient thermique

Afin de mesurer les préférences thermiques des individus, nous avons élaboré un dispositif permettant d'offrir un gradient thermique d'une ampleur suffisamment importante pour que la température mesurée soit bien la conséquence d'une préférence et non pas d'un maximum/minimum atteignable par les individus dans le gradient (Figure 27).

Figure 27. Photo du dispositif de gradient thermique.
© M. Passerault

Pour cela, nous avons construit une boite en PVC de 102 cm l x 72 cm L x 25,5 cm h. Un côté était chauffé par un cordon électrique réglé à 45°C ; le centre par un cordon réglé à 30°C ; et l'autre extrémité était refroidie par des tuyaux de cuivre traversés par un courant d'eau et de solution antigel, refroidis par une unité de froid, réglée à 5°C. Six compartiments (68 cm L x 16 cm l) en aluminium (pour ses propriétés conductrices) avaient été placés au-dessus du gradient thermique (Figure 28). Les compartiments étaient ensuite remplis d'un mélange composé de 100g de vermiculite et de 250g d'eau et d'un long abri (tube PVC coupé en 2 de 66 cm L x 11 cm l x 4,5 cm h) recouvrant la totalité de la longueur du compartiment et de ce fait, toutes les températures. Nous avons ainsi obtenu un gradient thermique progressif s'échelonnant de 15°C à 45°C.

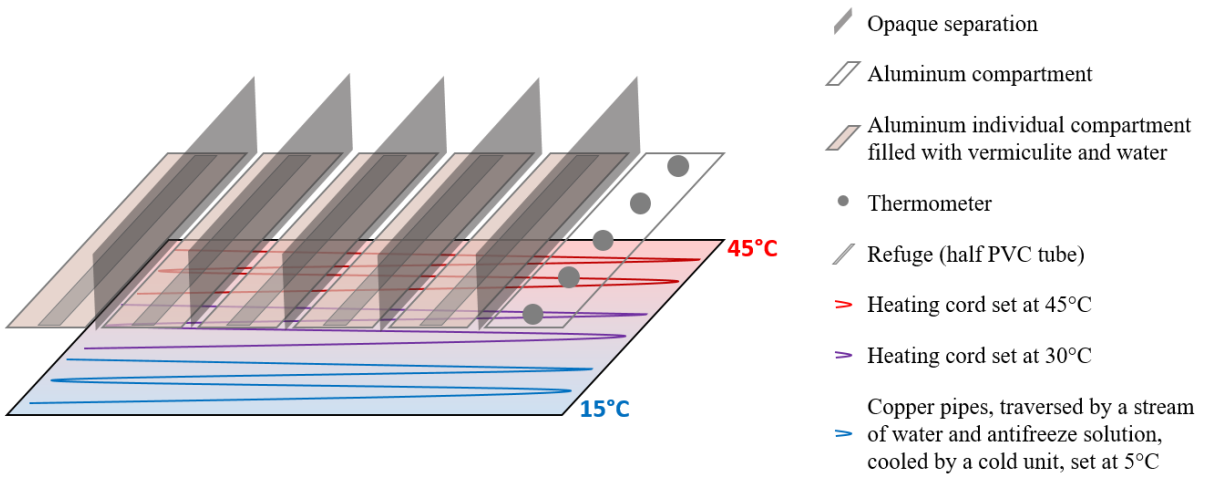


Figure 28. Schéma expliquant le montage du dispositif de gradient thermique.
© L. Lange

3. Mesures de locomotion des adultes

Différents indicateurs de la locomotion des mâles (porteurs de leurs œufs ou non), ont été mesurés : les performances de saut, le temps de retournement, la réponse musculaire à la charge et la locomotion libre. Ils sont décrits ci-dessous.

a. Les performances de saut

Pour mesurer les performances de saut des mâles avec ou sans œufs, les mâles ont été placés sur un morceau de gazon synthétique. Ils ont ensuite été stimulés doucement au niveau de l'urostyle pour initier un saut (Figure 29). Un seul expérimentateur a été impliqué dans la mesure de toutes les performances de saut.

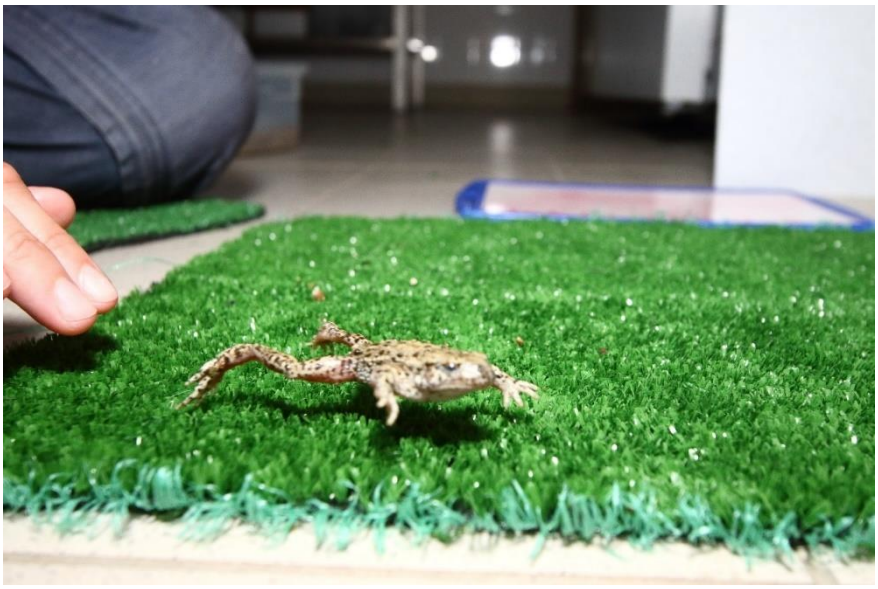


Figure 29. Photo d'un mâle sans œufs pendant une session de mesure des performances de saut.
© M. Passerault

Les sessions ont été filmées (caméra SONY HDR-XR100) en vue du dessus. Des captures d'écran ont ensuite été réalisées sur ordinateur, puis traitées pour les rendre transparentes et ainsi superposer le point de départ et le point d'arrivée du crapaud. Le logiciel ImageJ a été utilisé pour obtenir la distance du saut (en cm) en fonction de l'échelle présente sur l'image.

b. Le temps de retournement

Pour mesurer le temps de retournement des mâles avec ou sans œufs, ils ont été placés sur une surface plastique (Figure 30). Les sessions ont été filmées en vue de dessus. Les vidéos ont ensuite été traitées informatiquement en comptant le nombre d'images entre la première image (moment où les deux mains de l'expérimentateur ne touchent plus le crapaud), et la dernière image (moment où le crapaud est revenu dans sa position habituelle, *i.e.*, sur ses quatre pattes). Le nombre d'images a ensuite été converti en secondes. Un seul expérimentateur a été impliqué dans toutes les mesures de temps de retournement.

Figure 30. Photos illustrant la réponse de retournement d'un mâle avec ses œufs.
© M. Passerault

c. La réponse musculaire à la charge

Pour mesurer la réponse musculaire à la charge des mâles avec ou sans œufs, les mâles ont été maintenus, au niveau axillaire en position verticale, les pattes postérieures dans le vide (Figure 31). Un chronomètre a été déclenché par un observateur au moment où l'expérimentateur cessait de soutenir les pattes postérieures à l'aide de sa seconde main. Il a ensuite été arrêté au moment où le crapaud relâchait ses pattes dans le vide (Figure 31). Un seul expérimentateur a été impliqué dans toutes les mesures de réponse musculaire à la charge.

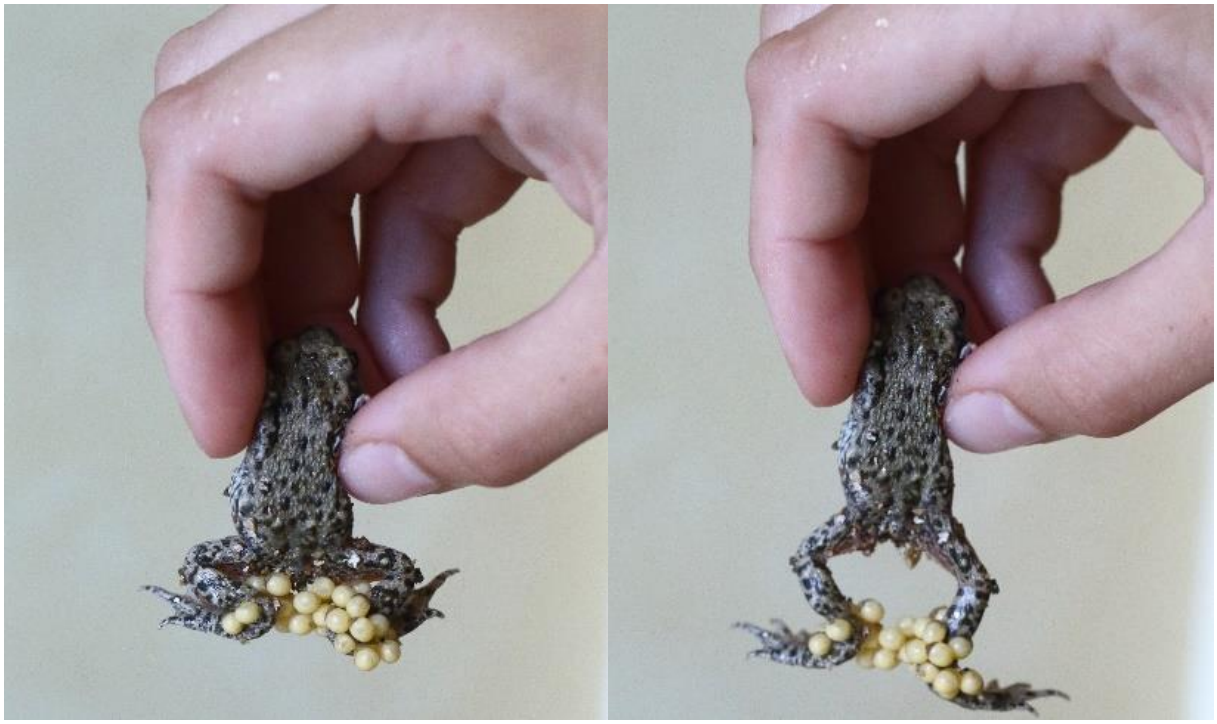


Figure 31. Photos illustrant la réponse d'un mâle avec des œufs à la mesure de réponse musculaire à la charge. © M. Passerault

d. La locomotion libre

Pour mesurer la locomotion libre des mâles avec ou sans œufs, nous avons utilisé une arène, conçue à partir d'une jardinière en PVC de 73 cm l x 11 cm L x 7 cm h (Figure 32). Le fond était recouvert de gazon synthétique. Un abri similaire à ceux placés dans leur hébergement de captivité a été placé à une extrémité. L'individu était placé à l'autre extrémité. Les sessions ont été filmées en vue de dessus. Les vidéos ont ensuite été traitées informatiquement pour relever les paramètres comportementaux. Un seul expérimentateur a été impliqué dans le traitement de toutes les vidéos de locomotion libre.

Figure 32. Photo illustrant le dispositif de mesure de la locomotion libre.
© M. Passerault

4. Manipulation des conditions de développement

a. Enceintes climatiques et régimes thermiques imposés

L'approche expérimentale offre un moyen robuste pour examiner les effets des conditions thermiques sur le développement dans un contexte standardisé. Cela permet de tester l'effet de conditions imposées tout en évitant les interactions avec des facteurs confondants. La manipulation des conditions thermiques de développement a été largement utilisée sur différents groupes et notamment les ectothermes. Nous avons utilisé des enceintes climatiques Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany (Figure 33). Elles permettent une régulation permanente de la température avec un excellent degré de précision. Elles étaient contrôlées via le logiciel S!MPATI*.

Figure 33. Enceinte climatique utilisée pour contrôler les conditions de développement des jeunes. © L. Lange

En 2018, l'effet des températures prénatales a été testé. Pour cela, des mâles porteurs ont été placés en enceinte climatique et répartis dans trois températures constantes : 18°C, 20°C et 22°C. Ces températures ont été choisies autour des préférences thermiques des mâles mesurées dans le gradient thermique, 20°C correspondant à la moyenne des températures mesurées. Six mâles et leurs œufs ont été placés dans le traitement thermique à 18°C, quatre mâles dans le traitement thermique à 20°C et six, dans le traitement thermique à 24°C.

En 2019 et 2020, les températures pré et postnatales croisées ont été manipulées. Les traitements thermiques ont été accentués à 16°C, 20°C et 24°C. Ces températures correspondent à celles mesurées dans le milieu naturel pendant la période de reproduction. 10 mâles par traitement ont été utilisés, puis après l'éclosion, neuf têtards par mâle ont été répartis dans les trois mêmes traitements thermiques, *i.e.*, trois têtards par mâle par traitement postnatal (Figure 34). Cette approche a donc permis un plan factoriel complet 3x3.

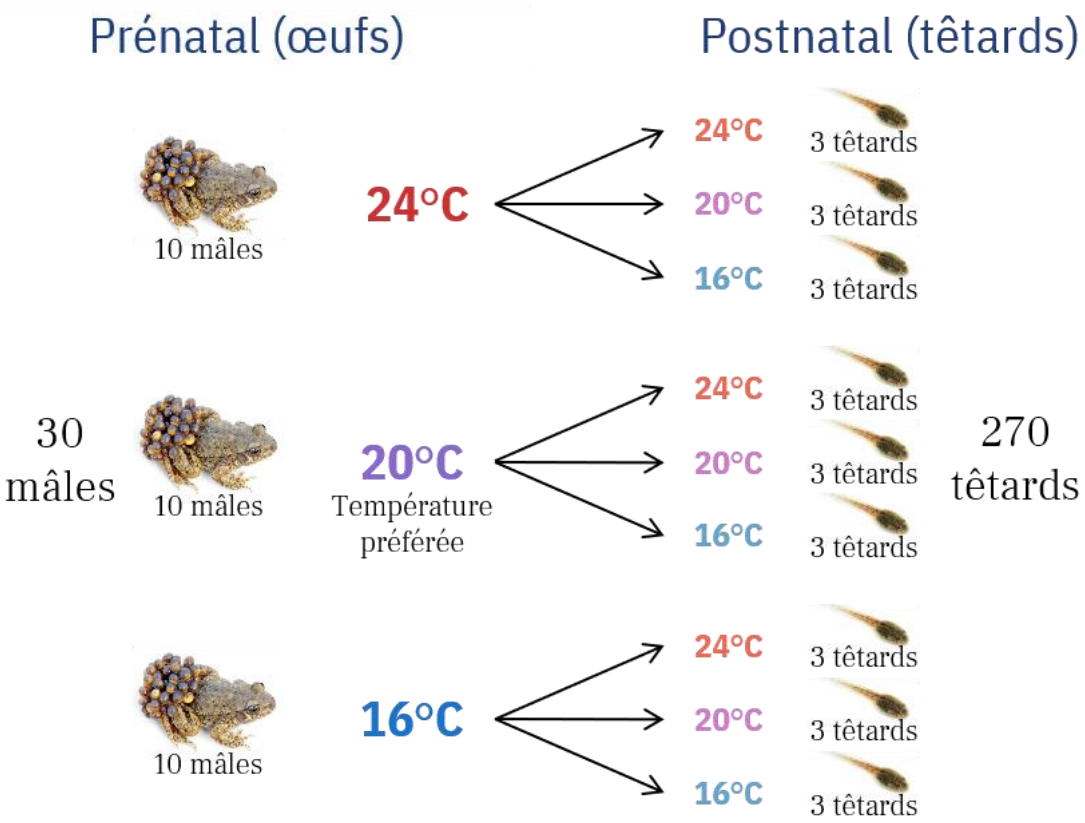


Figure 34. Schéma du protocole expérimental de manipulation des conditions thermiques pré et postnatales croisées.
© L. Lange

b. Le suivi du développement

Les jeunes issus de la manipulation des conditions thermiques pré et postnatales croisées ont été suivis tout au long de leur développement, du stade œuf jusqu'à 1 mois après la fin de leur métamorphose. Le suivi individuel n'étant pas possible au stade œuf, il a débuté à la naissance et s'est étendu jusqu'à leur relâché. Les mesures morphologiques, physiologiques, phénologiques et comportementales ont été collectées à différents stades : au stade précoce, au stade intermédiaire et au stade tardif du développement embryonnaire (développement prénatal), puis à la naissance, à l'apparition des articulations postérieures (stade AAP), à l'apparition des membres antérieurs (stade AMA), à la sortie de l'eau et à la régression totale de la queue (développement postnatal), et enfin 1 mois après la fin de la métamorphose, pour les mesures des effets persistants (Figure 35).

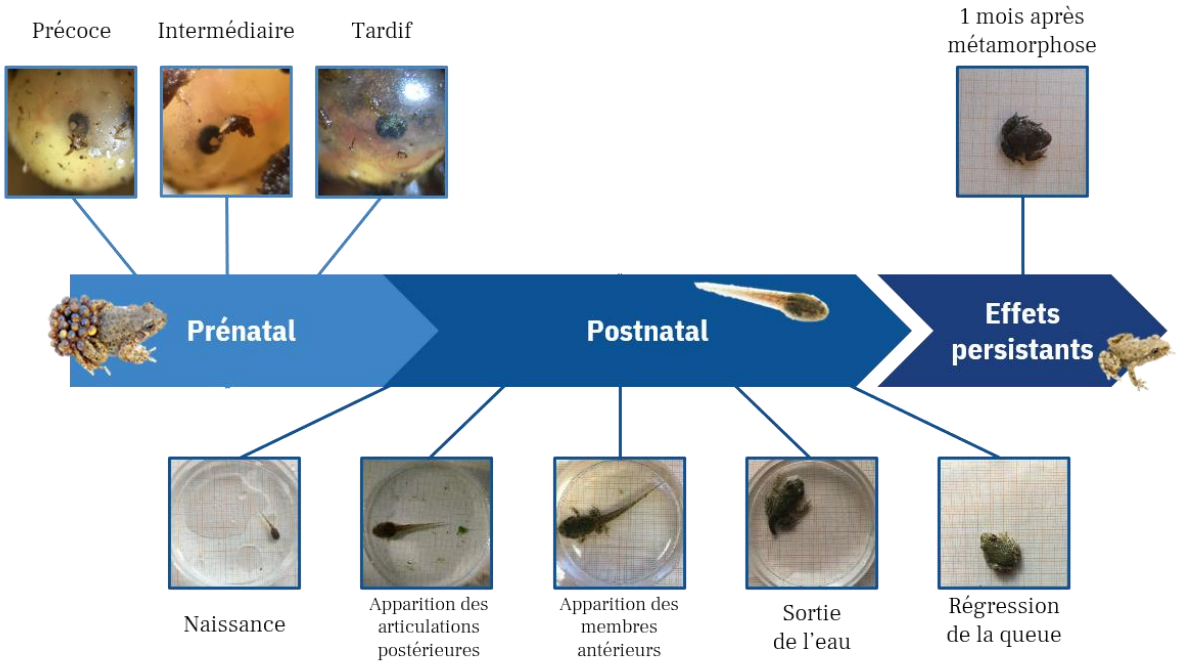


Figure 35. Frise chronologique du développement des jeunes et des stades auxquels les différentes mesures ont été réalisées.
© L. Lange (et M. Berroneau pour 3 photos)

5. Mesures réalisées sur les œufs, les têtards, les métamorphes et les crapelets

a. Morphologie

La taille moyenne des œufs (mm) a été évaluée à la capture des mâles. Pour cela, les mâles ont été photographiés avec leur ponte avec une échelle millimétrée au niveau de la ponte (Figure 36) et le diamètre de trois œufs sélectionnés aléatoirement a été mesuré à l'aide du logiciel ImageJ.

Figure 36. Exemple d'une photo réalisée pour mesurer le diamètre des œufs à la capture.
© L. Lange

Pour suivre la croissance des têtards, des mesures de morphologie ont été réalisées aux différents stades de référence (Figure 37). Pour cela, les individus étaient placés dans une boite de pétri transparente sur du papier millimétré. Le logiciel ImageJ a ensuite été utilisé pour obtenir les mesures en fonction de l'échelle fournie par le papier millimétré. A la naissance, la longueur corporelle totale, *i.e.*, museau-extrémité de la queue, a été mesurée sur la totalité des têtards nés, en face dorsale. Les mesures postérieures à la naissance ont été réalisées sur les individus gardés en expérimentation pour la manipulation de l'environnement thermique postnatal. Aux stades AAP et AMA, la longueur corporelle totale, la longueur museau-cloaque, la longueur de la queue ainsi que la largeur du corps au niveau des membres antérieurs ont été relevées, en face dorsale (Figure 37).

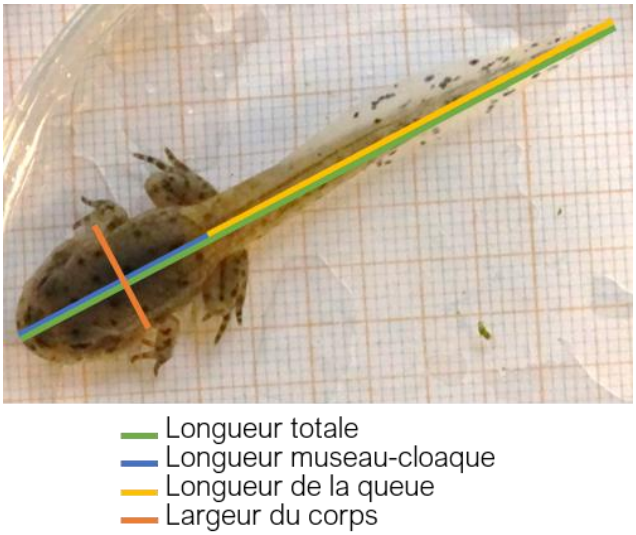


Figure 37. Schéma des mesures de morphologie réalisées sur un têtard au stade AMA. © L. Lange

A la sortie de l'eau, à la régression de la queue et au premier mois après la fin de métamorphose (*i.e.*, régression de la queue), les mesures ont été réalisées en faces dorsale et ventrale (longueur totale, longueur museau-cloaque, longueur de la queue et largeur du corps au niveau de membres antérieurs). A la régression de la queue et au premier mois, elles se sont limitées à longueur museau-cloaque et largeur du corps.

b. Mesures de fréquences cardiaques

La fréquence cardiaque est un paramètre important qui peut refléter les influences thermiques au cours du développement (Du et al., 2010). La mesure des fréquences cardiaques a nécessité l'utilisation de quatre méthodes différentes en fonction du stade de développement de l'individu (stade œuf, stades têtards antérieurs au stade AMA, stade AMA, stades postérieurs à la sortie de l'eau). Toutes les mesures ont été réalisées après 30 minutes d'équilibration à 20°C.

Au stade œuf

Les œufs d'Alyte accoucheur sont transparents. Cela permet de visualiser l'embryon, et notamment ses branchies, pendant son développement sans avoir à compromettre l'intégrité de l'œuf, ni même enlever la ponte des pattes du mâle. Les fréquences cardiaques des embryons au stade œuf ont donc été mesurées en les observant à la loupe binoculaire. Il était alors possible d'observer la circulation sanguine au niveau des branchies, jusqu'à ce que ces dernières soient ventralisées, *i.e.,* aux stades tardifs du développement embryonnaire.

Au stade AAP

Les têtards d'Alyte accoucheur ont la peau du ventre transparente pendant la période de croissance somatique et le début de la métamorphose. Cela permet de visualiser la fréquence cardiaque grâce à des changements de coloration (rouge *vs* clair) au niveau du cœur. Pour la mesurer, nous avons donc imaginé un dispositif permettant de filmer les têtards par dessous, sans avoir à les retourner (Figure 38).

Figure 38. Photo du dispositif permettant de filmer les têtards par dessous afin de mesurer leur fréquence cardiaque.
© L. Lange

Au stade AMA

Les membres antérieurs des Alytes accoucheurs se développent entièrement sous la peau avant de sortir. A ce moment-là, la peau se déchire et un orifice mettant plusieurs jours à se refermer est formé. Les branchies ont tendance à ressortir légèrement par ces orifices (Figure 39). Il est alors possible de mesurer la fréquence cardiaque des métamorphes au stade AMA en observant la circulation sanguine à la loupe binoculaire, comme au stade œuf.

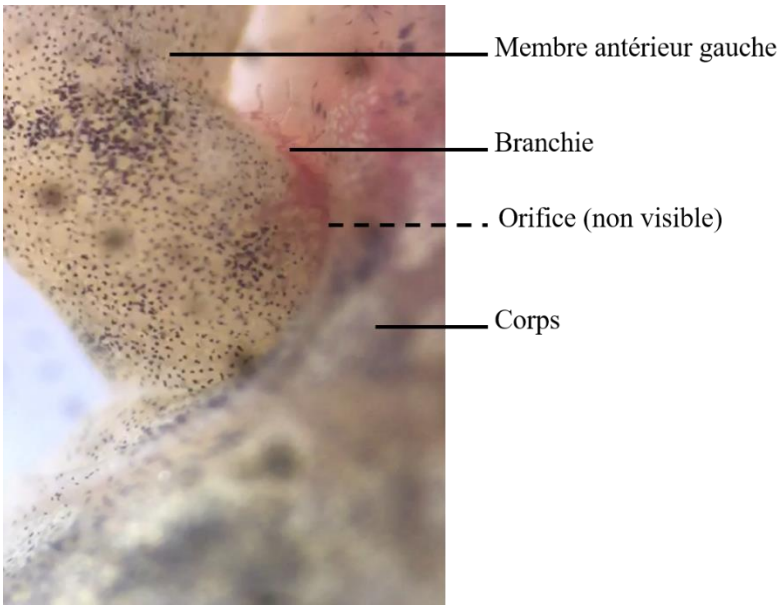


Figure 39. Photo schématique de la sortie d'une branchie au niveau de l'orifice formé par la sortie du membre antérieur gauche d'un têtard au stade AMA.
© L. Lange

Aux stades postérieurs à la sortie de l'eau

Une fois la métamorphose commencée, la pigmentation est plus marquée, ce qui ne permet plus une mesure externe de la fréquence cardiaque. Une solution alternative a donc été trouvée : celle de l'échographie cardiaque (Figure 40). Pour protéger les individus du gel échographique, ils ont été placés dans un sac zip-lock le temps de la mesure (< 2 minutes). Un échographe Micromaxx, SonoSite, Inc., Bothell, WA, USA a été utilisé pour toutes les mesures. Au stade crapelet, ces mesures ont été réalisées aux trois températures, à savoir 16°C, 20°C et 24°C, pour obtenir des courbes de performances.

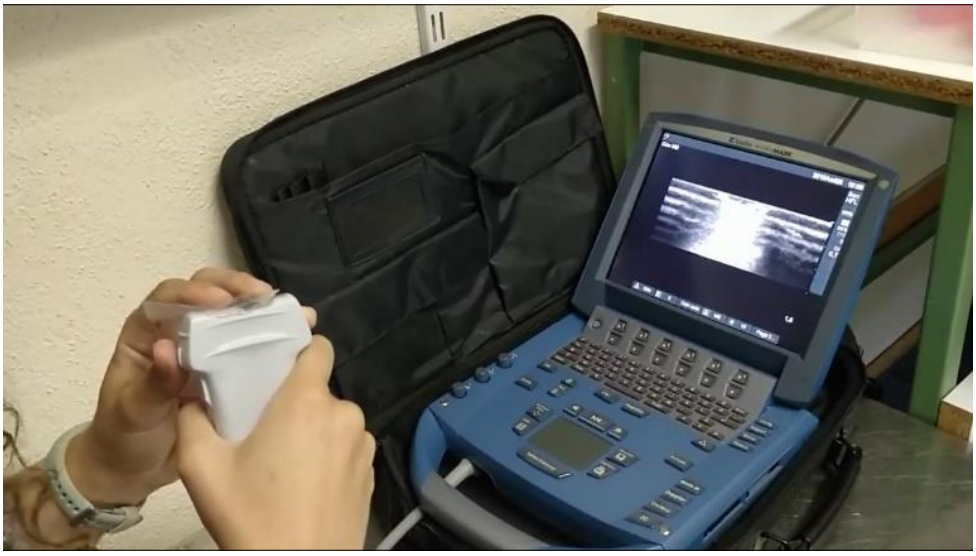


Figure 40. Photo d'une mesure de fréquence cardiaque par échographie cardiaque d'un métamorphe.
© B. Lange

c. Mesures de comportement chez les jeunes

Trois mesures de comportement ont été réalisées sur les jeunes Alytes accoucheurs nés en captivité : la locomotion au stade têtard (stade naissance et stade AAP), la locomotion au stade crapelet (1 mois après la métamorphose) et les préférences thermiques aux stades métamorphe (régression de la queue) et crapelet.

Mesure de la locomotion au stade têtard

Afin de mesurer la locomotion des individus au stade têtard, trois dispositifs d'arènes expérimentales ont été construits avec un éclairage par le dessous pour faciliter le suivi de trajectoire (logiciel ToxTrac). Chaque dispositif comprenait trois arènes individuelles (Figure 41) permettant de mesurer 9 individus en même temps en conditions thermiques contrôlées (20°C). Les dispositifs étaient constitués d'un socle en carton contenant deux cordons LED. Au-dessus de ce socle avait été fixée une plaque en PVC transparente recouverte de papier calque pour la rendre translucide. Un support en carton permettant de définir l'emplacement des trois arènes était ensuite placé au-dessus de la plaque en PVC. Ce support avait été recouvert de papier kraft noir afin d'augmenter le contraste entre le blanc lumineux (éclairé par dessous) des arènes et le noir mat du contour. Enfin, les arènes comportementales étaient chacune constituées d'une boite de pétri de 8 cm Ø pour les têtards à la naissance et de 14,5 cm Ø pour les têtards au stade AAP. Les têtards étaient ensuite placés individuellement dans les arènes. Les séquences ont été filmées en vue du dessus à l'aide de caméras GoPro (Hero 2018 CHDHB-501-RW). Afin de calibrer les vidéos par le logiciel ToxTrac, des damiers étaient placés au niveau de chacune des arènes du dispositif en début de session.

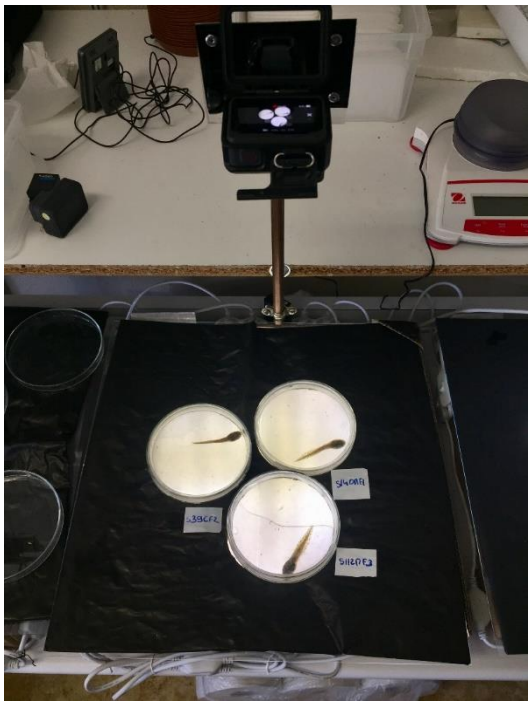


Figure 41. Photo du dispositif de mesure de la locomotion au stade têtard.
© L. Lange

Mesure des performances de saut au stade crapelet

Pour mesurer les performances de saut au stade crapelet et obtenir des courbes de performances en les testant à trois températures différentes, 16°C, 18°C et 24°C, un dispositif expérimental permettant une mesure directe de la distance de saut a été mis en place. C'est ainsi que nous avons imaginé un dispositif sous la forme d'une cible, permettant de faire sauter le crapelet depuis son centre, et de visualiser directement la distance du saut, peu importe la direction suivie par le crapelet (Figure 42). Les individus ont été équilibrés aux trois températures différentes en les plaçant dans les enceintes climatiques.

Figure 42. Photo du dispositif de mesure de la distance de saut au stade crapelet.
© L. Lange

Mesure des préférences thermiques au stade métamorphe et crapelet

En raison du nombre d'individus (270), l'utilisation du gradient thermique pour mesurer les préférences thermiques n'aurait pas permis un rendement suffisant pour pouvoir mesurer tous les individus aux stades adéquats. Une solution alternative a donc été trouvée : celle d'utiliser des meubles permettant de chauffer un côté de leur terrarium de captivité grâce à un cordon chauffant réglé sur 40°C (Figure 26). Avec une température de salle à 17°C, cela permettait d'obtenir un gradient au niveau du substrat entre 18,5 °C et 25,0 °C.

G. Résumé des variables collectées

L'élaboration des protocoles a été réalisée conjointement avec mes encadrants de thèse. Les données ont pu être obtenues grâce à un travail d'équipe et notamment grâce à l'aide apportée par plusieurs expérimentateurs additionnels. Enfin, les soins aux animaux (essentiels à ce travail) ont pu être assurés avec la précieuse contribution d'Elsa Daniaud (technicienne en expérimentation faune sauvage) et de Rodrigo Gavira (post-doctorant). Une synthèse est fournie dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des données collectées et de leur utilisation.

Terrain/Laboratoire	Type	Année	Expérimentateur principal	Expérimentateurs additionnels	Article associé
Terrain	Suivis de terrain	2017	G. Mercier	-	Chapitre I - Article 1 (accepté)
	Suivis de terrain et données thermiques	2018	L. Lange	L. Bégué, L. Poncet	Chapitre I - Article 3 (en préparation)
Laboratoire	Préférences thermiques des adultes	2018	L. Lange	L. Bégué, L. Poncet	
	Manipulation des conditions prénatales	2018	L. Lange	J. Scheuer	
	Performances de locomotion des adultes	2018	L. Lange	L. Bégué, L. Poncet	Chapitre II - Article 2 (soumis)
	Manipulation des conditions pré et postnatales croisées	2019-2020	L. Lange	L. Bégué, E. Daniaud, J. Demellier, M. Lecaer	Chapitre III
	Mesure de locomotion des têtards	2019-2020	L. Lange	S. Tersigni	Chapitre III

CHAPITRE I : Caractérisation des contraintes thermiques

© M. Passerault

« Lorsqu'on tire sur un seul fil de la nature, on découvre qu'il est attaché au reste du monde. » - John Muir

A. Préambule

L'implication de l'environnement thermique dans la régulation des processus physiologiques, des performances, et donc l'aptitude, est majeure (Angilletta, 2009). Ceci est particulièrement vrai pour les ectothermes dont la température corporelle dépend directement des conditions environnementales (Rubalcaba et al., 2019). Afin d'atteindre et de maintenir une température corporelle optimale, les ectothermes peuvent thermoréguler comportementalement (entre autres) ; (Blouin-Demers et al., 2003; Rozen-Rechels et al., 2019).

Les amphibiens sont particulièrement sensibles à la perte en eau par évaporation de par la perméabilité importante de leur peau (Lillywhite, 2006). Un conflit entre besoins hydriques et besoins thermiques peut ainsi apparaître, ce qui peut influencer l'utilisation de l'habitat, notamment en fonction des conditions microclimatiques spécifiques (Heard et al., 2008; Mitchell & Bergmann, 2016). Dans ce contexte, les amphibiens peuvent utiliser des refuges pour éviter les températures extrêmes et la déshydratation (Seebacher & Alford, 2002).

Dans une première partie, nous avons donc étudié l'utilisation de microhabitats en manipulant expérimentalement le type de refuges diurnes. Nous avons disposé des refuges artificiels présentant deux modalités de substrat (substrat naturel *vs.* substrat de type sciure de bois) croisées avec deux modalités de refuge (bois *vs.* plaque de caoutchouc noir). Nous avons relevé leur utilisation par les Alytes accoucheurs régulièrement pendant plusieurs semaines.

Les amphibiens sont très sensibles à l'environnement thermique au cours de leur développement, notamment pendant les stades précoces (Angilletta et al., 2010; Farmer, 2000; Gillooly et al., 2002). Dans ce contexte, la thermorégulation parentale est un mécanisme essentiel permettant aux adultes de contrôler les effets thermiques sur les embryons (Delia et al., 2013; Farmer, 2000; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Shine, 1995).

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'effet des conditions environnementales et du statut de reproduction sur la thermorégulation. Des relevés de température en milieu naturel et des mesures de préférences thermiques en laboratoire ont été utilisés. Pour clarifier la dépendance thermique du développement des embryons, des mâles avec leur ponte ont été soumis à cinq traitements thermiques en enceinte climatique.

B. Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties

1. Introduction

Amphibians are currently facing a worldwide decline involving a diversity of proximate causes such as habitat loss and fragmentation (Beebee & Griffiths, 2005). Most amphibians have a dual life cycle combining terrestrial and aquatic phases (Cody & Smallwood, 1996). Aquatic sites are required for breeding, egg laying and larval development (Cody & Smallwood, 1996). During the aquatic stages, breeding adults usually gather in large numbers in ponds and are often easily detected (breeding call, conspicuous activity) (Dodd, 2010). Conversely, terrestrial habitat use is much less investigated because individuals are much more secretive (Dodd, 2010). Consequently, a majority of studies have focused on aquatic phases of the life cycle resulting in a large amount of knowledge on reproduction and aquatic stages (breeding, embryonic and tadpole development). In order to understand the threats that currently affect amphibian populations, it is crucial to collect data during terrestrial life stages and understand the microhabitat use during the terrestrial phase.

Because amphibians have a permeable skin, they are particularly sensitive to evaporative water loss (Lillywhite, 2006) and they require hygrometric conditions for activity (Osbourn et al., 2014). Yet, they also need to actively thermoregulate to achieve optimal temperatures and performances (Köhler et al., 2011). A possible conflict can therefore exist between water and thermal needs; which in turn will influence habitat use and specific microclimatic conditions to thermo- and hydroregulate (Heard et al., 2008; Mitchell & Bergmann, 2016). Most amphibians are active at night and frequently shelter in underground refuges during the day (Sutherland, 2006). Such refuges can be critical to avoid extreme temperatures and dehydration notably under hot or arid climate (Seebacher & Alford, 2002). Under temperate (constraining) climates, thermal conditions can be limiting and diurnal thermoregulation can be important to achieve preferred temperature. In this context, diurnal refuge use may primarily be driven by thermoregulatory purposes.

The use of artificial refuges (AR) can provide an effective technique for detecting secretive taxa (Hoare et al., 2009) and have been efficiently used to detect and monitor reptile populations (Graitson & Naulleau, 2005; Hoare et al., 2009; Lettink & Cree, 2007; Michael et al., 2004; Milne et al., 2003). Although, some amphibian species use AR (Graitson & Naulleau, 2005;

Michael et al., 2004), only few studies have specifically used this method (*e.g.*, Hampton, 2007; Latham & Knowles, 2008; Wakelin et al., 2003).

The aim of our study was to experimentally examine the use of diurnal refuges by the midwife toad, *Alytes obstetricans*. We compared two refuge types (wood *versus* rubber boards) and two substrates (sawdust *versus* natural substrate). Because of vulnerability to water loss, we posit that the hydric properties of the substrate beneath refuges will likely influence refuge selection. We tested the following predictions:
Because of their hydric requirements, Midwife toads should prefer sawdust substrate that should maintain the highest humidity level.
Because dark rubber boards should provide warmer conditions, they should be more attractive when environmental temperatures are low.

2. Materials and methods

The common midwife toad, *Alytes obstetricans*, is a terrestrial species from the Alytidae family, ranging across Western Europe. Midwife toads often shelter under refuges such as rocks and slabs and are frequently encountered in the vicinity of anthropogenic habitats, as stone walls, wood pile or screes. Reproduction is partially independent of the aquatic environment. Oviposition occurs on land and males actively contribute to oviposition in a lumbar amplexus. This species shows male-only parental care with males carrying eggs during early development (2 to 3 weeks). Aquatic bodies such as ponds are required for tadpole deposition.

We studied surface activity in an anthropic habitat (a sawmill), located in Southern France within the Chizé forest (46.146315N; −0.395969W). The site (1 hectare) offers numerous ground shelters including woodpiles, logs, accumulated sawdust and is largely occupied by midwife toads. A small pond close to the site is used for tadpole deposition. We examined the influence of refuge type by comparing two types of materials: wood *versus* rubber board (conveyor belt). The two refuges were of similar size: 40 x 80 cm. We also tested the influence of the substrate (sawdust *versus* bare soil) placed beneath artificial refuges using a 2 x 2 factorial design.

We positioned 17 groups of artificial refuges on the study sites. Each group was composed of four artificial refuges with four modalities:

1) Wood board and sawdust substrate.
2) Wood board and natural substrate.
3) Rubber board and sawdust substrate.
4) Rubber board and natural substrate.

Within each group the four artificial refuges were placed side by side on a linear transect favouring the access to the different modalities (total n = 68 refuges). Refuges were placed in May, two weeks before conducting the survey. From June to August 2016, we visited the study site on 11 occasions. Each refuge was gently lifted in order to determine the presence of midwife toads. When detected, we counted the number of individuals under the refuge and assessed age class based on body size (adult > 4 cm, juvenile < 4 cm, only three individuals were not attributed to an age-class). When possible, we also assessed the sex and reproductive status of some individuals (*i.e.*, male transporting eggs). Temperatures data were collected from www.meteociel.fr website, recorded in Niort, the closest station from our study site (~19 km straight line). Temperature was recorded every hour. Mean temperature was calculated by averaging the last record before the survey and the first record after the survey.

We used Generalized Linear Mixed-Effects Models to examine the determinants of presence and abundance under artificial refuges. The probability of presence was modelled using a binomial distribution. The abundance (*i.e.*, the number of toads when present) was modelled using a Poisson distribution. The group number (1 to 17) was treated as a random factor and the four different refuges in each group as a random effect nested in the group. The same procedures were used when considering either all individuals or caring males only. Analyses were carried out using R 3.5.0 software (R Development Team, 2005), lme4 package and MuMIn package. The figures were designed using ggplot2 package.

3. Results

Over the 11 visits, a total of 110 positive refuge controls were obtained (14.7%). Toads were detected in 11 of the 17 groups of artificial refuges. The abundance ranged from 1 to 7 (mean ± SD = 2.2 ± 1.7). The total number of contacts was 238 individuals. The majority of individuals were adults (n = 223) and we observed relatively few juveniles (n = 12). Among adults, 108 individuals (48%) that were found carrying eggs were confidently sexed as males.

The presence of midwife toads was strongly associated to substrate type with more frequent contacts with sawdust substrate (Table 1, Figure 43a) and to AR type with more frequent contacts under rubber boards (Table 1, Figure 43b). We found an interaction between the AR type and the temperature, showing that rubber boards were more attractive at low temperatures (Table 1, Figure 43c). In contrast, the use of wood board refuges was independent of thermal conditions (Table 1, Figure 43c). Restricting our analyses to adult individuals yielded similar results. Finally, when focusing on reproductive males (carrying eggs), we found an influence

of substrate solely (Table 1). When focusing on abundance data, we found no influence of artificial refuge type or substrate (Table 1). However, the abundance of toads observed with no substrate was low compared to sawdust (n = 13 versus 225) and the proportion of caring males tended to be lower (30.8% versus 44.9%).

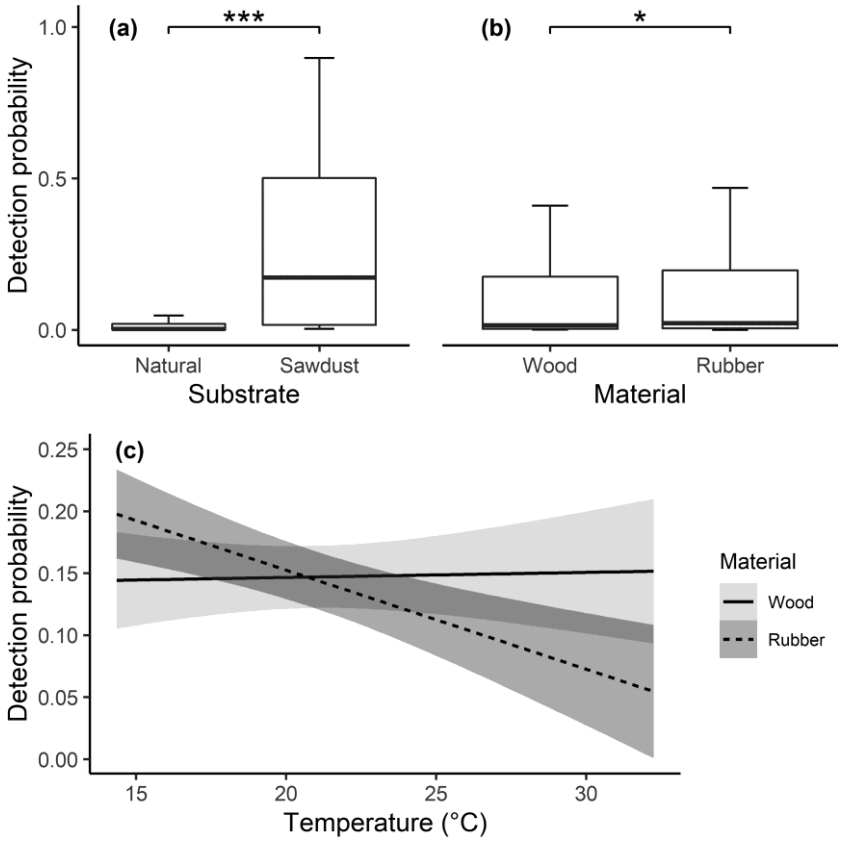


Figure 43. Effect of (a) substrate and (b) refuge type on detection probability. (c) Influence of temperature and artificial refuge type on detection probability.
*Detection probability was determined from extraction of predicted values of toad presence (binomial glmer, see text for details). The boxes represent the interval between the 25% and 75% quartiles and the whiskers represent the range. The middle horizontal line in the box plot represents the median. *** : P < 0.001 ; * : P < 0.05. Detection probability was determined from extraction of predicted values of toad presence (binomial glmer, see text for details). The lines represent the fitted linear regression and the grey arears the 95% confidence intervals.*

Table 1. Statistical models used to test for the influence of refuge type and substrate on toad presence and abundance.
AR: artifical refuge. Est.: estimate. Juv.: juveniles. R^2m: marginal R square. R^2c: conditional R square. SE: standard error. Temp. : temperature. Group/AR stands for random intercept varying among group and AR nested within group.

Response variable	GLMER family	Random-effect	Explanatory variables	Est.	SE	*Z*	r^2m	r^2c	*P*
All toads presence (juv. Included)	Binomial	Group/AR	(Intercept)	-6.553	1.387	-4.725			**<0.001**
			Material	-3.553	1.482	-2.398	1.500e-4	0.620	**<0.05**
			Substrate	-4.388	0.928	-4.729	0.206	0.633	**<0.001**
			Temp.	-0.007	0.038	-0.175	0.006	0.630	0.861
			Material:Substrate	1.246	1.131	1.102	0.222	0.640	0.271
			Material:Temp.	0.124	0.056	2.240	0.013	0.638	**<0.05**
			Model				0.233	0.656	
Caring males presence	Binomial	Group/AR	(Intercept)	-12.272	3.304	-3.714			**<0.001**
			Material	0.366	2.507	0.146	1.285e-10	5.475e-6	0.884
			Substrate	5.808	1.878	3.093	6.374e-7	5.223e-6	**<0.001**
			Temp.	-0.066	0.057	-1.164	8.174e-9	5.582e-6	0.244
			Material:Substrate	-1.575	2.312	-0.681	6.172e-7	5.256e-6	0.496
			Material:Temp.	0.028	0.076	0.374	1.009e-8	5.622e-6	0.708
			Model				6.458e-7	5.413e-6	
All toads abundance (juv. Included)	Poisson	Group/AR	(Intercept)	-0.440	0.682	-0.646			0.518
			Material	0.185	0.806	0.230	9.739e-5	0.251	0.818
			Substrate	0.720	0.655	1.098	0.024	0.260	0.272
			Temp.	0.014	0.016	0.908	0.024	0.262	0.364
			Material:Substrate	-0.493	0.759	-0.650	0.031	0.267	0.516
			Material:Temp.	0.016	0.023	0.694	0.026	0.261	0.488
			Model				0.050	0.274	
Caring males abundance	Poisson	Group/AR	(Intercept)	-0.021	1.068	-0.019			0.985
			Material	-0.582	1.305	-0.446	0.122	0.576	0.656
			Substrate	0.641	1.035	0.619	0.027	0.619	0.536
			Temp.	-0.000	0.021	-0.008	0.006	0.592	0.994
			Material:Substrate	-0.410	1.175	-0.349	0.044	0.628	0.727
			Material:Temp.	0.032	0.035	0.892	0.029	0.596	0.372
			Model				0.073	0.194	

4. Discussion

We found that sawdust substrate had a major influence on refuge selection. This effect likely reflects the hygrometric properties of this substrate. Indeed, sawdust accumulates large amount of water within wood fibers (Gruda, 2008). This hygroscopic property should provide high humidity and reduce the water vapour deficit. Such benefits are particularly important for amphibians that can face high hydric and thermal needs (Köhler et al., 2011). In addition, sawdust allows burrowing or digging behaviour and small-scale adjustments within this microhabitat. Accordingly, individuals were often observed within circular spaces made by arranging the topsoil. That should provide specific microclimatic conditions. Such advantages are presumably missing with the natural substrate (*i.e.*, bare soil) with more important air exchanges and dehydration risks. High humidity can notably benefit to caring-males to enhance eggs development (Janzen et al., 1995) and avoid desiccation (Taigen et al., 1984). The relatively lower proportion of caring males using bare soil suggests differential substrate selection. In support of these results, previous studies have also demonstrated the role of substrate humidity on refuge use in amphibians (Grant et al., 1992).

We found an interaction between the AR type and the ambient temperature on toads' observations. Specifically, rubber boards were more attractive when environmental temperatures were lower, while toads' presence under wood boards was similar across temperature. Dark rubber covers warm up more and more rapidly than wood boards when exposed to the sun (OL, pers. obs.) and likely provide thermal benefit when environmental temperatures were low. This further indicates that midwife toads thermoregulate during the day in the refuge they choose at night. On the other hand, when environmental temperature are high, rubber covers can potentially achieve high temperature that may determine toads' presence, while wood refuges appear as attractive, no matter the temperature (Grant et al., 1992). Wood refuges are therefore expected to provide more stable microenvironments when thermal conditions are critical. While reproduction often influence thermoregulation effort and accuracy (Klug & Bonsall, 2014), we did not find an influence of AR type on refuge selection by caring-males. Future studies including more controls across the entire reproductive season will help to test for this hypothesis.

Several studies have demonstrated that AR are effective for amphibians and reptiles detection (Michael et al., 2018; Ryan et al., 2002; Scheffers et al., 2009). Our study provides clear evidence that substrate type and AR type in interaction with temperature can have a major

influence on Midwife toads' diurnal refuge selection. Future studies are required to test the influence of refuge type over an entire season and test for a possible differential attractiveness according to ambient conditions for caring-males.

C. Benefits of paternal thermoregulation: male midwife toads select warmer temperatures to shorten embryonic development

1. Introduction

Variations in thermal conditions can have major consequences on organismal physiology, performances, and ultimately, fitness (Angilletta, 2009). These influences are particularly relevant for ectotherms because their body temperature directly depends on the thermal environment (Rubalcaba et al., 2019). Behavioural thermoregulation provides a robust way of reaching and maintaining optimal body temperatures in thermal environments that can vary through space and time (Blouin-Demers et al., 2003; Rozen-Rechels et al., 2019). Early life stages are particularly sensitive to temperature (Angilletta et al., 2010; Farmer, 2000; Gillooly et al., 2002) and thermal effects can have long lasting consequences on individual trajectories (Singh et al., 2020). Accordingly, parental thermoregulation has been highlighted as a key mechanism to control temperature effects on developing embryo (Delia et al., 2013; Farmer, 2000; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Shine, 1995). Importantly, parental thermal influences can involve phenological effects by optimizing developmental durations or timing, but also phenotypical effects, such as modifications of offspring traits (Anduaga & Huerta, 2001; Lorioux et al., 2012; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Reed et al., 2009; Telemeco et al., 2010).

The thermal sensitivity of embryonic development could be a driving force in the evolution of parental care and reproductive modes (Angilletta & Sears, 2003; Farmer, 2000). The relationship between embryonic development and temperature has been a focus of research for decades (*e.g.*, reviewed in Singh et al., 2020; D. R. Webb, 1987) and several competing hypotheses have emerged (Zamorano et al., 2017). For instance, the "warmer is better" hypothesis posits that higher temperature are beneficial by enhancing physiological rates, and thus reducing development time (Treasure & Chown, 2019). Alternatively, the "colder is better" hypothesis suggests that individuals developing at a lower temperature will reach larger body size (*i.e.*, temperature size rule, see (Zuo et al., 2012). Finally, the "optimal developmental temperature" hypothesis states that accessing an optimal, intermediate temperature during embryonic life is critical to optimize adults performances in diverse thermal environments (Huey et al., 1999). Importantly, all of these conflicting hypotheses have received substantial

support from empirical studies suggesting that various strategies of thermal parental care may improve offspring traits (reviewed in Kingsolver & Huey, 2008).

Yet, most studies on thermal effects have focused on maternal influences (da Silva et al., 2012; Du et al., 2005; Foucart et al., 2018; Li et al., 2018; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; So & Schwanz, 2018). It is partly due to the predominant role of females for parental care in most systems (Royle et al., 2012). In ectotherms, the maternal shift in thermoregulation during reproduction has sparked debates as to whether this corresponds to a maternal effort to optimize the fitness of her offspring (*i.e.* the maternal manipulation hypothesis), or her own (DeNardo et al., 2012; Schwarzkopf & Andrews, 2012; Shine, 1995, 2006, 2012). However, male parental care (MPC) has been described in multiple taxa and male can regulate multiple facets of the abiotic environment. For instance, among nest-guarding fishes, males will attend the nest and actively ventilate the eggs to avoid hypoxia (Lissåker & Kvarnemo, 2006). Pouch-breeding species can also manipulate salinity to optimize development for the embryos (Monteiro et al., 2005). Similarly, in many amphibians, MPC will be involved in the regulation of the hydric environment to avoid egg desiccation (Y.-H. Chen et al., 2007; Chuang et al., 2017; Consolmagno et al., 2016; Gururaja et al., 2014; Lehtinen et al., 2014; Poo & Bickford, 2013; Townsend et al., 1984; Vargas-Salinas et al., 2014). Paternal thermal cares to the eggs are well known among birds during incubation and this trait likely emerged through sexual selection (Hanley, 2013). Yet, male thermal care and thermal effects remain virtually unstudied among terrestrial ectotherms (but see Cook et al., 2001).

In many amphibians, males are actively involved in the regulation of incubation conditions (Eens & Pinxten, 2000; Royle et al., 2012). MPC is often exclusive, which permits to study paternal effect on development in a simplified context (low or absent prezygotic costs, see (Hayward & Gillooly, 2011)). Thermal constraints on embryonic development are particularly relevant under thermally constraining environments, such as the temperate climate (Le Henanff et al., 2013). In this context, the Alytidae family is composed of five species living in the Western Palearctic region and characterized by terrestrial incubation and exclusive MPC. In these species, males carry the clutch attached to their hind legs during the whole embryonic development and recent evidences suggest that males carrying eggs select their microhabitat to buffer thermal conditions (Lange et al., 2020).

Herein we studied the midwife toad, *Alytes obstetricans*, which is the northernmost species of the genus and which has an extended reproductive period lasting from early spring to late summer (Márquez, 1992). The hatching date can induce drastic changes in ontogenetic

trajectories and early hatching has been shown to positively influence the fitness (Le Henanff et al., 2013; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Rodríguez-Díaz et al., 2010). Conversely, late hatching can induce overwintering in a larval stage in this species and thus significantly lengthens larval development duration (E. Wells et al., 2015). Due to the high levels of predation risks and competition in breeding ponds (Pearman, 1995), this is likely to influence larval survival. Therefore, male midwife toads are expected to optimize the thermal conditions in order to hasten embryonic development and generate early hatching. We tested the following predictions:

(1) Field body temperature (T_{body}) should vary over the reproductive season and be lower when conditions are constraining in early spring.

(2) Carrying males should have higher preferred temperature (T_{pref}) than non-carrying ones.

(3) A small increase in egg temperature should be sufficient to shorten incubation duration.

2. Materials and methods

a. Study species

The common midwife toad (*Alytes obstetricans*) is a small (4-5 cm) species ranging across Western Europe (Bosch & Márquez, 1996). These toads often ground refuges such as under rocks and slabs and they can frequently be found in anthropic habitats (Lange et al., 2020; Pellet & Schmidt, 2005). Because sexual dimorphism is poorly marked in this species (Bosch & Márquez, 1996), we relied on an indirect method for sexing adult individuals. If toads were carrying eggs on their back, they were confidently sexed as males, because during mating, males collect the fertilized eggs and attach the string of eggs around their hind legs. Otherwise, individuals were sexed as non-determined until further recaptures. Toads measuring less than 2cm were classified as juveniles. Eggs are carried for up to 32 days in the wild (E. Wells et al., 2015). Once embryos have completed their development, the male reaches small water bodies (ponds) to deposit the hatching tadpoles (Márquez, 1992). In *Alytes obstetricans*, clutch sizes range from 32 to 171 eggs (E. Wells et al., 2015).

b. Study site and captures

The study site is situated in Western France (Chizé forest, 46.145993 N, -0.394980 W) in a sawmill where a large population is established and currently monitored. To detect toads, we used different artificial refuges: rubber cover, tarpaulin cover and wood cover. All artificial refuges had a sawdust substrate underneath the cover since it increases detection (Lange et al., 2020). We placed eight line transects of the three types of artificial refuges, for a total of 24

artificial refuges. Each artificial refuge was then gently lifted to capture the individuals. All toads captured and brought to the lab were individually marked with a RFID nanotag (Trovan), placed in the dorsal lymphatic sac, just before the release.

c. Variables measured

Temperature measurements in the field

Temperature measurements (°C) were collected through 35 field sessions between April 25, 2018 and August 22, 2018. For each toad, the dorsal temperature was measured before any handling using a Raytek Raynger MX2 infrared thermometer. In small ectothermic organisms, such as the midwife toads, the dorsal temperature is highly similar to the internal body temperature (T_{body}). A total of 586 temperature measurements were obtained, with 342 on carrying males, 21 on non-carrying males, 123 undetermined adults (unsexed). Substrate temperature was measured on three different points with the IR thermometer. Mean of those three measurements was used for analyses.

Thermal preferences in laboratory conditions

We used a thermal gradient ranging from 15°C to 45°C to assess individual thermal preferences (T_{pref}). The experimental unit consisted on a PVC box (102 cm l x 72 cm L x 25.5 cm h). The warm side was heated by a heating cord set on 45°C, the middle by a heating cord set on 30°C and the other side was cooled by copper pipes, traversed by a stream of water and antifreeze solution, cooled by a cold unit, set on 5°C. Six compartments (68 cm l x 16 cm L) in aluminium (chosen for its thermic conductance) were placed above the temperature gradient. Compartments were filled with a mixture of 100 g of vermiculite and 250 g of water and one long shelter (half PVC tubes of 66 cm l x 11 cm L x 4.5 cm h) covered the entire length of the compartment.

A total of 92 adult toads were collected during the reproductive season between April and July 2018. Among these individuals 62 were identified as males because they were carrying a clutch at the time of capture or later during the year. A total of 7 seven reproductive females were identified with growing ova visible through the belly. For 23 individuals it was not possible to assign a sex because they were not found or recaptured with eggs. Finally, 17 males were captured twice with different statuses: 8 were firstly captured as non-carrying and then as carrying eggs and 9 were initially captured as carrying and then as non-carrying eggs. After capture, individuals were brought to the lab and placed in the thermal gradient. Individual temperature was taken every hour from 9:00am to 6:00pm using an infrared thermometer

(Raytek Raynger MX2 Infrared Thermometer). The skin surface temperature was collected in the dorsal area without handling taken to minimize perturbations. For 8 males captured with eggs a clutch desertion occurred and they were discarded from the analysis. The 7 reproductive females were also excluded. We analysed variations in T_{pref} comparing the three statuses (carrying males, non-carrying males and unsexed adults). We also analysed T_{pref} on the subset of 17 males sequentially found either carrying or non-carrying eggs. Individuals were measured for Snout-Vent Length (SVL, mm) and weighed (mg) before being released at the exact capture site. A minimum period of 2 weeks was respected before any recapture and repetition of the experiment.

Thermal dependence of embryonic development

In spring 2018 and 2019, we captured 45 males carrying eggs, which had been recently laid (*e.g.*, eggs characterised by a bright yellow colour). Toads were measured in SVL, weighted, and then distributed in five thermal treatments (16, 18, 20, 22 & 24°C) using climatic chamber (Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany). Three thermal treatments were used per year, 18, 20 & 22°C in 2018 and 16, 20 & 24°C in 2019. Each year, males were randomly distributed in the three thermal treatments to avoid differences in capture date between groups. Toads were individually housed in plastic boxes (32 cm l x 18.5 cm w x 10.5 cm h) with the same quantity of moistened vermiculite. Two shelters (half PVC tubes) and a water bowl (⌀ 14 cm) were placed inside each maintenance box. Eggs are transparent, which allowed to assess the stages of embryonic development (Cambar & Martin, 1959). We therefore recorded the date of formation of the optic vesicle to account for possible differences due to development duration in the field before the capture. Tadpoles of six (out of 47) males hatched outside of the water, while still being transported by their father, and data from these individuals were discarded from our analyses. Cumulating both years, development duration were obtained for 9, 6, 12, 6 & 6 males respectively for 16, 18, 20, 22 & 24°C thermal treatments, Date of birth (hatching) was recorded and the development duration was estimated from treatment duration (date of capture – date of birth).

d. Statistics

All statistical analyses were carried on R (version 3.5.0 ; R Development Team, 2005) and R studio (version 1.2.5001) ; (using packages lme4, lmerTest, car & multcomp). The relation between mean daily air temperature and the number carrying males and adults observations was tested using a GLM model with a Poisson distribution. Mean daily air temperature was

calculated from hourly air temperatures data inventoried on the website www.meteociel.fr, recorded in Niort, the closest station from our study site (~19 km straight line). The relation between substrate temperature and males T_{body} was tested with a regression model with segmented relationship (broken-stick model) from the R package "segmented". The significance of this model was tested using a Davies test on the linear model of the relation between males T_{body} and substrate temperature (Davies test, $p < 0.0001$). The analysis of deviation from the regression line was tested by running a Wilcox test on the residuals extracted from the broken-stick model.

We analysed T_{pref} in the gradient testing the influence of the reproductive status, the SVL, and the time of day using a mixed model (lme) with individual identity sets as a random factor (type II Anova test, wald F test). We first conducted this analysis on the entire data set and then to the subset of 17 males that were measured under the two statuses.

We examined development durations between thermal treatments with a linear model and using type I Anova tests. Values are presented as means ± standard error (SE).

3. Results

a. Phenology of carrying male observations

The number of carrying males found per session was negatively correlated to the mean daily air temperature (Anova test, $\chi^2 = 125.69$, df = 1, $p < 0.001$, Figure 44). The maximum number of observations was reached during the first half of May occurs at a period when T_{pref} and mean T_{body} in the field were comparatively similar (Figure 44; Figure 45). The number of adults (irrespective their sex or reproductive status) was also correlated to the mean daily air temperature (Anova test, $\chi^2 = 28.62$, Df = 1, $p < 0.001$), but did not decrease during the second part of the season (July-August) as the number of carrying males did (Figure 44).

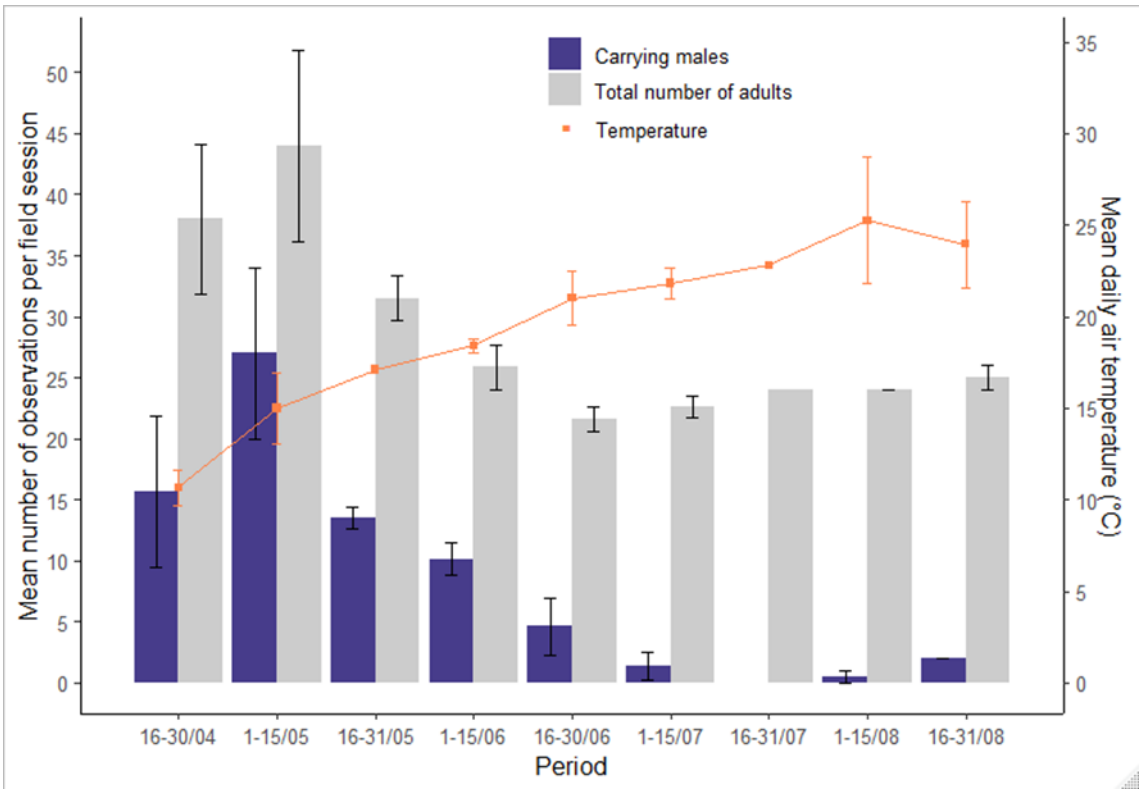


Figure 44. Variations in the mean number of observations of carrying males and total number of adults per two weeks periods over the fiel season.
Mean daily air temperature during the day (00:00-23:00) of the field sessions per period is presented. The whiskers represent the standard errors.

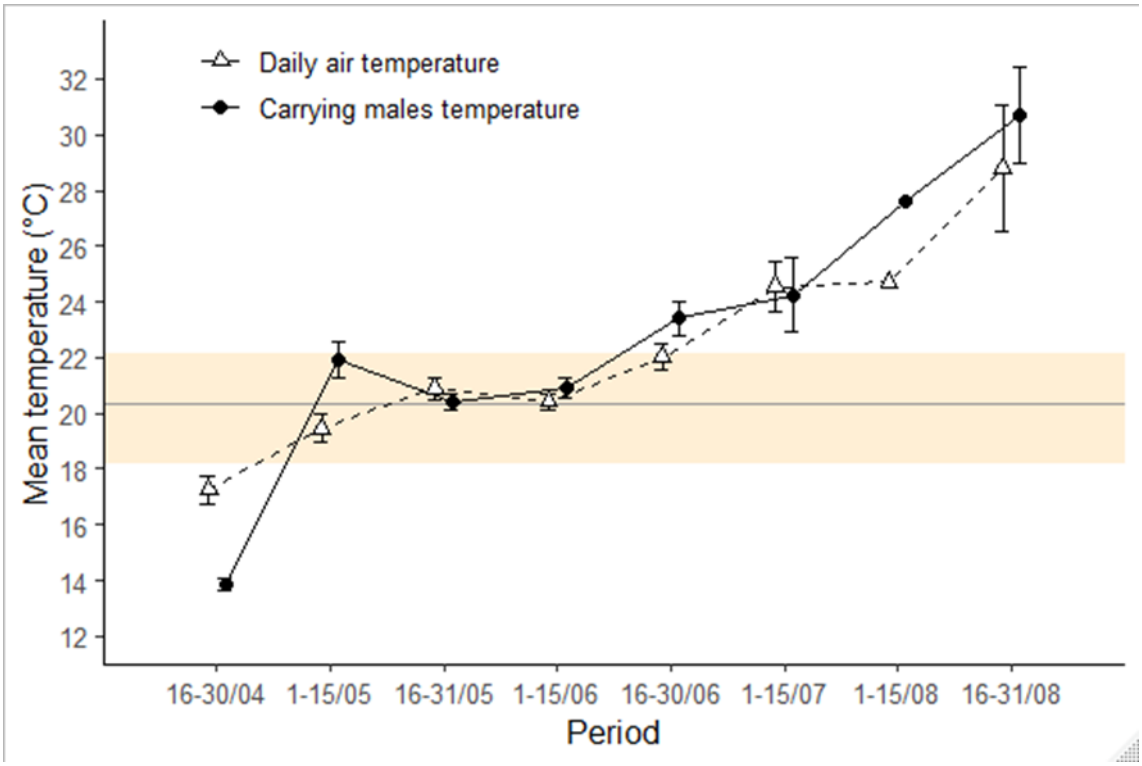


Figure 45. Variations in mean T_{body} (°C) of carrying males and mean air temperatures during the field season. The whiskers represent the standard errors. The horizontal band (light orange) represents the range of preferred body temperatures in a laboratory thermal gradient (lower and upper quartile) and grey line represents the median of preferred body temperatures in a laboratory thermal gradient.

b. Variations in body temperatures

Determinant of field body temperatures

In the field, mean T_{body} of carrying males was highly correlated to the substrate temperature (Figure 46). The broken stick model identified a threshold temperature of 21.9°C. Below this threshold, males' T_{body} were positively correlated with substrate temperature with a slope of 0.8 (Figure 46; Anova test, $F_{(1,331)} = 203.65$, $p < 0.001$). Above this threshold, T_{body} were more weakly correlated to substrate temperature, with a slope of 0.2 (Figure 46; Anova test, $F_{(1,331)} = 114.67$, $p < 0.001$). Interestingly, the deviation from the regression line (assessed as the residuals from the regression) was significantly higher above the threshold of 21.9°C than below (Figure 46; Wilcoxon rank sum test, $W = 8519$, $p < 0.001$). It is noteworthy that the threshold temperature is equal to the temperature of the 75% quartile of the preferred temperatures of the carrying males and the non-carrying males measured in controlled conditions (Figure 47, 21.9°C Vs 22.1°C).

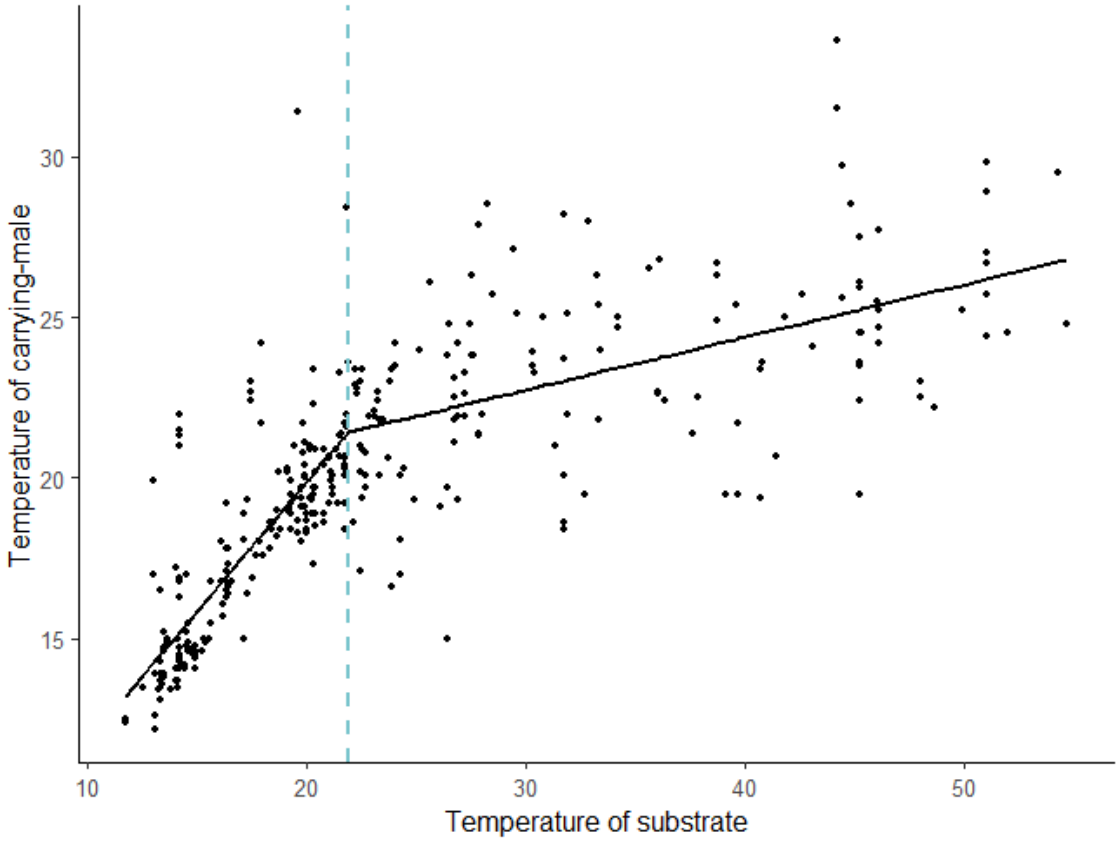


Figure 46. Relation between T_{body} (°C) of carrying males and $T_{substrate}$ in the field. The black lines represent the regressions of the segmented relationship. The vertical dashed line (blue) represents the estimated break-point of the segmented relationship.

Thermal preference of carrying and non-carrying males

When considering the entire data set (76 individuals) we found that T_{pref} was influenced by status ($F_{(2,843)} = 11.08$, $p = 0.006$, Figure 47). The mean T_{pref} of carrying males (20.8 ± 0.31 °C) was higher when compared to non-carrying ones (19.4 ± 0.51 °C, Tukey post hoc test $p = 0.001$) and unsexed adults (17.6 ± 0.67°C; Tukey post-hoc test, $p < 0.001$)). The time of day had no influence on T_{pref} ($F_{(9,843)} = 0.77$, $p = 0.64$) nor the SVL ($F_{(1,74)} = 0.06$, $p = 0.94$). Similar results were found when restricting the analysis to the subset of 17 males measured two times, carrying eggs or not. We found a significant effect of status ($F_{(1,313)} = 7.18$, $p = 0.007$) with males showed higher T_{pref} when they were carrying eggs (20.0 ± 0.3 °C) than when they were not (19.3 ± 0.3°C). The size of the males did not influence T_{pref} ($F_{(1,15)} = 0.40$, $p = 0.53$), nor the time of day ($F_{(9,313)} = 0.81$, $p = 0.6$).

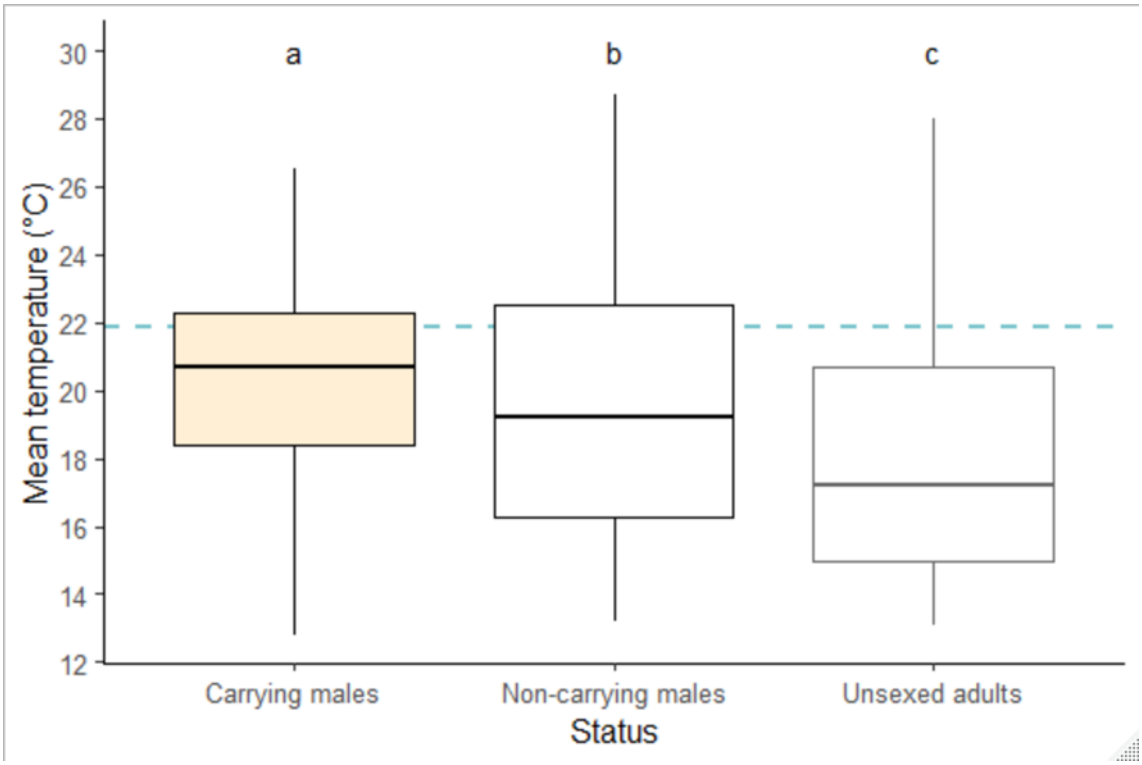


Figure 47. Thermal preferences (T_{pref} °C) measured in carrying males, non-carrying males and unsexed adults. The boxes represent the lower and upper quartiles and the whiskers represent the range. The middle horizontal line in the box plot represents the median. Different letters mean a significant difference between groups with a p-value < 0.05.

c. Influence of temperature on development duration

The duration of the embryonic development was significantly different between thermal treatments (Figure 48; Anova test, $F_{(4,34)} = 38.66$, $p < 0.001$). The duration was longer (40.67 ± 1.9 days) for eggs from the 16°C treatment than for those from the 18°C treatment (30.83 ± 1.5 days; Tukey test, $p < 0.001$), than for those from the 20°C treatment (24.92 ± 1.1 days; Tukey

test, $p < 0.001$) and, than for those from the 22°C treatment (18.3 ± 1.0 days; Tukey test, $p < 0.001$). Embryonic development duration of eggs from the 24°C (20.83 ± 1.1 days) was similar of those from both 20°C and 24°C treatments (Tukey tests, $p > 0.27$).

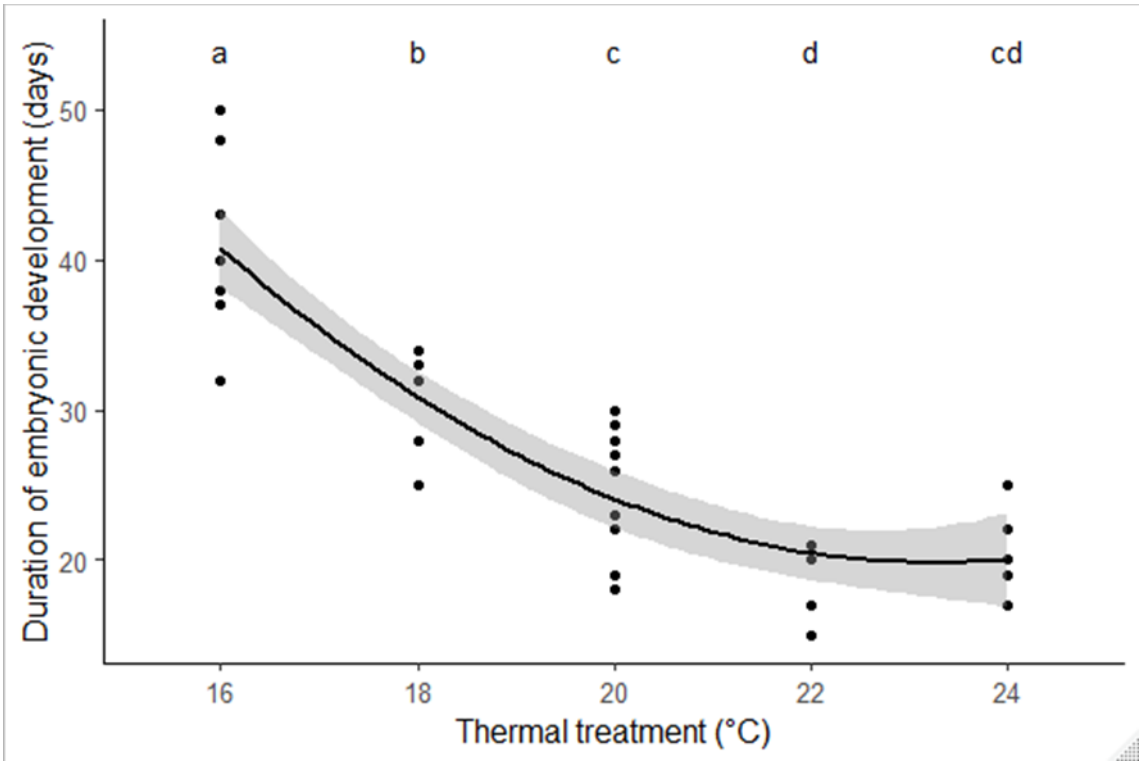


Figure 48. Embryonic development duration in days in function of thermal treatment.
The black line represents the fit of a degree 2 polynomial regression, and the grey surface the standard error.
Different letters mean a significant difference between groups with a p-value < 0.05.

4. Discussion

Despite its evolutionary and ecological relevance, paternal thermoregulation in species with exclusive male parental care (MPC) has received only limited scientific interest (but see Cook et al., 2001). In this study, we hypothesized that midwife toad males, and the embryo they carry, are exposed to thermal constraints and that males actively thermoregulate to accelerate development. We examined shifts in thermal constraints in the field, thermal preferences during reproduction, and thermal phenological effects on development. In support with our predictions, we found that the use of shelter by carrying males was more marked early in the season. We also detected a shift in thermal preferences with reproduction, with egg carrying males selecting higher temperature. Finally, we detected a strong thermal dependence of embryonic development which suggests significant phenological benefit of paternal thermoregulation. Our findings are discussed in details bellow.

Using a thermal gradient, we found that males carrying eggs displayed higher T_{pref}. This result was found considering all individuals or restricting the analysis to the 17 males with sequential measures with the two statuses. Shift in thermal preferences during reproduction are widespread in ectotherms, where it has been largely described in females, of either oviparous or viviparous species. Females select either higher or lower temperatures but more importantly provide a more stable thermal environment during reproduction (DeNardo et al., 2012; Lourdais et al., 2008). Parental thermal influences on development include both phenological and phenotypical effects (Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013). Birth phenology can be a key driver in reproductive success (Dickerson et al., 2005) and under temperate climates, early hatching is often associated with a better fitness for the juveniles (Le Henanff et al., 2013; Warner & Shine, 2007). Parental manipulation of embryonic temperature can be adaptive (Abbey-Lee & Dingemanse, 2019) by shortening development time and possibly provide significant advantage at birth (Anduaga & Huerta, 2001; Lorioux et al., 2012; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Reed et al., 2009; Telemeco et al., 2010). Thermal influence has attracted less attention in amphibians and even less in species with MPC and our study clearly points out that egg carrying is associated with a thermal shift in males midwife toads.

The maximum number of carrying males was found under the diurnal refuges in early spring, when air temperatures were lower. Midwife toads select their diurnal refuges partly on thermal and hydric properties (Lange et al., 2020). These refuges provide significant thermal benefits for carrying males when thermal conditions are constraining. We showed that T_{body} of carrying males was closely dependent of environmental conditions and notably the temperature of the substrate. Importantly, this relation was not linear. Under a temperature threshold (*ca.* 22°C), carrying males appear to thermoconform with the substrate, while above the threshold temperature, active thermoregulation occurred. According to the thermoregulation model of Huey & Slatkin, 1976, an organism should thermoconform as long as the net benefit of thermoconformation outweighs the net benefit of thermoregulation (Basson et al., 2017). Carrying males could therefore actively avoid effects of higher temperature under the refuges when their T_{body} exceed 22°C. This result dovetails relatively well with additional evidences showing that carrying males likely shift their position under the refuge and exploit the vertical gradient of the substrate to thermoregulate, as demonstrated in invertebrates (Penick & Tschinkel, 2008). The reproductive phenology of the species is variable in space and time (Márquez, 1992) but often spans across spring and summer. Relatively lower thermal

requirements during hot conditions may explain the desertion of diurnal refuges during summer to avoid heat and water stress for both carrying males and their embryos.

Using an experimental manipulation, we showed that a small change in temperature had a strong effect on the duration of embryonic development. That is, the development time was 26.4% shorter at 22°C compared to 20°C, 19.2% shorter at 20°C compared to 18°C and 24.2% shorter at 18°C compared to 16°C. However, the development time at 24°C was not different of the ones at both 22°C and 20°C. Similar results had been obtained in other ectotherms (Foucart et al., 2018; G. D. Smith et al., 2015) with a small change in temperature considerably shortening development and influencing hatching phenology. This strong thermal dependence may explain the shift of thermoregulation behavior of carrying males and may be an important selective force in the emergence of parental care (Farmer, 2000). Parental thermal manipulations have already been documented in amphibians, with an example of thermal selection of oviposition sites (Dvořák & Gvoždík, 2009) and another of thermal control of bodies of water (Cook et al., 2001). However, data are missing for active thermoregulation of carried developing embryos. To our knowledge, our study would be the first to document this type of behavior. In the midwife toad, early birth may minimize subsequent predation or competitions levels for offspring in breeding ponds (Abbey-Lee & Dingemanse, 2019), (Pearman, 1995).

Thermal effects may also benefit male through sexual selection (Royle et al., 2012). In some birds, males build incubation mounds to thermoregulate the eggs of several females at the same time, thereby increasing their mating opportunities (Birks, 1997). In our context, a shorter duration will increase the opportunities of obtaining additional mating opportunities, since male midwife toads can sequentially carry multiple clutches throughout the breeding season. Finally parental care are associated with significant costs (Alonso-Alvarez & Velando, 2012). Energy demand will increase with temperature (de Cian et al., 2013) and thermoregulation may impose water-based constraints. Loss of moisture from eggs deposited in terrestrial environments is an important selection pressure (Taigen et al., 1984). Accessing warm temperature, in a wet environment, is therefore essential to avoid dehydration and promote embryonic development. The concept thermo-hydroregulation strategies have recently been described for ectotherms (Rozen-Rechels et al., 2019) and the water based tradeoffs likely apply to amphibians species with terrestrial egg transport.

5. Conclusion

To our knowledge, we present here the results of the first study on the benefits of thermoregulation for an amphibian species with egg transport. The paternal effect on development duration could provide an effective way of improving reproductive success. The emergence of MPC often leads to a trade-off between parental and offspring requirements (Kurdíková et al., 2011) but see (Stiver & Alonzo, 2009). Future studies are needed to assess the benefits of parental thermoregulation during terrestrial embryonic development in amphibians.

CHAPITRE II : Coûts des soins parentaux, fécondité et désertion parentale

© M. Passerault

« Il n'y a qu'une seule manière d'aimer ses parents : tout leur pardonner quoi qu'ils aient fait. Ensuite, il n'y a qu'à se pardonner soi-même de ne pas leur avoir pardonné plus tôt. » - Bernard Werber

A. Préambule

Les soins parentaux impliquent une association entre un parent et un jeune qui améliore l'aptitude de ce dernier (Clutton-Brock, 1991; Crump, 1996; Royle et al., 2012; Trivers, 1972; Wittenberger, 1981). Ils sont souvent délivrés par la femelle seule, parfois par les deux parents et de manière moins fréquente par le mâle seul (Clutton-Brock, 1991; Dulac et al., 2014; Furness & Capellini, 2019; Gilbert & Manica, 2015). Les bénéfices des soins parentaux mâles (SPM) peuvent être multiples : i) amélioration de l'aptitude, ii) augmentation de l'attractivité du mâle, iii) augmentation de la certitude de paternité, iv) diminution des coûts physiologiques de la femelle (Lissåker & Kvarnemo, 2006). Ils peuvent aussi apporter des bénéfices par le biais d'effets phénologiques (CHAPITRE I. B.). Cependant, les soins parentaux requièrent du temps et un investissement énergétique, ce qui peut compromettre la balance énergétique parentale, augmenter les risques d'exposition à des contraintes, voire induire des conflits intergénérationnels (Crespi & Semeniuk, 2004; Royle et al., 2016). Ainsi, les SPM peuvent diminuer le succès reproducteur et la survie du parent (Alonso-Alvarez & Velando, 2012). Cependant, peu d'études décrivant les coûts associés aux SPM sont disponibles à ce jour (I. Svensson, 1988; Townsend, 1986). Par exemple, le port des œufs chez le mâle de punaise dorée altère les performances de locomotion et augmente les risques de prédation (Reguera & Gomendio, 1999). De plus, l'intensité de ces coûts est souvent associée au nombre de jeunes pris en charge par le(s) parent(s) (Alissa et al., 2017). Enfin, l'abandon des jeunes en réponse aux contraintes environnementales a été décrit chez plusieurs taxon, démontrant la flexibilité de l'investissement parental (Kight et al., 2006; Ringler et al., 2015). Ce comportement peut notamment apparaître à la suite d'une augmentation des coûts associés à l'investissement parental mais aussi à la suite d'une diminution des bénéfices (Chuang et al., 2017; Delia et al., 2013).

Dans ce contexte, nous avons étudié les performances de locomotion chez le mâle Alyte accoucheur en comparant des mâles portant des œufs, des mâles sans œufs et des mâles ayant récemment abandonné leur ponte. Quatre paramètres écologiquement pertinents ont été considérés : le saut, le temps de retournement, la réponse musculaire à la charge et la locomotion volontaire. L'influence de la taille de ponte sur les performances des porteurs a également pu être investiguée. Enfin, les paramètres déterminant l'abandon et l'influence de l'abandon sur les performances ont été clarifiés.

B. The costs of being a good dad: egg-carrying and clutch size impair locomotor performances in males Midwife toad, *Alytes obstetricans*

1. Introduction

Parental care (PC) refers to all post-zygotic investments and understanding the diversity of PC is a central focus in evolutionary biology (Clutton-Brock, 1991; Royle et al., 2012). Among animals, PC is predominantly delivered by females, sometimes by both parents and less frequently by males only (Clutton-Brock, 1991; Dulac et al., 2014; Furness & Capellini, 2019; Gilbert & Manica, 2015). This asymmetry reflects sex-differences in prezygotic allocations (anisogamy) and sex-specific fitness benefits from PC (Hayward & Gillooly, 2011; Trivers, 1972; Westneat & Fox, 2010). Notably, female reproductive success is maximized by increasing allocation of energy and resources into the progeny, while males benefit from increasing mating opportunities (Trivers, 1972). Anisogamy alone is not sufficient to explain sex differences in parental effort (Kokko & Jennions, 2008) as a diversity of traits can influence the sex of the parent involved in care. (Royle et al., 2012). For example, mode of fertilization can influence which parent provides PC, male parental care (MPC) being more common in species with external fertilization (Beck, 1998; Dawkins & Carlisle, 1976; Gross & Shine, 1981; Vági et al., 2019) or with securing paternity (Kahn et al., 2013; Kvarnemo, 2006). Overall PC requires substantial time and energy investments which can compromise parental energy balance, increase risk exposures or induce parental-offspring conflict (Crespi & Semeniuk, 2004; Royle et al., 2016). The magnitude of these costs is often related to the number of offspring but may vary among males and females, influencing level of parental commitment (Alissa et al., 2017).

Although exclusive MPC is relatively rare, it has been documented in both invertebrates and vertebrates (Bleu et al., 2016; Bukhari et al., 2019; Dulac et al., 2014; Kahn et al., 2013; Quesada-Hidalgo et al., 2019; Ridley, 1978). MPC can include internal or external brooding, but also feeding, guarding, and carrying the progeny (Ridley, 1978). Current concepts posit that exclusive MPC has emerged from a situation of no care (ancestral state ; Gilbert & Manica, 2015) either by natural selection (*e.g.*, "territoriality hypothesis") or by female choice (*e.g.*, "sexual selection hypothesis" ; Nazareth & Machado, 2010). Multiple benefits of MPC have been highlighted either for male, female or both and include: i) enhanced parental fitness, ii) increased male attractivity, iii) secured paternity, and iv) reduced physiological costs for the mother (Kvarnemo, 2006). Despite these benefits, it is essential to clarify the costs of MPC to

better understand their evolutionary history. Similarly to female parental care, MPC can induce increased predation risks and energy use, which in turn can lead to a decreased reproductive success or survival (Alonso-Alvarez & Velando, 2012). Yet only few studies explicitly estimated these costs (but see Townsend, 1986; Svensson, 1988; Ahnesjo, 1995). Important flexibility in the expression of MPC has been described in several taxa and clutch abandonment can be observed in response to environmental constraints (Kight et al., 2006). Examining species with exclusive MPC represents a powerful opportunity to assess post-zygotic costs of reproduction and to address the evolutionary context leading to MPC.

Anuran amphibians display the largest diversity of reproductive and parental strategies among vertebrates (Crump, 2015; Duellman & Trueb, 1994). Multiple forms of PC exist in this group: egg attendance, egg transport, tadpole attendance, tadpole transport, tadpole feeding, and internal gestation whether in the oviduct, the stomach or a dorsal pouch (reviewed in Crump, 1996; Furness & Capellini, 2019). PC is found in 17 of the 27 extant anuran families. Among them, 47% of species with uniparental care demonstrate MPC (Crump, 1996; Dulac et al., 2014). Male attendance has been widely described in different species especially under the tropics (Chuang et al., 2017; Delia et al., 2013; Downie et al., 2005; Royan et al., 2010; Townsend et al., 1984). The benefits of MPC involve the regulation of developmental conditions (protection against desiccation) or reduced predation risks for the offspring. Progeny attendance or transport can influence locomotor performances and therefore predation risks for the parent (*e.g.*, Reguera & Gomendio, 1999) as well as food intake (Dugas et al., 2016). Interestingly, clutch desertion in species with uniparental care has been documented in different contexts suggesting high levels of flexibility in parental commitment (Ringler et al., 2015). Clutch desertion can be related to increased costs (predation risks, mating opportunities) or reduced benefits of care (when the number of offspring is low ; Delia *et al.*, 2013; Chuang *et al.*, 2017).

The evolution of reproductive modes in amphibians is closely linked to climatic conditions and PC are particularly diversified under warm climates (Crump, 2015; da Silva et al., 2012; Lion et al., 2019). Species showing PC and MPC can also be found under more constraining climates and deserve specific attention notably to study terrestrial reproduction (Crump, 1996; Úbeda & Nuñez, 2006; Vági et al., 2019). In the Western Palearctic region, the genus *Alytes* comprises five species that all display terrestrial incubation and exclusive MPC (Verrell & Brown, 1993). Males carry the eggs during the whole embryonic development that lasts three to six weeks (E. Wells et al., 2015). This genus provides an opportunity to explore possible costs of paternal

care. We investigated the influence of egg carrying on locomotor performances and the possible interactions with clutch size in the common midwife toad (*Alytes obstetricans*). We considered locomotor traits that are ecologically relevant for a male midwife toad while carrying eggs. These traits included hopping performances, righting-responses, muscular responses to egg burden, and voluntary locomotion by comparing carrying and non-carrying males.

Specifically, we tested the following predictions:
1) Egg carrying should influence male mobility. We predict that reproductive males will exhibit lower performances when compared to non-carrying ones.
2) Clutch size should influence performances in carrying male. We expect a negatively influence of egg burden (relative clutch size) on male locomotion.
3) Clutch desertion should occur in response to disturbance notably among males with lower reproductive effort.

2. Materials and methods

a. Study species

The common midwife toad (*Alytes obstetricans*) is a small (4-5 cm) species from the Alytidae family, ranging across Western Europe (Bosch & Márquez, 1996). *Alytes* have a unique type of reproduction with terrestrial egg development. During mating, the male collects the fertilized eggs and attaches them in strings around its hind legs. Eggs are carried until the end of embryonic development which lasts up to 32 days in the wild (E. Wells et al., 2015). Once embryos have completed their development, the male reaches small water bodies (ponds, puddles, ditches) to deposit the tadpoles (Márquez, 1992). In *Alytes obstetricans*, clutch size ranges from 32 to 171 eggs (E. Wells et al., 2015). Males can carry simultaneously several clutches from different females (Márquez, 1992; Pinya & Pérez-Mellado, 2014).

b. Capture, housing and sex identification

The study site is located in western France (Chizé forest, 46.145°, -0.394°) and harbours a relatively large population. Adult toads were collected during the reproductive season (April to July 2018) (Márquez, 1990). Every week, up to 10 individuals were captured by hand and brought to the laboratory where they were measured (snout-vent length, SVL, mm) and weighed (mg). They were individually housed in plastic boxes (32 cm l x 18.5 cm w x 10.5 cm h) with the same quantity of moistened vermiculite and allocated in a controlled temperature room (20°C). Two shelters (halved PVC tubes) and a small bowl of water were placed inside each

box. Individuals were kept in the lab for three days before being released at the exact capture site. For further re-capturing purposes, animals were individually marked with a RFID nanotag (Trovan, United Kingdom), placed in the dorsal lymphatic sac just before being released.

The midwife toads show limited sexual dimorphism (Bosch & Márquez, 1996). Each individual was inspected to identify its sex combining different methods. Individuals found carrying a clutch were straightforwardly sexed as males. Individuals found with visible eggs in their body cavity were identified as females. Otherwise the sex was set as undetermined unless the individuals were subsequently recaptured either carrying eggs or with eggs in the body cavity. We captured a total of 91 different males. Among them, 63 were found carrying eggs. Among these 63 individuals, 14 deserted their clutch during the captivity period.

c. Clutch size of carrying males

We estimated clutch size using top-side photographs to count the number of eggs of each carrying male with the multi-point tool of ImageJ (Rasband & S., 2012). We validated this method with a subset of 11 individuals for which we compared estimated clutch size and actual clutch size (lm, $F_{(1,9)} = 20.6$, $R^2 = 0.70$, p-value = 0.001). A positive relationship between SVL and estimated clutch size was found (Figure 49).

d. Locomotor performances

Hopping performance

The hopping capacities in anurans are essential locomotor performances that can reflect either predator avoidance or mobility. Hopping performances were measured in the afternoon of day 2. We used an anti-sliding support made of synthetic turf in a room set at 20°C. During the trial, toads were stimulated by gently touching the end of the urostyle to induce a hop. Toads were stimulated until no reaction appeared after 15 touches in a row. Each trial was video-recorded, so that we could measure hopping distances using ImageJ software (Rasband & S., 2012). We measured hopping performances of 16 non-carrying males, 38 carrying males and 8 deserting males (that had previously abandoned their clutch).

Righting-response

This parameter provides a defence response in front of a potential predator. Righting-response was measured on a horizontal surface (plastic) in a room set to 20°C. A trial consisted on turning the toads upside down and measuring the duration needed for each toad to turn back aside. If handling induced catalepsy, data were discarded. Each trial was video-recorded, so that we

could measure the number of images, convert it in seconds using the frame rate setting of our camera, and therefore determine the duration of each righting-response. We measured righting-responses of 12 non-carrying males, 41 carrying-males and 6 deserting males.

Muscular response to egg burden

We designed a simple test to address the response to gravity, *i.e.*, the burden of clutch mass on muscular performances. The individual was handled and kept vertically, and we assessed if the animal was able to maintain its hind legs close to the body (typical response). Muscular response to egg burden was measured in a room set at 20°C. Each toad was measured on ten successive occasions. Each trial lasted for 1 minute after which a new trial was started if the toad did not completely drop both hind legs indicating inability to maintain muscular contraction. If handling induced struggling, toads were immediately released, before starting again few seconds later and this procedure was repeated until ten trials were completed. We determined for each trial if the individual failed (1) or not (0) to maintain its hind legs folded over 1 minute. We also collected the time at which the toad completely dropped both legs. We estimated the muscular response to egg burden of 15 non-carrying males, 37 carrying males and 8 deserting males.

Volontary activity

We designed a simple homing test to examine voluntary activity. We tested individuals in a room set to 20°C with toads placed in a plastic corridor (73 cm L x 11 cm W x 17 cm H) the bottom of which was covered with seven synthetic turf squares (10 cm L x 10 cm W), each representing one compartment of the corridor. A refuge, similar to the ones of the housing environment, was positioned at one extremity and a trial started with the introduction of the toad at the other extremity. Each trial lasted for 10 minutes and was video recorded. We compared the homing times and locomotion modes (number of hops *vs.* walking). We looked at voluntary locomotion of 16 non-carrying males, 35 carrying males, and 8 deserting males.

e. Statistics

All the statistical analyses were run on R (version 3.5.0 ; R Development Team, 2005) and R studio (version 1.2.5001). Values presented in the results are means ± standard deviation (SD). We examined SVL differences between carrying and non-carrying males using an ANOVA.

We investigated effect of reproductive status (carrying/non-carrying) and SVL on hopping response and on number of hops using glm with respectively binomial and Poisson distribution. We used mixed model (lmer with gaussian distribution) to evaluate effect of reproductive status

and SVL on hop distances and reproductive status, trials and SVL on righting-response. Individual identity was sets as a random factor. Similarly, we used glmer with individual identity sets as a random factor to test the effect of reproductive status, SVL and trial on muscular response (binomial function) and muscular response time (logarithm distribution). The interactions between reproductive status and trial were never significant and thus they were discarded from our final models. Finally, we used a linear model and a glm (Poisson distribution) to explore effect of reproductive status and SVL on homing time and number of hops in voluntary locomotion (see Table 2 for summary).

Among carrying males, the relative clutch size (size adjusted) was obtained by extracting the residuals of the linear relation between estimated clutch size and male SVL (Figure 49). We tested the effects of relative clutch size (RCS) and SVL on hop success and number of hops using glm model with respectively binomial and Poisson distribution. The effects of RCS and SVL on hop distances and righting responses, were analysed using lmer with gaussian distribution with individual identity sets as a random factor. We used lmer with logarithm distribution to investigate effect of RCS, SVL and trial on muscular response time with individual identity sets as a random factor (see Table 3 for summary).

Finally, we used binomial logistic regressions to test the influence of SVL and relative clutch size on desertion probability. We examined the influence of desertion on locomotor performances in a separate set of analysis considering only response variables that were influenced by egg carrying. We applied the same models (type and family) described above to compare carrying and non-carrying males, with the third reproductive status "deserting male" and with reproductive status as the only variable tested (*i.e.*, without SVL or trial effects). Tukey tests were then used as post-hoc analysis.

3. Results

a. Male morphology and clutch size

SVL was on average 35.01 ± 2.74 mm, and both carrying and non-carrying males had similar body size (ANOVA, $F_{(1,89)} = 0.33$, p-value = 0.57). For carrying males, estimated clutch size ranged from 12 to 72 eggs (32.43 ± 12.66), and estimated clutch size was significantly related to SVL (Figure 49, lm, $F_{(1,54)} = 18.97$, $R^2 = 0.25$, p-value < 0.0001).

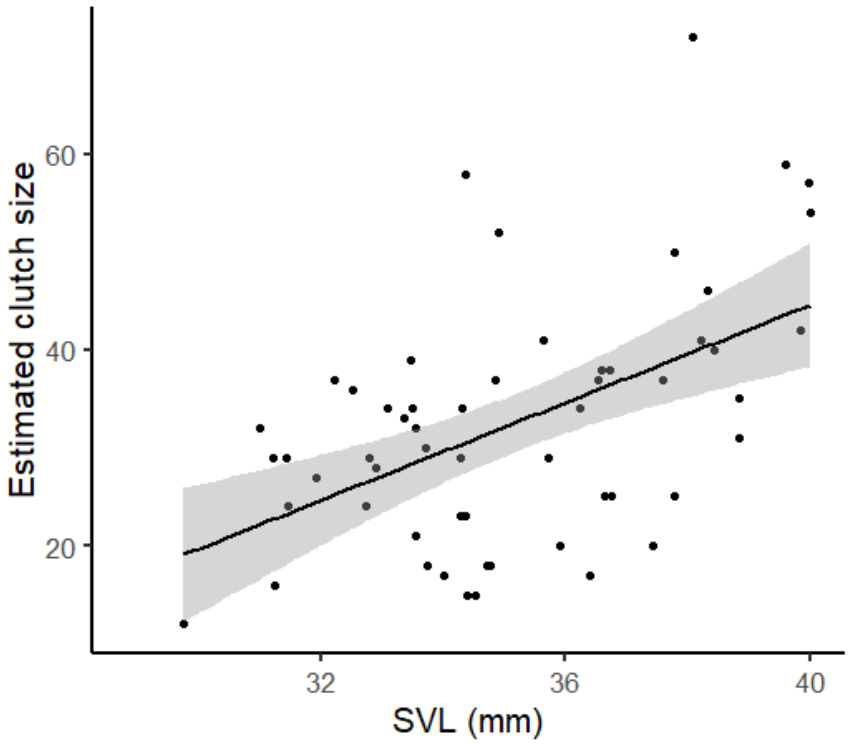


Figure 49. Relation between estimated clutch size and snout-vent length (SVL).
The line represents the fitted linear regression and the grey area the 95% confidence interval.

b. Influence of reproductive status on performances

Hopping performance

Carrying males hopped more frequently than non-carrying ones (62.5%; n=10/16 vs 23.68%; n = 9/38; Table 2). Restricting the analysis to individuals that responded at least once, we found that the total number of hops recorded was lower in carrying-males in comparison with the non-carrying ones (10.83 ± 9.13 vs 12.67 ± 20.23; Table 2). Body size positively influenced the total number of hops independently of status (Table 2). Hopping distance was shorter for carrying males than non-carrying ones (12.53cm ± 5.16 cm vs 20.67 ± 6.68 cm; Figure 50; Table 2) but was not related to SVL (Table 2). Within carrying males, relative clutch size had a negative influence on hopping distance (Figure 51; Table 3), but not on responsiveness to stimulations or the number of hops (Table 3).

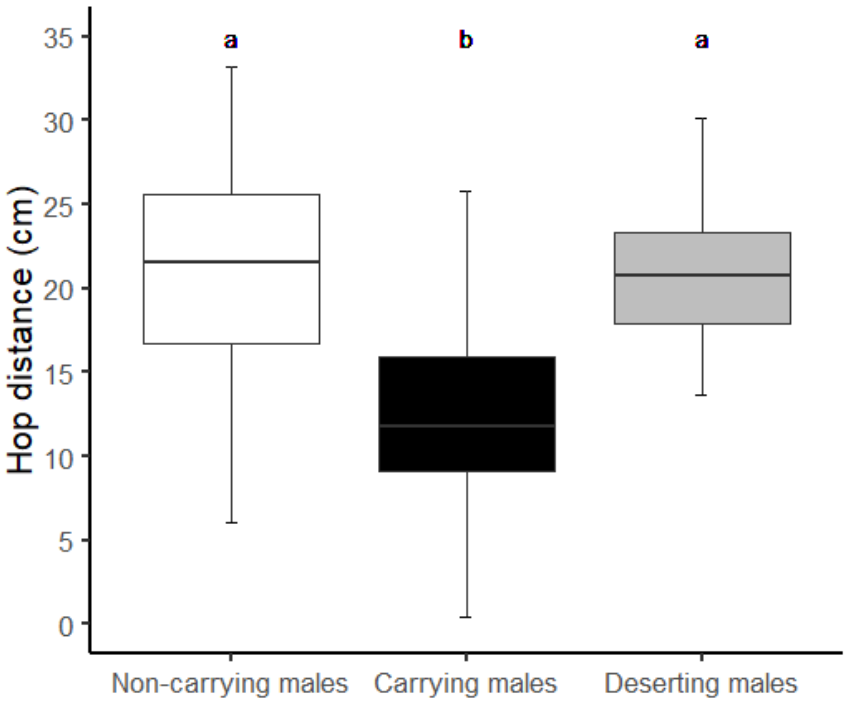


Figure 50. Effect of reproductive status on hopping distance.
Boxes represent the intervals between the 25% and 75% quartiles and the whiskers represent the ranges. The middle horizontal lines in the box plots represent the medians. Different letters indicate significant differences between groups.

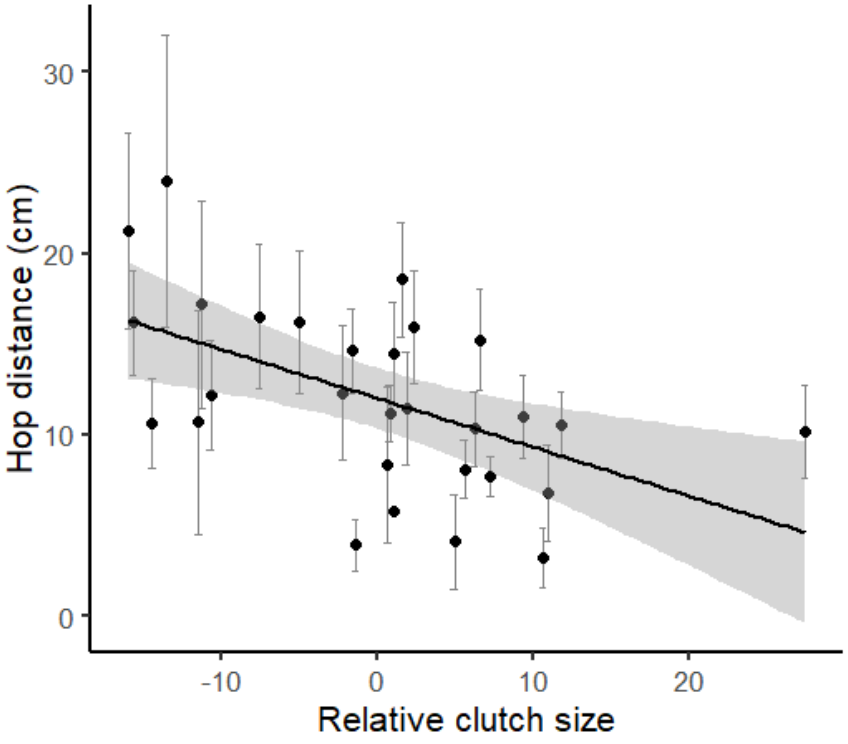


Figure 51. Influence of relative clutch size on hop distance.
Relative clutch size was determined from the residuals of the linear regression between estimated clutch size against SVL (see text for details). The line represents the fitted linear regression and the grey area the 95% confidence interval. Closed circles represent mean individual values and the whiskers the standard deviations.

Table 2. Statistical output of the models used to test for the influence of reproductive status (deserting males not included), SVL, and trial on midwife toad locomotor performances.
Loc. :locomotion. SE :standard error. SVL : snout to vent length.

Response variable	LM type - Family	Random effect	Explanatory variables	Estimate	SE	z/t value	*p-value*
Hop response	Glm -	None	(Intercept)	-0.32	4.22	-0.08	0.94
(0/1)	Binomial		Status	1.68	0.64	2.61	**0.009**
			SVL	-5.37e-3	0.12	-0.05	0.96
Number of hops	Glm -	None	(Intercept)	-3.34	0.79	-4.23	**<0.0001**
	Poisson		Status	-0.37	0.13	-2.83	**0.005**
			SVL	0.17	0.02	7.59	**<0.0001**
Hop distances	Lmer -	(1|Individual)	(Intercept)	16.78	14.99	1.12	0.27
	Gaussian		Status	-8.74	2.72	-3.22	**0.003**
			SVL	0.12	0.43	0.27	0.79
Righting-response	Lmer -	(1|Individual)	(Intercept)	0.18	0.29	0.63	0.53
(time)	Gaussian		Status	0.19	0.05	3.92	**<0.001**
			Trial	0.02	4.19e-03	5.50	**<0.0001**
			SVL	9.47e-03	7.88e-03	1.20	0.24
Muscular response	Glmer -	(1|Individual)	(Intercept)	-20.76	5.89	-3.53	**<0.001**
(0/1)	Binomial		Status	7.44	1.38	5.41	**<0.0001**
			SVL	0.59	0.17	3.52	**<0.001**
			Trial	0.03	0.08	0.34	0.73
Muscular response	Lmer -	(1|Individual)	(Intercept)	2.30	2.64	0.87	0.39
(time)	Logarithm		Status	-0.07	0.45	-0.15	0.88
			SVL	-0.05	0.07	-0.73	0.47
			Trial	-0.18	0.04	-4.91	**<0.0001**
Homing time	Lm -	None	(Intercept)	114.18	268.90	0.42	0.67
	Gaussian		Status	-1.84	41.42	-0.04	0.97
			SVL	3.05	7.67	0.40	0.69
Number of hops	Glm -	None	(Intercept)	11.85	1.85	6.40	**<0.0001**
(Voluntary loc.)	Poisson		Status	-0.62	0.24	-2.54	**0.01**
			SVL	-0.33	0.06	-5.77	**<0.0001**

Table 3. Statistical output of the models used to test for the influence of relative clutch size (RCS), SVL, and trial on locomotor performances in carrying males.
SE : standard error. SVL : snout to vent lentgh.

Response variable	LM type - Family	Random effect	Explanatory variables	Estimate	SE	z/t value	*p-value*
Hop response	Glm -	None	(Intercept)	-2.01	5.77	-0.35	0.73
(0/1)	Binomial		RCS	0.02	0.04	0.46	0.65
			SVL	0.09	0.16	0.55	0.58
Number of hops	Glm -	None	(Intercept)	-2.24	0.86	-2.61	**0.009**
	Poisson		RCS	0.01	0.01	1.38	0.17
			SVL	0.13	0.02	5.45	**<0.0001**
Hop distances	Lmer -	(1|Individual)	(Intercept)	13.99	11.90	1.18	0.25
	Gaussian		RCS	-0.26	0.08	-3.27	**0.003**
			SVL	-0.05	0.33	-0.14	0.89
Righting-response	Lmer -	(1|Individual)	(Intercept)	0.34	0.33	1.05	0.30
(time)	Gaussian		RCS	7.21e-3	2.56e-3	2.82	**0.008**
			SVL	0.01	9.28e-3	1.15	0.26
			Trial	0.02	5.03e-3	4.46	**<0.0001**
Muscular response	Lmer -	(1|Individual)	(Intercept)	2.01	2.37	0.85	0.40
(time)	Logarithm		RCS	0.03	0.02	1.53	0.14
			SVL	-0.04	0.07	-0.63	0.53
			Trial	-0.19	0.04	-5.05	**<0.0001**

Righting-response

Righting-response was significantly influenced by reproductive status (Table 2). Carrying males required more time to flip back than non-carrying ones (0.83 ± 0.32 s vs 0.64 ± 0.23 s; Figure 52; Table 2). Righting-response was not influenced by SVL but was longer across trials (Table 2), without interaction with the status. Within reproductive males, relative clutch size positively influenced righting-responses duration (Figure 53; Table 3).

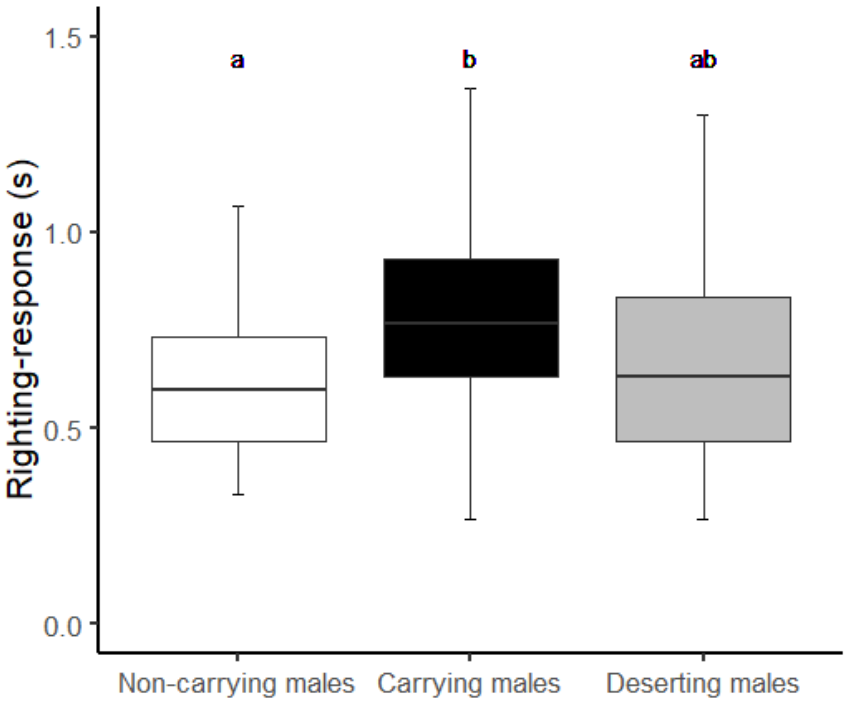


Figure 52. Effect of reproductive status on righting-response.
Boxes represent the intervals between the 25% and 75% quartiles and the whiskers represent the ranges. The middle horizontal lines in the box plots represent the medians. Different letters indicate significant differences between groups.

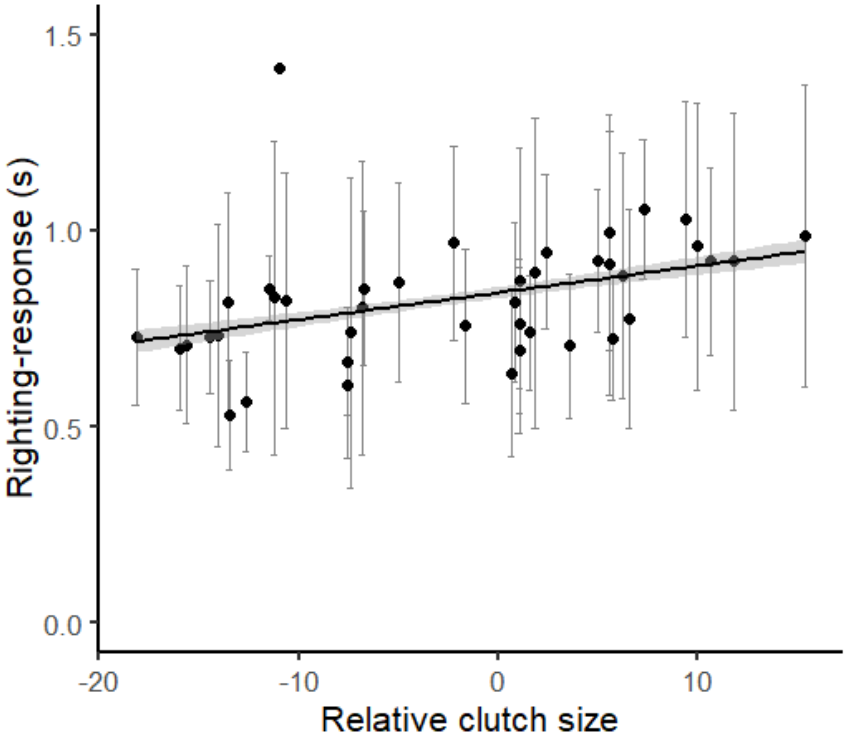


Figure 53. Influence of relative clutch size on righting-response.
The line represents the fitted linear regression and the grey area the 95% confidence interval. Closed circles represent mean individual values and the whiskers the standard deviations.

Muscular response to egg burden

Trial number did not influence the ability to maintain hind legs folded. However, body size had a significant influence with smaller individual being more prone to keep their legs folded (Table 2). Carrying males were less able to retain their legs (0.27%) than non-carrying ones (50.67%; Figure 54; Table 2). We found no influence of reproductive status, SVL, and relative clutch size on leg dropping time (Table 2 and Table 3) but males dropped faster as trials progressed (Table 2).

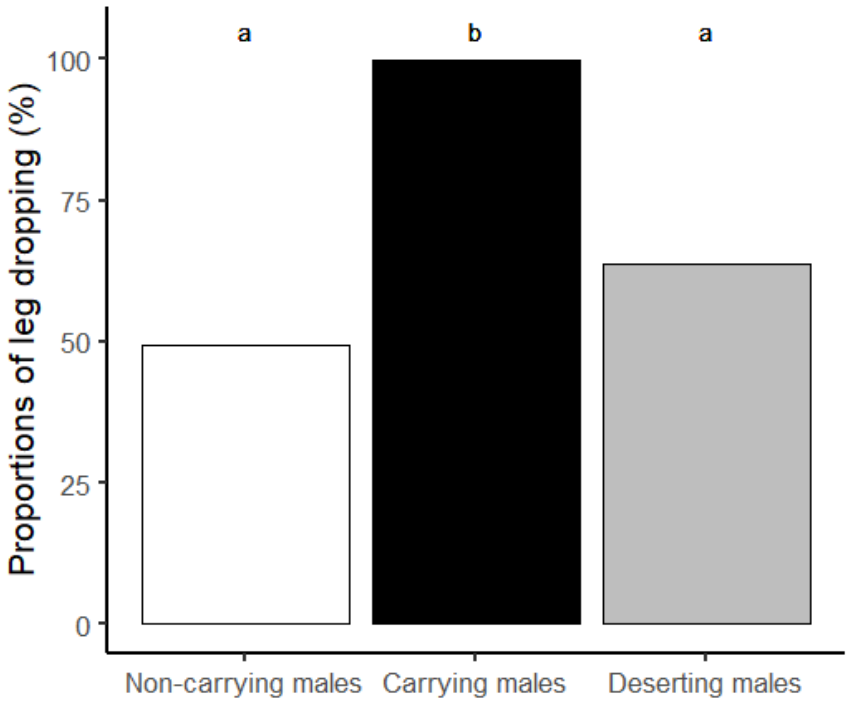


Figure 54. Effect of reproductive status on proportions of leg dropping.
The bars represent the proportions for each category. Different letters indicate significant differences between groups.

Voluntary locomotion

When placed in the arena, all individuals reach the refuge in an average time of 219.61 ± 129.50 seconds. We found no effect of status or SVL on homing time (Table 2). However, carrying males used less hops to reach the refuge than non-carrying ones (1.06 ± 2.63 vs 2.40 ± 3.36; Table 2). Finally, larger individuals hopped less and relied more on walking to reach the refuge (Table 2).

c. Clutch desertion

Determinant of desertion

Fourteen individuals (12.77 %) abandoned their clutch during our study. Deserting males were significantly smaller than non-deserting ones (33.64 ± 3.27 mm vs 35.54 ± 2.54 mm; binomial logistic regression, χ_1^2 = 5.21, N = 63, p = 0.02). Estimated clutch size was not significantly different (deserting males: 37.36 ± 17.28 vs non-deserting males: 31.22 ± 11.18; binomial logistic regression, χ_1^2 = 2.01, N = 56, p = 0.16). However, relative clutch size was significantly higher in deserting than non-deserting ones (7.20 ± 13.99 vs -1.76 ± 9.37; binomial logistic regression, χ_1^2 = 6.03, N = 56, p = 0.01).

Influence on performances

Hopping probability of deserting males did not differ significantly from carrying or non-carrying males (33.33%; n=2/8; all Tukey's tests > 0.21). Deserting males performed a lower number of hops than carrying ones and non-carrying ones (5.33 ± 3.08 cm; Tukey's tests, carrying males – deserting males: p < 0.001, non-carrying males – deserting males: p < 0.001). Their hopping distance did not differ from non-carrying males (Tukey's test, p = 0.99) and was therefore higher than carrying males' hopping distances (20.71 ± 5.21 cm; Figure 51; Tukey's test, p < 0.001). Righting-responses times of deserting males were similar to that of both non-carrying males (0.70 ± 0.31 s; Figure 53; Tukey's test, p = 0.77) and carrying ones (Tukey's test, p = 0.10). Deserting males did not differ from non-carrying males in their ability to maintain hind legs folded (Tukey's test, p = 0.61) and were therefore more efficient than carrying ones (36.25%; Figure 54; Tukey's test, p < 0.001). Finally, deserting males used as much hops to reach the refuge (4.29 ± 4.35) as non-carrying males (Tukey's test, p = 0.049) and therefore more than carrying ones (Tukey's test, p < 0.001).

4. Discussion

Costs of PC have been widely studied but remain largely overlooked in species with reversed sex roles (Eens & Pinxten, 2000). We examined the influence of egg carrying on locomotion and behaviour in an anuran with exclusive MPC. In support to our predictions, we found that carrying males exhibited altered locomotor performances and that these comparatively poor performances were linked to their reproductive burden (relative clutch size). We also addressed the determinant of clutch desertion. We discuss our results below.

a. Locomotor costs of egg carrying

Reproductive status had a major impact on locomotor performances. We found that carrying males hopped less, had shorter hopping distance, needed more time for righting-responses, and were unable to maintain hind leg muscular contraction. Carrying males walked instead of hopped when voluntary moving and were more responsive to stimulations across trials. Overall, all the locomotor traits we studied were negatively influenced by relative clutch size. Locomotor performances directly influence crucial ecological traits, such as foraging efficiency and anti-predation behaviour (P. W. Webb, 1986). For instance, it has been shown in arthropods that egg carrying decreases mobility, decreases food intake, and increases predator attacks (Burris, 2011; Ruhland et al., 2016). Therefore altered locomotor performances, as reported in this study, may well have significant fitness implications (Burris, 2011; Munguía-Steyer et al., 2019; P. W. Webb, 1986). Our findings are similar to locomotor costs demonstrated in females in numerous other taxa (Ruhland et al., 2016). Therefore, despite reduced prezygotic investment, MPC is likely to induce constraints similar to those typically observed in females (Ruhland et al., 2016; Sawecki et al., 2019; Williams et al., 2016).

The contrasted response to stimulations between carrying and non-carrying males (*e.g.*, hopping vs immobility) could also indicate a shift in anti-predation strategies (van Bergen & Beldade, 2019). Indeed, carrying males may be more susceptible to predation than non-carrying ones for two complementary reasons. First, as highlighted above, the locomotor performances of carrying males were strongly hindered by egg presence. Carrying males may benefit from early flight response to enhance their survival (Domínguez-López et al., 2018). In addition, the presence of large egg masses visible from above is likely to make carrying males more conspicuous to an approaching predator. As a consequence, carrying males are expected to rely less on cryptism (as observed in non-carrying males ; Polo-Cavia *et al.*, 2016). Such shift in anti-predation strategy would underline trade-offs between egg carrying and survival costs. As a consequence, these modified behavioural responses in carrying males may alleviate potential risks and limit survival costs linked to MPC and associated reproductive burden (Requena et al., 2012).

b. Clutch size-dependence of locomotor costs

According to the life history theory, clutch size is a central parameter to consider when addressing potential costs of reproduction (Stearns, 1992). Such costs can be clutch size-independent or on the contrary tightly related to the reproductive effort (Foucart et al., 2018;

Ladyman et al., 2003). Addressing clutch size-dependence is essential because the proximate nature of the relation should drive evolutionary trade-offs and adaptations (Ratikainen et al., 2018). We found that larger males tended to carry larger clutches, reflecting assortative mating and/or female choice (Böll & Linsenmair, 1998). When factoring out this allometric relationship and considering relative clutch size, we found that reproductive burden negatively influenced hopping distance and righting-response time. While males may derive direct fitness benefits from carrying larger clutches relative to their size (*e.g.*, producing comparatively more offspring), potential impacts on locomotion may influence their reproductive decision and mate selection. Interestingly, other parameters such as response to stimulations and number of hops were more tightly related to reproductive status than clutch size. Therefore, egg carrying may induce both clutch size dependent and independent constraints.

c. Determinant of clutch desertion

Parental desertion is frequently observed in species with MPC, often reflecting a trade-off between current and future reproductive effort (Chuang et al., 2017; Consolmagno et al., 2016; Delia et al., 2013, 2014). We found that deserting males were both smaller and carrying relatively larger clutch size. Previous studies in nest guarding amphibians have demonstrated that clutch abandon is more likely when environmental constraints are high (Consolmagno et al., 2016) and reproductive benefits (number of eggs) are low (Chuang et al., 2017). However, egg attendance is a flexible behaviour and clutch desertion is often temporary (Y.-H. Chen et al., 2007; Consolmagno et al., 2016; Delia et al., 2013). Herein, the type of care (egg carrying) impose very different proximate constraints for the male and the clutch abandon is permanent resulting in entire clutch mortality. This relation between desertion risk and reproductive burden suggest a causal link with locomotor impairment. Importantly, clutch desertion occurs in the wild (*e.g.*, four abandoned clutches were found on the study site during the study period). Desertion may relate to inexperienced (*i.e.*, smaller, as age and body size are generally positively correlated in amphibians ; Halliday & Verrell, 1988) or exhausted individuals (*i.e.*, carrying a heavy clutch). Deserting toads had similar performances than non-carrying males for the hopping-distance, the righting-response duration, the muscular response to egg burden, and the voluntary locomotion. Therefore, the costs we detected here are more likely due to physical restriction of the legs by the clutch mass (*e.g.*, hindering effect) than physiological costs of MPC.

d. Ecological and evolutionary implications

PC often induces significant energy constraints by limiting movements or because reproductive activities conflict with feeding (Lourdais et al., 2002). However, in many taxa, foraging activities are critical for survival and must been maintained during reproduction (Marconato et al., 1993). This is the case in the common midwife toad that continues feeding while carrying eggs (authors' personal observations). Egg carrying likely induces additional costs of transport in relation with feeding activities. Potential costs will also depend on the quality of microhabitat and climatic conditions. Indeed, beside food intake, males may also provide direct hydric care to their eggs by immersion in water during drier nights (Boulenger, 1897). Such active PC likely increases mobility (if the water body is relatively far from the diurnal refuge) and could add significant energy and/or survival costs. Further studies are required to address the potential costs of feeding and hydric care during reproduction in this species.

The evolution of PC is based on proximate trade-offs between possible energy/survival costs and significant fitness benefits. Sex role reversal has also major implications to address this relation and test evolutionary hypothesis. MPC can be beneficial for females, which are thus freed from egg care and have more opportunities to accumulate reserves to fuel future reproductive episodes (Westneat & Fox, 2010). This is typically the case for midwife toads, for which the reproductive season is protracted (broadly from late March to late September) and includes multiple reproductive episodes for both females and males. Such a situation likely offers the opportunity for females to lay more than one clutch during a breeding season (Tallamy & Brown, 1999). In addition, males can both carry several different clutches at the same time (Márquez, 1993) and multiple sequential clutches across the breeding season. Contrarily to many other temperate amphibian species that mate communally in aquatic environments during a restricted time period (Heyer et al., 2014; K. D. Wells, 1977), mating probabilities of midwife toads are linked to spatial and temporal variations of mate availability in the terrestrial microhabitats selected by individuals (Márquez, 1992). In this context, MPC may secure mating opportunities if female presence and reproductive status is hard to predict. As a consequence, the ability for a male to sustain repeated period of MPC during the protracted reproductive season is likely to be strongly linked to its physical condition.

5. Conclusion

Terrestrial reproduction in amphibians is a highly discussed topic (Lion et al., 2019; Vági et al., 2019) and the midwife toad constitutes a valuable model for studying the determinants of exclusive MPC in this context. We highlighted clear proximate trade-offs between locomotor performances and relative clutch size, underlining that egg carrying alters male performances. Such costs are likely to shape i) the level of male commitment and ii) female mate choice depending on individual quality. This reproductive strategy (egg carrying) is unique in the Palearctic region and observed in all members of the *Alytes* genus covering rather constraining climates (dry and warm to cold) from Western Europe to North Africa. Important evolutionary benefits are likely to exist to overcome potential costs. For instance, male midwife toads actively collect the eggs from the female and fertilize them on land, which provides a robust way to secure paternity for the males (Westneat & Fox, 2010). Predation risks and competition are major drivers reproductive strategies in amphibians and MPC might have emerged to improve the survival of offspring by extracting the eggs from the breeding ponds (Pearman, 1995). Recent work suggests that males actively select their microhabitats based on their thermal and hydric properties (Lange et al., 2020). Further studies are now required to explore the fitness benefits of exclusive MPC and to better understand the determinant of male egg-carrying in this group.

CHAPITRE III : Influences thermiques pré et postnatales sur le développement

© M. Passerault

« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements » - Charles Darwin

A. Préambule

Les adultes réalisent des soins parentaux pour améliorer leur succès reproducteur, notamment en améliorant la survie de leur(s) jeune(s) (Clutton-Brock, 1991; Crump, 1996; Royle et al., 2012; Trivers, 1972; Wittenberger, 1981). Cela peut s'exprimer par le biais d'effets phénologiques (CHAPITRE I. B.) et implique des coûts associés pour le parent (CHAPITRE II.). Cependant, les soins parentaux ont des effets sur le développement du jeune et les parents ne font pas systématiquement passer les besoins de leur(s) jeune(s) avant leurs propres besoins (Alissa et al., 2017; DeNardo et al., 2012; Kurdíková et al., 2011; Schwarzkopf & Andrews, 2012). Ces effets, qu'ils soient positifs ou négatifs, peuvent être particulièrement forts lorsque les pressions sont exercées pendant les stades précoces du développement des jeunes (Elphick & Shine, 1998). Ils peuvent ainsi s'observer à court terme mais aussi à long terme dans la trajectoire de vie du jeune (Le Henanff et al., 2013; Shine & Harlow, 1993; Wapstra et al., 2010). Les conditions environnementales postnatales peuvent également être déterminantes (Goldstein et al., 2017). Chez les ectothermes, la température est un des facteurs environnementaux abiotiques le plus influent du développement (Farmer, 2000).

Dans ce contexte, nous avons manipulé les conditions de développement chez l'Alyte accoucheur, pendant le développement pré et postnatal. A l'aide d'enceintes climatiques, nous avons placé des mâles Alytes accoucheurs avec leurs œufs sous trois traitements thermiques différents. A la naissance, nous avons réparti les jeunes de chaque mâle dans ces mêmes trois traitements thermiques, afin d'obtenir un plan factoriel complet (3x3). Nous avons ainsi évalué les effets des conditions thermiques prénatales seules, postnatales seules, et en interaction, sur la phénologie, le phénotype et les performances des jeunes.

B. Influences à court terme et effets persistants sur le développement – Résultats préliminaires

1. Contexte général

La plasticité phénotypique est la capacité d'un organisme à modifier son phénotype en réponse à des variations de l'environnement biotique ou abiotique (Miner et al., 2005; West-Eberhard, 2003). L'environnement peut avoir un impact direct sur le développement et la survie, mais aussi à plus long terme, comme sur les performances dans la vie adulte (Elphick & Shine, 1998; Gorman & Nager, 2004). La plasticité développementale peut être adaptative quand les conditions environnementales rencontrées pendant le développement sont informatives du futur

milieu de vie et qu'elle permet d'optimiser les performances (Hallson & Björklund, 2012). Dans le cas contraire, elle peut être mal-adaptive (Kawecki, 2000). Les différentes étapes du développement ne présentent pas les mêmes sensibilités à l'environnement (Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Mihaila et al., 2011). En effet, les stades précoces semblent particulièrement sensibles aux conditions abiotiques chez les vertébrés (Elphick & Shine, 1998). L'environnement abiotique entraine ainsi des effets à long terme, notamment sur la survie (Le Henanff et al., 2013; Shine & Harlow, 1993; Wapstra et al., 2010).

Un des paramètres cruciaux impactant le développement des invertébrés et des vertébrés est la température (Farmer, 2000). Elle détermine notamment le taux de développement ainsi que la taille des têtards à la métamorphose (Collins, 1979; Pandian & Marian, 1985). De plus, l'environnement thermique peut avoir des effets sur la survie, la masse, la durée du développement, les préférences thermiques ainsi que sur les performances de locomotion (Goldstein et al., 2017). Ces effets sont également observables en milieu naturel (Loman, 2002; Lourdais et al., 2004). Les conditions thermiques rencontrées pendant l'embryogénèse affectent non seulement la durée du développement et la survie globale (Damme et al., 1992; Foucart et al., 2018; Jones & Munn, 2015; Kaplan & Phillips, 2006; Lourdais et al., 2004) mais aussi le phénotype et le comportement (Burger, 1989; Elphick & Shine, 1998; Foucart et al., 2018; Kaplan & Phillips, 2006; Rodriguez-Diaz & Braña, 2011; Watkins & Vraspir, 2006; J. K. Webb et al., 2001). Des effets ont également été constatés sur des paramètres physiologiques (Damme et al., 1992; Kaplan & Phillips, 2006). Enfin, la température post métamorphose entraine des différences au niveau de la durée du développement, des performances, mais aussi du phénotype (Browne & Edwards, 2003; Maciel & Juncá, 2009), et ce indépendamment de la prise alimentaire (Browne & Edwards, 2003).

Chez les amphibiens, des effets d'interaction des traitements thermiques pré et postnataux ont pu être mis en évidence sur différents traits phénotypiques indépendants de la taille ainsi que sur certains paramètres de performances locomotrices, comme la vitesse d'accélération (Watkins & Vraspir, 2006). Dans une autre étude, les meilleures performances de locomotion (vitesse de nage en accélération) étaient atteintes lorsque les températures de développement prénatal étaient égales aux températures de développement postnatal (Seebacher & Grigaltchik, 2014). Les taux de croissance étaient plus importants à plus haute température quelle que soit la température de développement prénatal (Seebacher & Grigaltchik, 2014). Des effets d'interactions ont aussi été constatés sur des réactions enzymatiques (Seebacher & Grigaltchik, 2014). Dans ce contexte, il semble alors nécessaire d'étudier les effets de l'environnement

thermique dans un contexte d'interaction afin d'identifier plus clairement la sensibilité relative de chacun des stades du développement ainsi que de potentiels effets persistants et d'interaction. Le modèle *Alytes obstetricans* est alors particulièrement pertinent dans ce contexte puisqu'il présente un mode de reproduction original où le mâle effectue des soins parentaux sur les œufs pendant la totalité du développement embryonnaire. Il permet ainsi de distinguer les conditions environnementales rencontrées par les jeunes pendant la phase prénatale, *i.e.,* terrestres avec régulation parentale, des conditions environnementales postnatales, *i.e.,* aquatiques en autonomie. Nous avons donc étudié l'influence de l'environnement thermique pré et post natal sur le développement des jeunes de crapaud accoucheur. Nous avons considéré des facteurs écologiquement pertinents comme la phénologie, la morphologie, la physiologie et le comportement. Mon hypothèse générale est que les conditions thermiques vont façonner les trajectoires de développement avec une sensibilité plus marquée aux stades précoces (développement embryonnaire).

Dans ce contexte, j'ai examiné les prédictions suivantes :

- Les conditions prénatales devraient fortement influencer la vitesse et la qualité du développement du fait d'une forte sensibilité embryonnaire (Angilletta et al., 2010; Farmer, 2000; Gillooly et al., 2001).
- Les conditions postnatales devraient avoir des effets marqués sur les trajectoires de développement chez une espèce avec une saison de reproduction longue et donc des conditions thermiques variables dans le milieu aquatique (Maciel & Juncá, 2009).
- Des interactions sont attendues entre les conditions thermiques prénatales et postnatales sur la morphologie, la phénologie, la physiologie et/ou le comportement des jeunes (Watkins & Vraspir, 2006).

2. Matériel et méthodes

a. Capture et maintenance

30 crapauds accoucheurs mâles avec des œufs ont été collectés dans le centre-ouest de la France entre le 5 avril 2019 et le 13 mai 2019. Les mâles étaient choisis en évaluant le développement de la ponte à partir de sa coloration. Seuls les mâles avec les pontes les plus récentes (jaune) étaient sélectionnés.

Chaque mâle était mesuré, pesé, photographié et placé dans une boite en plastique opaque (35L x 25l x 13h cm), elle-même ensuite placée dans une chambre à température contrôlée (Vötsch,

VP600, Balingen, Allemagne). Les mâles disposaient de deux refuges et d'un point d'eau (17.5L x 11l x 3.5h cm) destiné à la baignade et au dépôt des œufs. Ils étaient nourris de grillons *ad libitum*. Les mâles étaient inspectés chaque jour pour déterminer la date de naissance. A l'éclosion, neuf têtards par mâle étaient sélectionnés aléatoirement puis placés dans des aquariums (18L x 12l x 11.5h cm) avec 1L d'eau et un refuge en PVC, eux-mêmes replacés dans une chambre à température contrôlée. Les autres ont été relâchés dans le milieu naturel au niveau du point d'eau du site de capture des adultes.

b. Plan expérimental

Dans le but d'étudier la sensibilité thermique pendant le développement, les jeunes ont donc été soumis à trois traitements thermiques pendant leur développement prénatal puis pendant leur développement postnatal.

Traitements thermiques

Les mâles semblent avoir une température préférée de 20.0°C (±0.2°C ; Lange, Brischoux et Lourdais, *In prep.*) mais les contraintes environnementales ne permettent pas toujours d'atteindre cette température, notamment au début du printemps, quand les températures sont encore froides, et pendant l'été, où les températures sont plus chaudes. Nous avons manipulé les conditions thermiques pendant le développement en utilisant des températures écologiquement pertinentes. Trois températures ont ainsi été choisies, 16°C, 20°C et 24°C, et appliquées de manière constante à trois chambres climatiques en utilisant le logiciel S!MPATI*. Le taux d'humidité était assuré par des pulvérisations d'eau quotidiennes. La répartition des mâles dans les enceintes était aléatoire. Les neuf têtards de chaque mâle étaient répartis dans les trois mêmes traitements thermiques, de façon à respecter un plan factoriel complet (Figure 55). 270 têtards ont ainsi été exposés à 3 x 3 traitements thermiques différents au cours de leur développement (Figure 55).

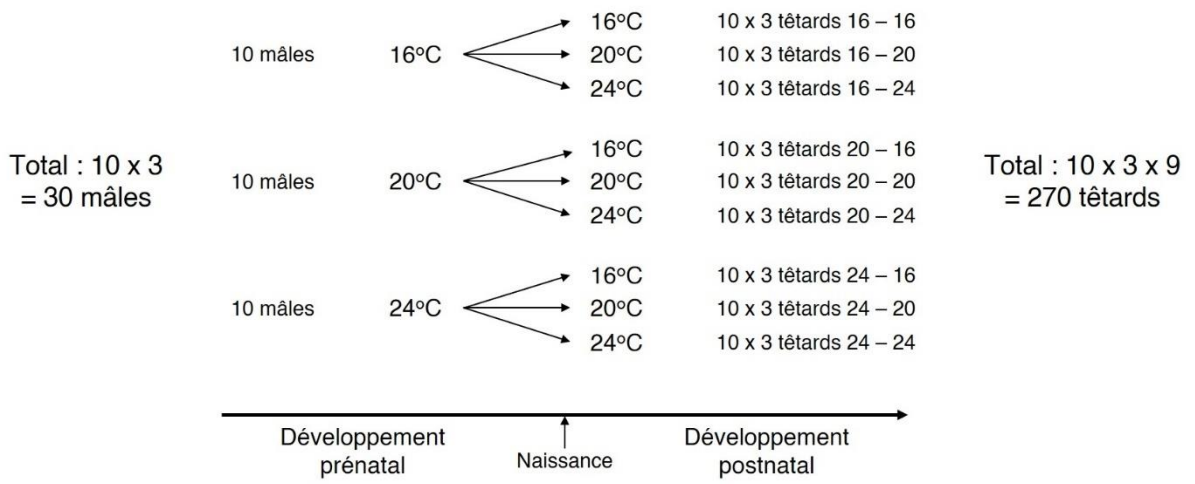


Figure 55. Plan expérimental utilisé pendant le développement.
Dans le traitement thermique médium à 20°C, les œufs et les têtards sont maintenus à la température préférée des mâles lorsqu'ils portent leurs œufs. Dans les traitements thermiques à 24°C et à 16°C, les œufs et les têtards sont maintenus à des températures plus hautes et plus basses, respectivement, mais écologiquement pertinentes.

Identification des stades de développement

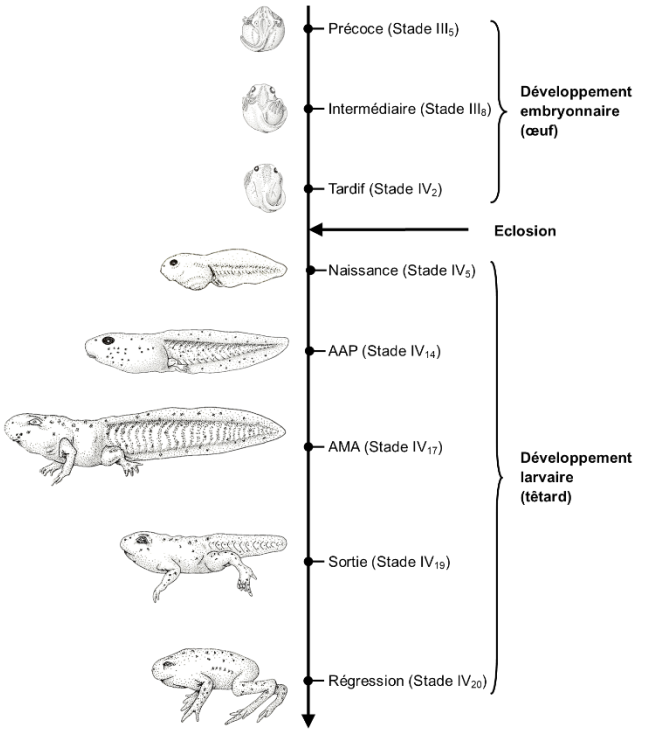
Puisque le plan expérimental reposait sur l'application de traitements thermiques et que la température influe sur les durées de développement (Singh et al., 2020), il était crucial de pouvoir identifier des stades de référence afin de comparer les résultats obtenus entre les différents traitements. Ainsi, neuf stades de référence au cours du développement ont été sélectionnés (Figure 56).

1. *Pendant le développement prénatal :*
   - *1.0 Initial (« capture »).* Sélection de mâles porteurs peu après la ponte : aucune structure embryonnaire n'est visible.
   - *1.1 Précoce*. Stade auquel la vésicule optique commence à apparaitre. (Stade III_5 ; (Cambar & Martin, 1959)).
   - *1.2 Intermédiaire*. Stade auquel la vésicule optique devient fortement visible (Stade III_8 ; (Cambar & Martin, 1959)).
   - *1.3 Tardif.* Stade auquel des vésicules de couleur dorée se forment sur les vésicules optiques. Dernier stade avant que les branchies soient complètement ventralisées (Stade IV_2 ; (Cambar & Martin, 1959)).
2. *Pendant le développement postnatal :*
   - *2.0 Naissance.* Stade de l'éclosion spontanée (Stade IV_5 ; (Cambar & Martin, 1959))
   - *2.1 Apparition des articulations postérieures (AAP).* Stade de première coudure importante au niveau de l'articulation du membre postérieur (Stade IV_{14} ; (Cambar & Martin, 1959))

2.2 Apparition des membres antérieurs (AMA). Stade d'apparition des membres antérieurs (Stade IV_{17} ; (Cambar & Martin, 1959)).

2.3 Sortie. Stade auquel le têtard sort spontanément de l'eau (Stade IV_{19} ; (Cambar & Martin, 1959)).

2.4 Régression. Stade auquel la queue a complètement régressé (Stade IV_{20} ; (Cambar & Martin, 1959)).



Phénologie	Morphologie	Physiologie	Performances de nage	Préférences thermiques
✓		✓		
✓		✓		
✓		✓		
✓	✓	✓	✓	
✓	✓	✓	✓	
✓	✓	✓		
✓	✓	✓		
✓	✓	✓		✓

Figure 56. Frise chronologique des stades de référence choisis pendant le développement prénatal et le développement postnatal.
AAP : Apparition des articulations postérieures. AMA : apparition des membres antérieurs. Les illustrations ainsi que les stades indiqués entre parenthèses sont celles et ceux de la « Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du crapaud accoucheur (« Alytes obstetricans » Laur.) » de Cambar, Martin 1959.

c. Variables mesurées

Morphologie du père et taille des œufs

La longueur museau-cloaque moyenne des mâles a été obtenue en mesurant chaque mâle à trois reprises à l'aide d'un pied à coulisse et en calculant la moyenne de ces trois valeurs. La taille moyenne des œufs au stade initial a été relevée à partir des photos des mâles prises avant le début du traitement thermique. Le périmètre de trois œufs sélectionnés aléatoirement a ainsi été mesuré en utilisant le logiciel ImageJ. Le nombre total d'œufs par mâle a été obtenu en séparant les œufs de la ponte un à un après l'éclosion de tous les têtards. Le nombre d'œufs a ensuite

permis de calculer le succès à l'éclosion en divisant le nombre de têtards en vie à la naissance par le nombre total d'œufs.

Stades et durées du développement

Les dates auxquelles les individus ont atteint chacun des stades de référence ont été relevées afin d'obtenir les durées de développement. La durée entre les différents stades ainsi que la durée totale de développement (jours) ont été calculées pour le développement prénatal (initial-naissance) et postnatal (naissance-régression) ainsi que pour la durée totale du développement (initial-régression). La liste des périodes (jours) est fournie ci-dessous :

Développement prénatal :

1/ Période initial-précoce : période entre les stades initial et précoce

2/ Période précoce-tardif : période entre les stades précoce et tardif

3/ Période tardif-naissance : période entre les stades tardif et naissance

4/ Période initial-naissance : période entre les stades initial et naissance (durée totale de développement prénatal)

Développement postnatal :

5/ Période naissance-AAP : période entre les stades naissance et AAP

6/ Période AAP-AMA : période entre les stades AAP et AMA

7/ Période AMA-sortie : période entre les stades AMA et sortie

8/ Période sortie-régression : période entre les stades sortie et régression

9/ Période naissance-régression : période entre les stades éclosion et régression (durée totale de développement postnatal)

Durée totale du développement :

10/ Période initial-régression : période entre les stades initial et régression

Mesures au cours du développement postnatal

Morphologie. Pour mesurer la morphologie des individus, ils ont été photographiés sur du papier millimétré puis mesurés à l'aide du logiciel ImageJ. La longueur totale et la largeur du corps ont été mesurées à tous les stades. Aux stades naissance, AAP, AMA et sortie, la longueur museau-cloaque et de la queue ont également été relevées. Aux stades sortie et régression, les mesures ont été réalisées sur le ventre et sur le dos. De plus, la masse des jeunes aux stades sortie et régression a été relevée en les pesant avec une balance (Ohaus Scout SKX123, Nänikon, Suisse).

Physiologie. La fréquence cardiaque au repos peut servir d'approximation (traduit de l'anglais, proxy) du métabolisme (Green, 2011). La fréquence cardiaque des jeunes a été

mesurée à chaque passage d'un stade de référence en comptant le nombre de battements pendant 30 secondes après 30 minutes d'équilibration à 20°C. Pendant le développement prénatal, elle a été mesurée en observant les œufs à la loupe binoculaire et plus particulièrement en observant la circulation des globules rouges au niveau des branchies. La moyenne de trois fréquences cardiaques mesurées sur trois œufs sélectionnés aléatoirement a été retenue pour les analyses statistiques. A un jour de vie après la naissance et au stade AAP, la peau des têtards d'alyte est transparente au niveau du ventre. Il est ainsi possible de visualiser les battements cardiaques par les changements de coloration au niveau du cœur. Pour pouvoir les compter sans retourner le têtard, un dispositif transparent a permis de filmer les têtards par dessous dans une position naturelle. Au stade AMA, un orifice se forme au niveau des membres antérieurs et les branchies ressortent par cet orifice. La fréquence cardiaque à ce stade a donc été mesurée en observant la circulation des globules rouges au niveau des branchies à la loupe binoculaire. Au stade sortie et régression, la fréquence cardiaque a été mesurée en réalisant une échographie cardiaque grâce à un échographe (Micromaxx, SonoSite, Inc., Bothell, WA, USA).

Performance de nage. Les têtards d'alyte sont autonomes à la naissance et les performances de nage individuelles devraient être un bon indicateur des capacités individuelles à trouver des microhabitats favorables dans un nouvel environnement. Les performances de nage individuelles ont été mesurées à un jour de vie après la naissance et au stade AAP en plaçant les têtards dans des boites de pétri (diamètre 8 cm et 14.5 cm, réciproquement), éclairés par dessous (d'après les recommandations du logiciel utilisé et ce pour améliorer le contraste et la détection des individus) et en les filmant pendant 30 minutes (20 minutes d'analyse et cinq minutes de battement au début et à la fin) à une température de 20°C. Les films ont ensuite été analysés en utilisant le logiciel Toxtrac. Le taux de mobilité, la distance parcourue, la vitesse moyenne, la vitesse moyenne en déplacement et l'accélération moyenne ont été relevés.

Préférences thermiques. La température impactant la croissance et le développement des jeunes (Forster et al., 2011; Zuo et al., 2012), il est possible que ces derniers modifient leurs préférences thermiques afin de compenser des conditions pré et/ou post natales défavorables (Goodman & Walguarnery, 2007). Nous avons donc mesuré les préférences thermiques des métamorphes à l'aide d'un pistolet thermique infrarouge (Fluke, 572CF, Everett, WA, USA). Les préférences thermiques des métamorphes ont été mesurées la semaine suivant le passage au stade régression. Les métamorphes ont été placés dans une boite translucide (32L x 18l x 11h cm) avec un substrat composé de 25 cl de tourbe et de 25 cl de vermiculite, humidifié avec 18 cl d'eau, un point d'eau et deux refuges. Les boites ont ensuite été placées dans une pièce à 17°C sur une étagère où un cordon chauffant réglé sur 40°C permettait de chauffer une des

extrémités de la boite. Un gradient thermique s'échelonnant entre 18.5°C et 35.0°C au niveau du substrat a ainsi été obtenu. Les préférences thermiques ont ensuite été mesurées en journée, à trois reprises, à deux ou trois jours d'intervalle.

Mesures un mois après la métamorphose

Après un mois passé dans des conditions similaires (voir celles décrites pour mesurer les préférences thermiques), la qualité des jeunes a été à nouveau mesurée pour évaluer les potentiels effets persistants des traitements thermiques pré et postnataux.

Morphologie. La longueur totale et la largeur du corps ont été mesurées sur le ventre et sur le dos en photographiant les individus sur du papier millimétré et en les mesurant grâce au logiciel ImageJ. La masse des jeunes a été relevée en les pesant à l'aide d'une balance (Ohaus Scout SKX123, Nänikon, Suisse).

Physiologie. La fréquence cardiaque des jeunes a été mesurée trois fois après 30 minutes d'équilibration à trois températures différentes (16, 20 et 24°C). L'ordre de l'équilibration aux trois différentes températures était sélectionné aléatoirement. Les fréquences cardiaques ont été mesurées par échographie cardiaque à l'aide d'un échographe (Micromaxx, SonoSite, Inc., Bothell, WA, USA).

Performances de saut. Puisque les jeunes alytes sont particulièrement vulnérables et que tout comportement permettant de prendre la fuite peut être important pour augmenter l'aptitude (traduit de l'anglais, *fitness*) d'un individu (Lind & Cresswell, 2005), nous avons mesuré les performances de saut des métamorphes. Les performances de saut ont été mesurées après 15 minutes d'équilibration supplémentaires, à la suite des mesures physiologiques à la température associée (Figure 57). Pour mesurer les performances de saut, les métamorphes ont été placés au centre d'une cible graduée au demi-centimètre près puis stimulés gentiment au niveau de l'urostyle à l'aide d'un pinceau. La moyenne des distances de trois sauts a été utilisée pour chaque individu.

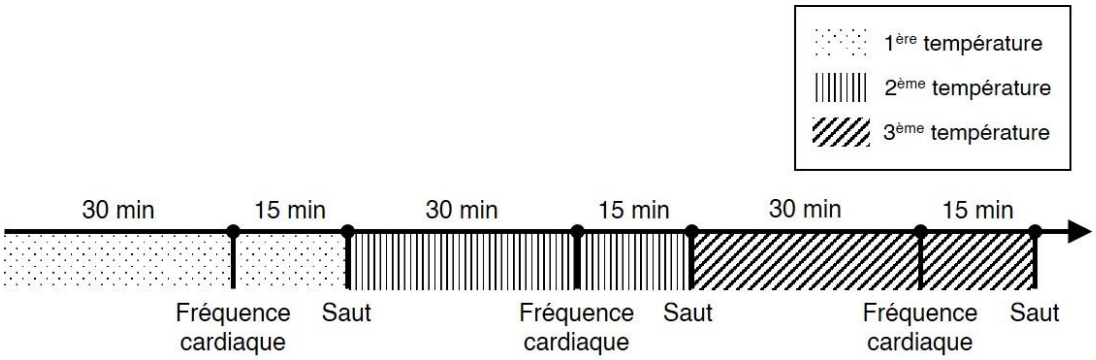


Figure 57. Chronologie des mesures des effets persistants.
Les périodes d'équilibration sont symbolisées par des plages de figurés graphiques. Les trois températures peuvent correspondre à 16, 20 ou 24°C, l'ordre des températures étant sélectionné aléatoirement pour chaque individu.

Préférences thermiques. Des mesures de préférences thermiques ont été renouvelées après un mois passé dans des conditions similaires en suivant le même protocole que celui utilisé au stade régression.

d. Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées sur R (version 3.5.0 ; (Team, 2005)) et R studio (version 1.2.5001). Nous avons examiné les différences de durées de développement prénatal en fonction du traitement prénatal, de la fréquence cardiaque mesurée au stade associé et de leur interaction en réalisant des Anova sur des modèles linéaires. Nous avons examiné les différences de durées totales de développement prénatal en fonction du traitement prénatal, du profil cardiaque (moyenne des fréquences cardiaques mesurées pendant le développement prénatal), et de leur interaction, avec une Anova réalisée sur un modèle linéaire. Nous avons étudié l'influence du traitement prénatal, du traitement postnatal et de leur interaction sur les durées de développement postnatal avec des tests du chi^2 de Wald sur des lmer avec comme effets aléatoires l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal. Les durées de la période naissance-AAP ont été modifiées par un logarithme. Cette transformation n'a pas été nécessaire pour les autres périodes. Nous avons également exploré l'influence de la fréquence cardiaque mesurée au stade associé sur les durées de développement postnatal, mais aucune influence significative n'a été observée. L'influence du traitement prénatal et de la taille moyenne des œufs au stade initial sur la morphologie à la naissance a été inspectée par des tests du chi^2 de Wald sur des lmer avec comme effet aléatoire l'identité du mâle. L'influence du traitement prénatal, du traitement postnatal, de leur interaction et de la taille moyenne des œufs au stade initial sur la morphologie aux différents stades du développement postnatal et un mois après la métamorphose a été étudiée par des tests du chi^2

de Wald sur des lmer avec comme effets aléatoires l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal. L'influence des traitements prénatal et postnatal sur la latéralité du premier membre à sortir a été testée par un test du chi^2 de Pearson. L'effet du traitement prénatal sur la fréquence cardiaque mesurée aux différents stades du développement prénatal et à la naissance a été testé avec des Anova sur des modèles linéaires. L'effet du traitement prénatal, du traitement postnatal et de leur interaction sur la fréquence cardiaque mesurée aux différents stades du développement postnatal a été évalué avec des tests du chi^2 de Wald sur des lmer avec comme effets aléatoires l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal. La relation entre le profil cardiaque et la taille de ponte (nombre total d'œufs) a été testée avec une Anova sur un modèle linéaire. A la naissance, la relation entre la fréquence cardiaque et la longueur totale a été étudiée avec un test du chi^2 de Wald sur un lmer avec comme effet aléatoire l'identité du mâle. Aux autres stades du développement postnatal, le traitement thermique postnatal ayant souvent eu un effet sur la longueur totale, cette relation a été étudiée en la testant au sein des trois groupes de développement postnatal avec des lmer avec l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal comme effets aléatoires. Aucune corrélation significative n'a été observée. L'effet du traitement prénatal sur les performances à la naissance a été testé avec des tests du chi^2 de Wald sur des lmer avec l'identité du mâle comme effet aléatoire. L'effet du traitement prénatal, du traitement postnatal et de leur interaction sur les performances au stade AAP a été testé avec des tests du chi^2 de Wald sur des lmer avec l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal comme effets aléatoires. Le traitement postnatal ayant souvent eu un effet sur la fréquence cardiaque, la relation entre fréquence cardiaque et performances de nage a été étudiée en la testant au sein des trois groupes de développement postnatal avec des tests du chi^2 de Wald sur des lmer avec l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal comme effets aléatoires. L'effet du traitement prénatal, du traitement postnatal et de leur interaction sur les préférences thermiques au stade régression et un mois après la métamorphose a été évalué avec un test du chi^2 de Wald sur un lmer avec l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal comme effets aléatoires. L'effet du traitement prénatal, du traitement postnatal, de la température de test et de leurs interactions sur la locomotion et la fréquence cardiaque un mois après la métamorphose a été testé avec des tests du chi^2 de Wald sur des lmer avec l'identité du têtard imbriqué dans l'identité du mâle et le traitement postnatal imbriqué dans le traitement prénatal comme effets aléatoires. Pour plus de concisions, seuls les résultats

des modèles les plus parcimonieux présentant des différences significatives sont présentés dans ce manuscrit.

3. Résultats

Tous les résultats statistiques de ce chapitre sont synthétisés dans le Tableau de synthèse des résultats aux analyses statistiques du chapitre III. (Tableau 2 – page 129). Tous les graphiques de ce chapitre utilisent le même code couleur : les traitements prénataux sont symbolisés par des bordures en couleurs primaires (16°C : bleu ; 20°C : violet ; 24°C : rouge) et les traitements postnataux sont symbolisés par des remplissages en couleurs pastel (16°C : bleu ciel ; 20°C parme ; 24°C : saumon).

a. Durée de développement

Effet traitement

Le traitement prénatal a impacté les durées de développement prénatal, et ce pendant les périodes initial-précoce, précoce-intermédiaire et intermédiaire-tardif (ANOVA, $p<0.02$; Figure 58). La durée de développement a été 2.2 fois plus longue pour atteindre le stade précoce dans le traitement prénatal à 16°C que dans le traitement à 24°C (test de Tukey, $p<0.001$; Figure 58) et 1.3 fois plus longue dans le traitement à 20°C que dans le traitement prénatal à 24°C (test de Tukey, $p=0.007$; Figure 58). La durée de développement a été 2.5 fois plus longue pour atteindre le stade intermédiaire dans le traitement à 16°C que dans le traitement à 24°C (test de Tukey, $p<0.001$; Figure 58) et 1.7 fois plus longue dans le traitement à 20°C que dans le traitement prénatal à 24°C (test de Tukey, $p = 0.05$; Figure 58). Enfin, la durée de développement a été 3.8 fois plus longue pour atteindre le stade tardif dans le traitement à 16°C que dans le traitement à 24°C (test de Tukey, $p<0.001$; Figure 58) et 1.3 fois plus longue dans le traitement à 20°C que dans le traitement prénatal à 24°C (test de Tukey, $p=0.25$; Figure 58). La relation traitement thermique – durée de développement ne semble donc pas linéaire. Pour la durée de développement de la période tardif-naissance, l'effet du traitement prénatal n'a pas montré d'effet significatif lorsqu'il était testé comme variable unique (ANOVA, $F_{(2,27)}=2.00$, $p=0.15$; Figure 58). Finalement, le traitement prénatal a influencé la durée du développement prénatal (période initial-naissance) ; (ANOVA, $F_{(2\text{-}27)}=47.71$, $p<0.001$).

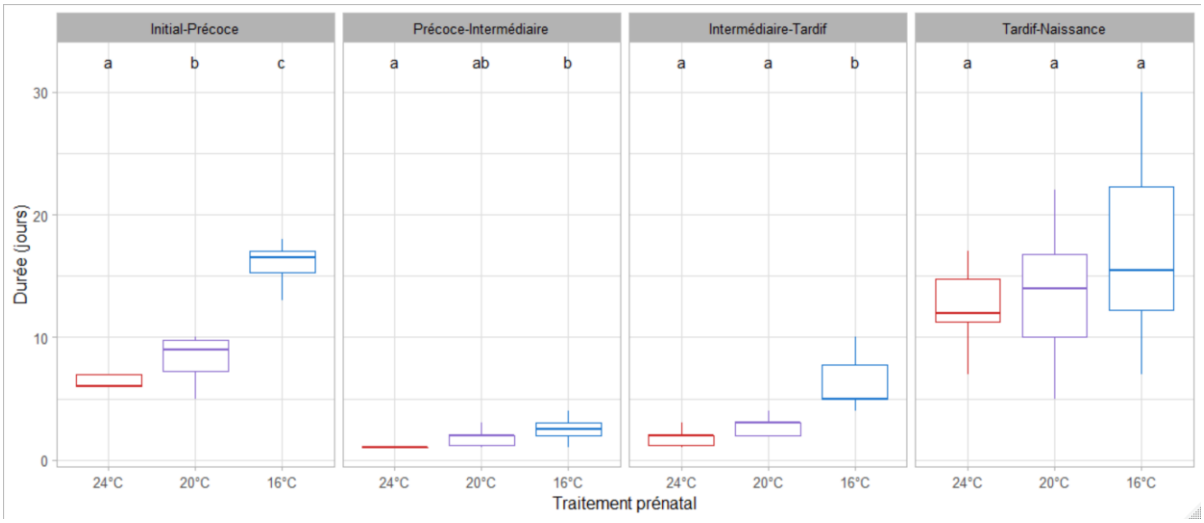


Figure 58. Durée de développement des périodes initial-précoce, précoce-intermédiaire, intermédiaire-tardif, tardif-naissance en fonction du traitement prénatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Le traitement postnatal a influencé les durées de développement postnatal, et notamment des périodes naissance-AAP, AAP-AMA, AMA-sortie et sortie-régression (ANOVA, p<0.001 ; Figure 59). La durée de développement a été 7.7 fois plus longue pour atteindre le stade AAP dans le traitement postnatal à 16°C que dans le traitement à 24°C (test de Tukey, p<0.001 ; Figure 59) et 1.5 fois plus longue dans le traitement à 20°C que dans le traitement prénatal à 24°C (test de Tukey, p=0.01 ; Figure 59). La durée de développement a été 4.5 fois plus longue pour atteindre le stade AMA dans le traitement postnatal à 16°C que dans le traitement à 24°C (test de Tukey, p<0.001 ; Figure 59) et 1.3 fois plus longue dans le traitement à 20°C que dans le traitement prénatal à 24°C, bien que la différence ne soit pas significative (test de Tukey, p=0.38 ; Figure 59). La durée de développement a été 2.4 fois plus longue pour atteindre le stade sortie dans le traitement postnatal à 16°C que dans le traitement à 24°C (test de Tukey, p<0.001 ; Figure 59) et 1.4 fois plus longue dans le traitement à 20°C que dans le traitement prénatal à 24°C (test de Tukey, p=0.01 ; Figure 59). La durée de développement a été 2.1 fois plus longue pour atteindre le stade régression dans le traitement postnatal à 16°C que dans le traitement à 24°C (test de Tukey, p<0.001 ; Figure 59). La durée de développement n'a pas différé entre le traitement à 20°C et le traitement prénatal à 24°C pour atteindre le stade régression (test de Tukey, p=0.98 ; Figure 59). L'effet du traitement postnatal sur les durées de développement ne semble donc pas non plus linéaire, avec notamment un basculement vers un développement pluriannuel pour les individus se développant dans le traitement thermique postnatal à 16°C.

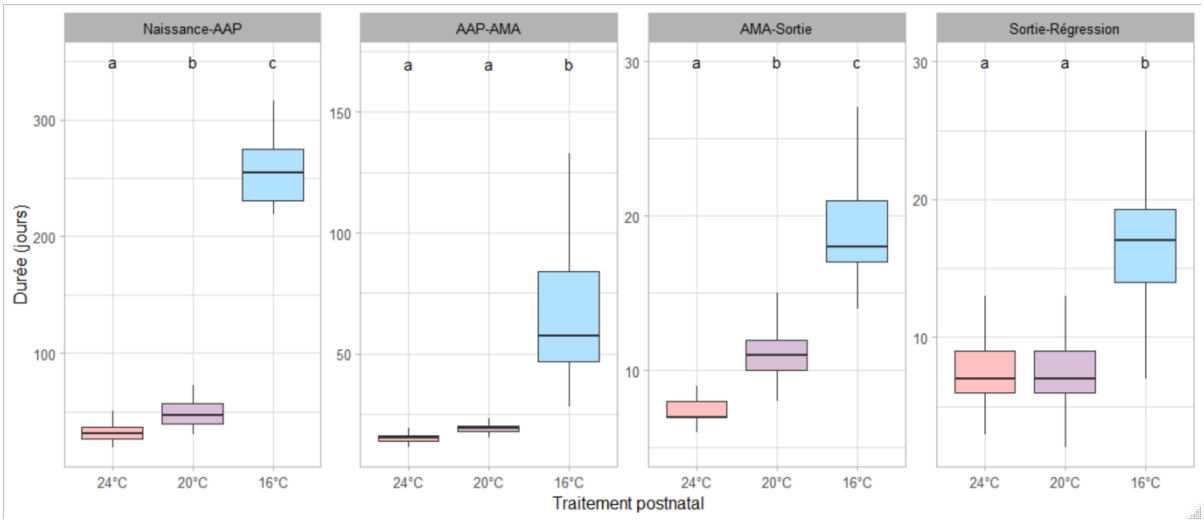


Figure 59. Durée de développement des périodes naissance-AAP, AAP-AMA, AMA-sortie, sortie-régression en fonction du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0.05$). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Une interaction entre le traitement prénatal et postnatal a été détectée pour la durée de la période naissance-AAP (test de chi^2 de Wald, ddl=4, χ^2=39.40, p<0.001 ; Figure 60). Ainsi, au sein des individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 24°C, les individus s'étant développés dans le traitement prénatal à 16°C ont été 1.4 fois plus rapides que ceux s'étant développés dans le traitement prénatal à 24°C (test de Tukey, p=0.002 ; Figure 60). Une compensation positive a également été détectée au sein des individus du traitement postnatal à 20°C (test de Tukey, p=0.003 ; Figure 60). Cependant, les différences n'ont pas été significatives au sein des individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 16°C (test de chi^2 de Wald, ddl=2, χ^2=0.47, p=0.79 ; Figure 60).

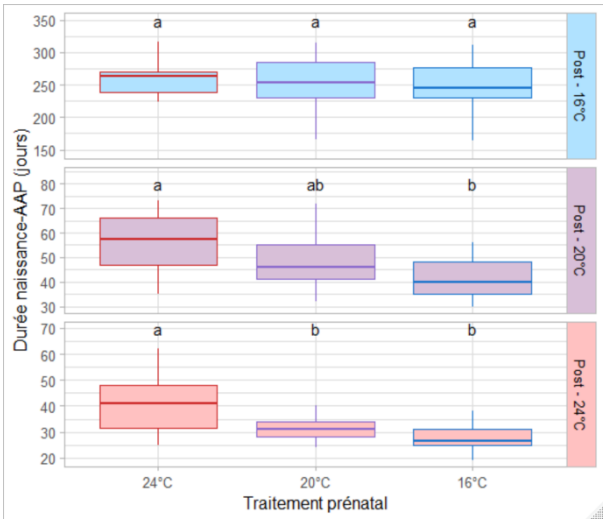


Figure 60. Durée de développement pour la période naissance-AAP en fonction du traitement prénatal, par groupe de traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0.05$). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Les conditions thermiques prénatales ont donc eu un fort effet non seulement sur la durée de développement prénatal mais aussi postnatal (Figure 58 ; Figure 60). Les conditions thermiques postnatales ont également eu un fort effet sur la durée de développement postnatal (Figure 59). Enfin, le traitement prénatal semble avoir eu un effet sur les durées de développement total, puisqu'au sein des groupes de traitements postnataux à 24°C et à 16°C, les individus s'étant développés le plus rapidement sont ceux du traitement prénatal à 20°C (Figure 61). Les effets du traitement prénatal semblent donc persistants.

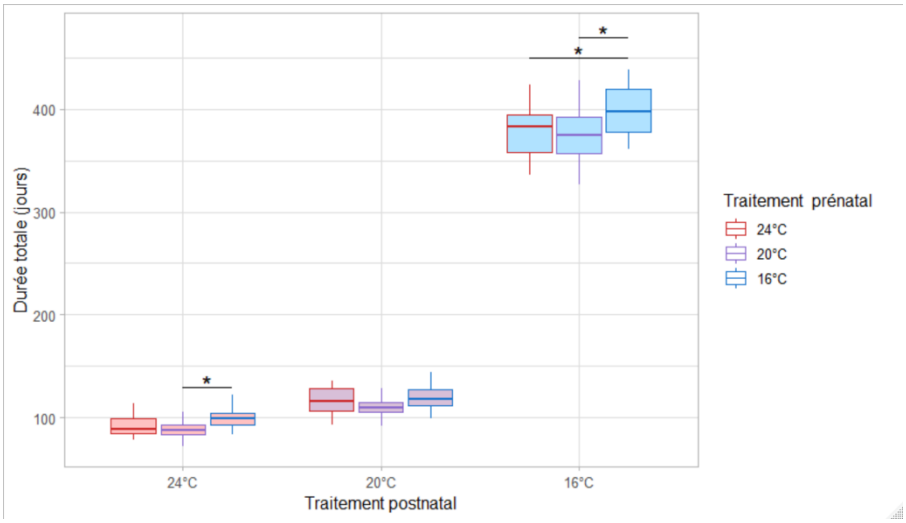


Figure 61. Durée de développement totale (initial-régression) en fonction des traitements pré et postnataux. Le contour des boites à moustaches symbolise le traitement prénatal : en rouge le traitement à 24°C, en violet le traitement à 20°C et en bleu le traitement à 16°C. Le remplissage des boites à moustaches symbolise le traitement postnatal : en saumon le traitement à 24°C, en parme le traitement à 20°C et en bleu ciel le traitement à 16°C. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Effet de covariable

Outre l'effet du traitement prénatal, la fréquence cardiaque semble avoir un effet sur les durées de développement. En effet, bien que le traitement prénatal n'ait pas influencé significativement la période tardif-naissance lorsque testé comme variable seule, un effet d'interaction entre traitement prénatal et fréquence cardiaque mesurée au stade tardif a été mis en évidence (ANOVA, $F_{(2\text{-}24)}$=4.57, p=0.02 ; Figure 62). Cet effet est également retrouvé pour la période intermédiaire-tardif, bien que marginal (ANOVA, $F_{(2,24)}$=3.23, p=0.06).

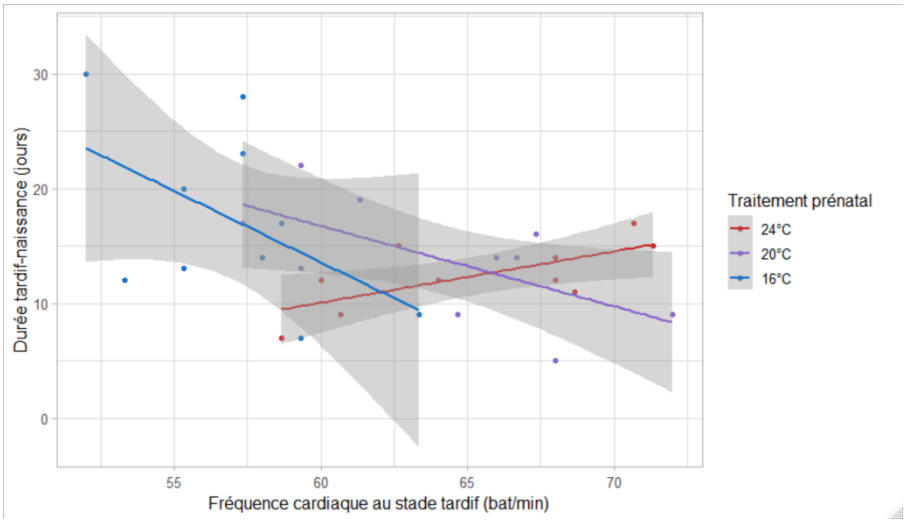


Figure 62. Durée de développement pour la période tardif-naissance en fonction de la fréquence cardiaque mesurée au stade tardif et du traitement prénatal.
En rouge est représenté le traitement prénatal à 24°C, en violet à 20°C et en bleu à 16°C. Les droites représentent les régressions linéaires ajustées et les surfaces grisées les intervalles de confiance à 95%.

b. Phénotype

Morphologie

Effet traitement. Aucun effet du traitement prénatal n'a été mis en évidence sur la morphologie à la naissance, et ce pour tous les paramètres confondus (test de chi2 de Wald, p>0.22). Le traitement postnatal a influencé la longueur totale tout au long du développement postnatal (test de chi2 de Wald, p<0.001 ; Figure 63). En effet, au stade AAP, les individus du traitement postnatal à 16°C ont présenté une longueur totale significativement plus grande que les individus du traitement postnatal à 20°C et à 24°C (tests de Tukey, p<0.001 ; Figure 63). Aux stades AMA, sortie et régression, les individus du traitement postnatal à 16°C étaient significativement plus grands (tests de Tukey, p<0.002 ; Figure 63).

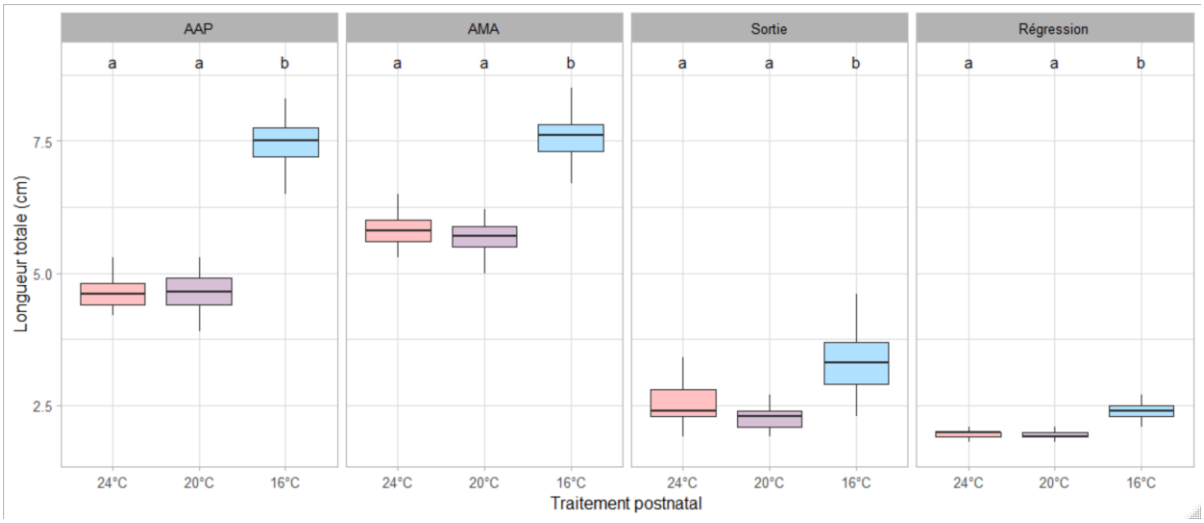


Figure 63. Longueur totale en fonction du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Le traitement postnatal a également influencé les proportions corporelles des larves, et notamment la longueur museau-cloaque relative à la longueur totale et la largeur relative à la longueur totale tout au long du développement postnatal (test de chi^2 de Wald, p<0.001 ; Figure 64 ; Figure 65). Aux stades AAP, les individus du traitement postnatal à 24°C ont montré une longueur museau-cloaque relative à la longueur totale plus élevée que celle des individus du traitement postnatal à 20°C (test de Tukey, p=0.03 ; Figure 64). Aux stades AAP et AMA, les individus du traitement postnatal à 24°C ont montré une largeur de corps relative à la longueur totale plus élevée que celle des individus du traitement postnatal à 20°C (tests de Tukey, p=0.03 ; Figure 65). Au stade sortie, ce sont les individus du traitement postnatal à 16°C qui ont montré une longueur museau-cloaque relative à la longueur totale et une largeur relative à la longueur

totale plus élevée que les individus des traitements postnataux à 24°C et à 20°C (tests de Tukey, p<0.002 ; Figure 64 ; Figure 65).

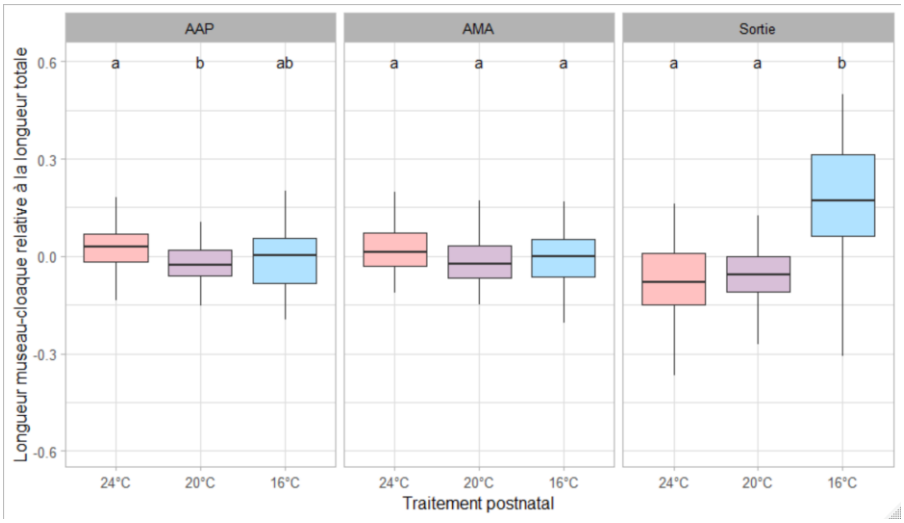


Figure 64. Longueur museau-cloaque relative à la longueur totale en fonction du traitement postnatal. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

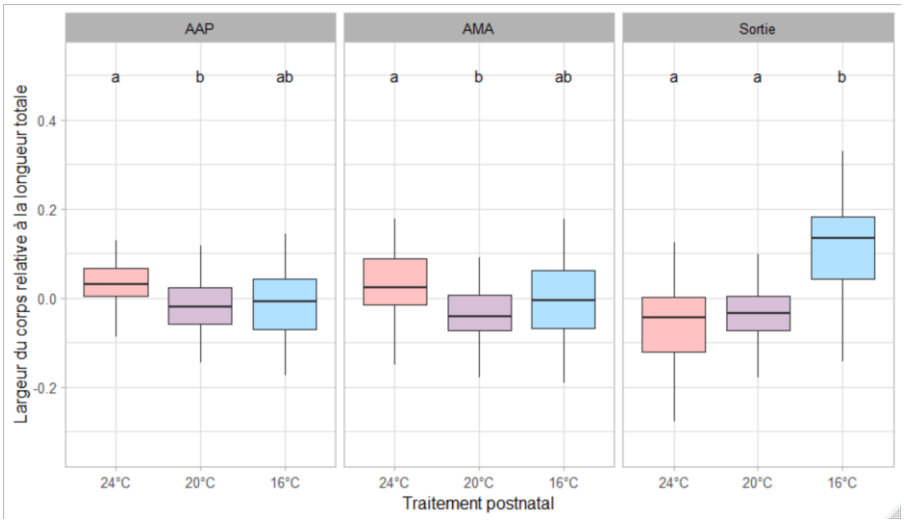


Figure 65. Largeur du corps relative à la longueur totale en fonction du développement postnatal. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

La masse au stade sortie et régression a été influencée par le traitement postnatal (tests de chi^2 de Wald, p<0.001 ; Figure 66). Comme pour la longueur totale, les individus du traitement postnatal à 16°C étaient significativement plus lourds (tests de Tukey, p<0.001 ; Figure 66). Leur condition corporelle (masse relative à la longueur totale) était également supérieure au stade sortie à celle des individus du traitement postnatal à 20°C et 24°C (tests de Tukey,

p<0.002) et marginalement supérieure à celle des individus du traitement postnatal à 24°C au stade régression (test du Tukey, p=0.05). De plus, les individus du traitement postnatal à 20°C étaient significativement plus légers au stade sortie (tests de Tukey, p<0.04 ; Figure 66), mais leur condition corporelle n'était pas significativement différente de celle des individus du traitement postnatal à 24°C (test de Tukey, p=0.33).

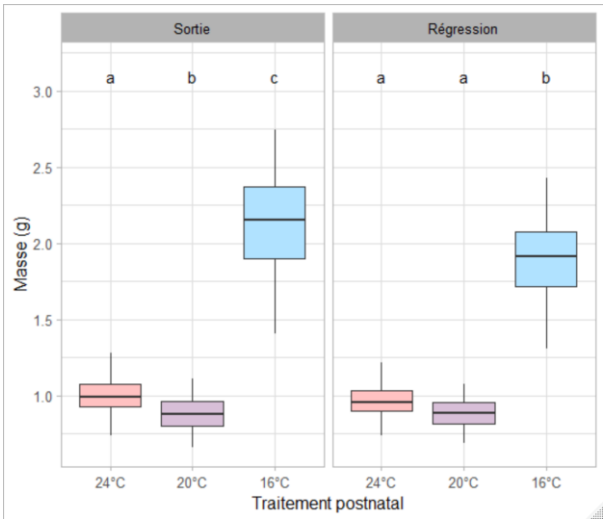


Figure 66. Masse en fonction du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Les individus du traitement postnatal à 16°C ont donc été caractérisés par une taille, une masse, ainsi qu'une condition corporelle supérieures, au stade sortie (Figure 63 ; Figure 66). Les individus du traitement postnatal à 24°C ont présenté une organisation morphologique différente avec un corps relativement plus long et plus large par rapport à la longueur totale aux stades AAP et AMA (Figure 64 ;Figure 65). Au stade sortie, ce sont les individus du traitement postnatal à 16°C qui ont présenté cette organisation morphologique différente (Figure 64 ;Figure 65).

En plus des différences morphométriques, une différence de latéralisation du premier membre antérieur sorti en fonction du traitement postnatal a été constatée (test du chi^2 de Pearson, ddl=2, χ^2=6.53, p=0.04 ; Figure 67). En effet, la proportion a été d'environ 50-50 pour les individus des traitements postnataux à 24°C et à 16°C, mais de 80-20 pour les individus du traitement postnatal à 20°C, avec une majorité d'individus pour lesquels le membre antérieur gauche a émergé en premier (Figure 67).

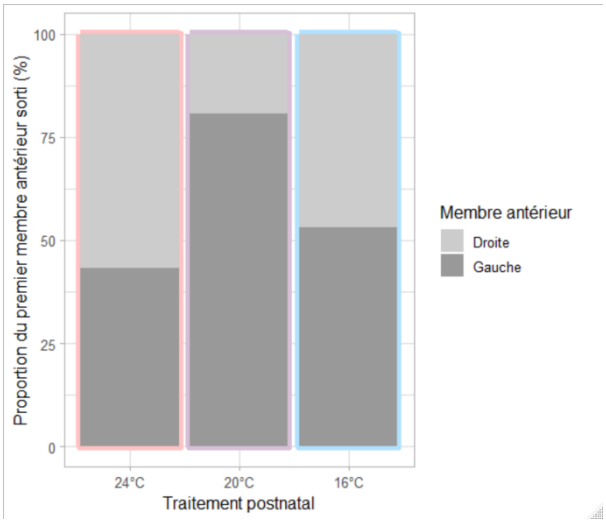


Figure 67. Proportion du premier membre antérieur sorti en fonction de la latéralité et du traitement postnatal. En foncé est représentée la proportion d'individus dont le membre antérieur gauche est sorti en premier, en clair la proportion d'individus dont le membre antérieur droit est sorti en premier.

Enfin, le traitement postnatal a eu un effet sur la vitesse de régression de la queue (test du chi^2 de Wald, ddl=2, χ^2=28.26, p<0.001), avec les individus du traitement postnatal à 24°C présentant une vitesse de régression supérieure à ceux des traitements à 20°C et à 16°C (tests de Tukey, p<0.03 ; Figure 68).

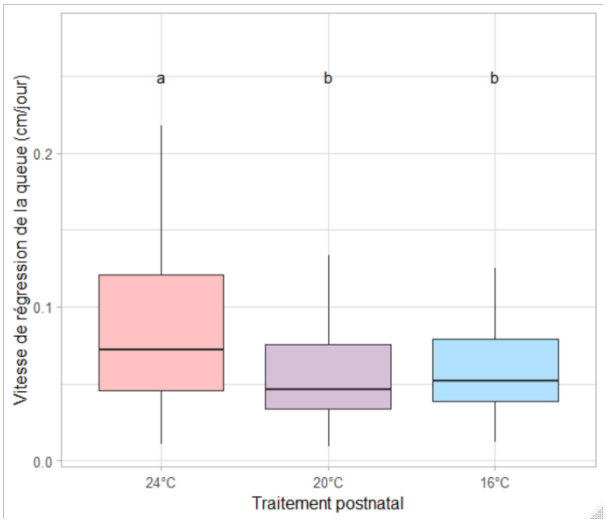


Figure 68. Vitesse de régression de la queue en fonction du traitement postnatal. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Effet covariable. Alors que le traitement prénatal n'a pas eu d'effet sur la taille corporelle à la naissance, un effet de la taille moyenne des œufs au stade initial a été constaté (test de chi^2 de Wald, ddl=1, χ^2=11.32, p<0.001 ; Figure 69). Ainsi, plus la taille moyenne des œufs au stade initial était élevée, plus la taille corporelle à la naissance des têtards était importante (Figure 69).

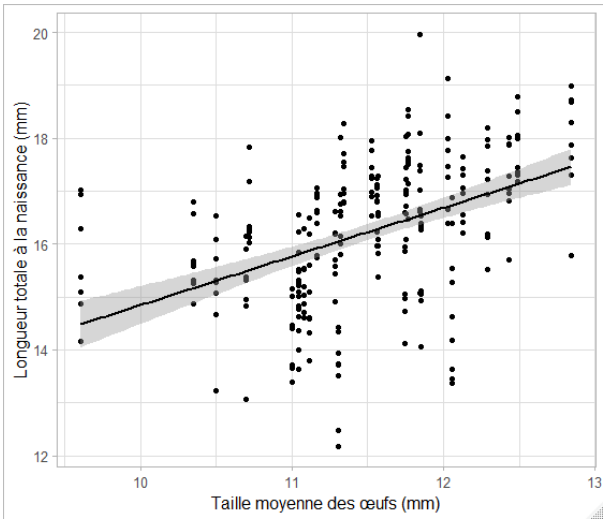


Figure 69. Longueur totale en fonction de la taille moyenne des œufs au stade initial.
La droite représente la régression linéaire ajustée et la surface grisée l'intervalle de confiance à 95%.

Physiologie

Effet traitement. Pendant le développement prénatal, le traitement prénatal a impacté la fréquence cardiaque (ANOVA, $p<0.008$; Figure 70). Quel que soit le stade de développement, les individus s'étant développés dans le traitement prénatal à 24°C ont présenté une fréquence cardiaque supérieure à ceux s'était développés dans le traitement prénatal à 16°C (tests de Tukey, $p<0.006$; Figure 70). A la naissance, l'effet du traitement prénatal a été maintenu (test de chi^2 de Wald, ddl=2, $\chi^2=1.84$, $p=0.004$), mais les individus s'étant développés dans le traitement prénatal à 16°C ont alors présenté une fréquence cardiaque supérieure à ceux s'étant développés dans le traitement prénatal à 24°C (Figure 70).

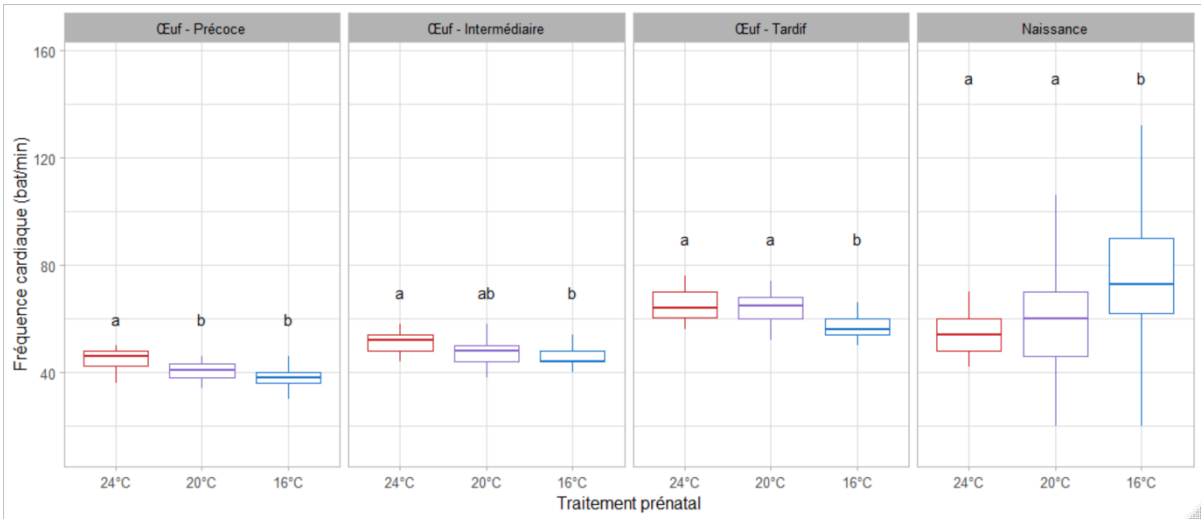


Figure 70. Fréquence cardiaque en fonction du traitement prénatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0.05$). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Pendant le développement postnatal, le traitement postnatal a impacté la fréquence cardiaque à tous les stades, sauf au stade AAP (test du chi^2 de Wald, p<0.001 ;Figure 71). Aux stades AMA, sortie et régression, les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 16°C ont présenté une fréquence cardiaque plus basse que les individus s'étant développés dans les traitements postnataux à 20°C (tests du chi^2 de Wald, p<0.047 ; Figure 71). Aux stades AMA et sortie, la fréquence cardiaque des individus du traitement postnatal à 16°C était également plus basse que ceux du traitement postnatal à 24°C (tests de Tukey, p<0.02 ; Figure 71).

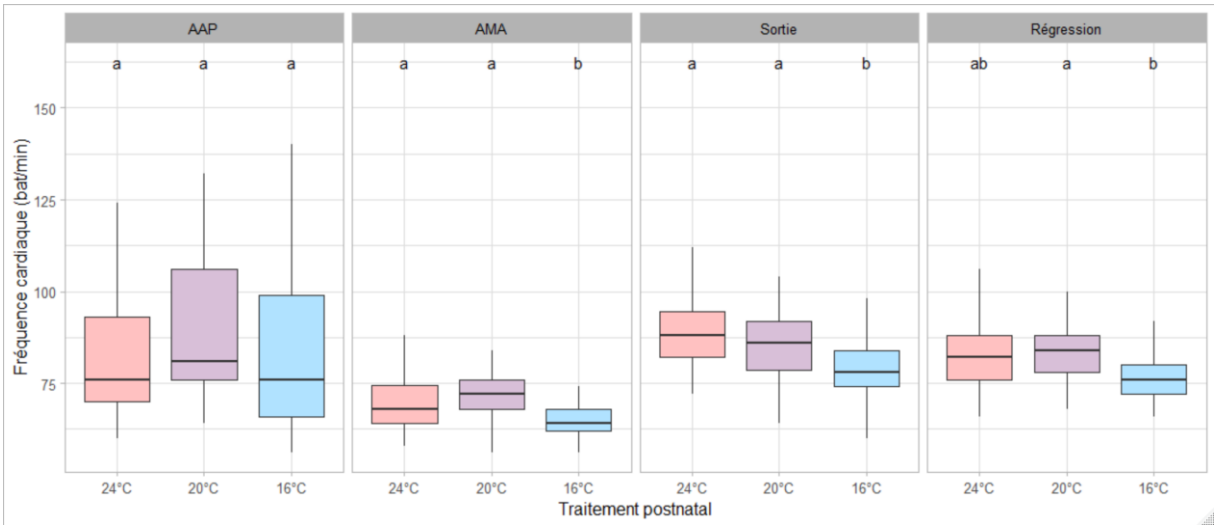


Figure 71. Fréquence cardiaque en fonction du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Seules les lettres d'un même panneau peuvent être comparées. Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Effet covariable. Outre l'effet du traitement prénatal sur la fréquence cardiaque, la covariable taille de ponte (nombre d'œufs par mâle) a impacté le profil cardiaque (moyenne de la fréquence cardiaque mesurée aux trois stades de référence du développement prénatal) (ANOVA, $F_{(1,27)}$ = 8.55, p-value = 0.007 ; Figure 72). En effet, plus la taille de ponte était importante et plus le profil cardiaque des œufs de la ponte était bas (Figure 72).

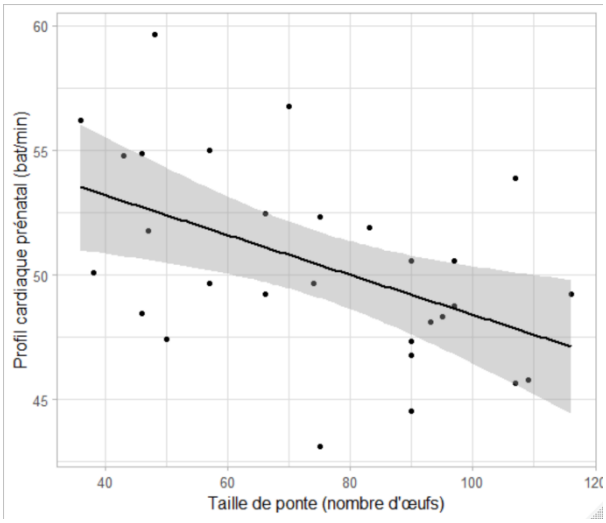


Figure 72. Profil cardiaque prénatal en fonction de la taille de ponte (nombre d'œufs par mâle). La droite représente la régression linéaire ajustée et la surface grisée l'intervalle de confiance à 95%.

De plus, la fréquence cardiaque à la naissance a aussi été influencée par la covariable longueur totale à la naissance (test de chi^2 de Wald, ddl=1, χ^2=4.34, p=0.04), les individus plus grands présentant un rythme cardiaque plus faible (Figure 73).

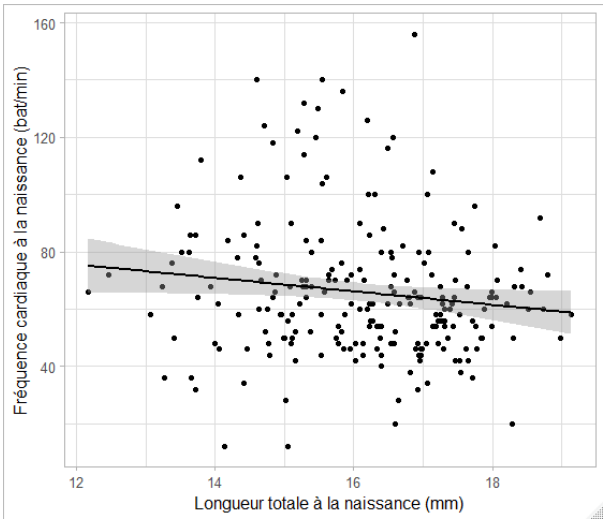


Figure 73. Fréquence cardiaque à la naissance en fonction de la longueur totale à la naissance. La droite représente la régression linéaire ajustée et la surface grisée l'intervalle de confiance à 95%.

c. Performances

Performances de nage.

Effet traitement. Aucune différence de performances de nage en fonction du traitement prénatal n'a été mise en évidence au stade naissance (tests de chi^2 de Wald, p>0.13). Au stade AAP, le traitement postnatal a influencé les performances de nage (tests de chi^2 de Wald, p<0.001). Les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 24°C ont présenté des performances de nage plus élevées que ceux s'étant développés dans le traitement postnatal à

16°C, et ce pour le taux de mobilité (test de Tukey, p=0.002 ; Figure 74), la distance totale parcourue (test de Tukey, p=0.01 ; Figure 75) et la vitesse moyenne en déplacement (test de Tukey, p=0.01 ; Figure 76).

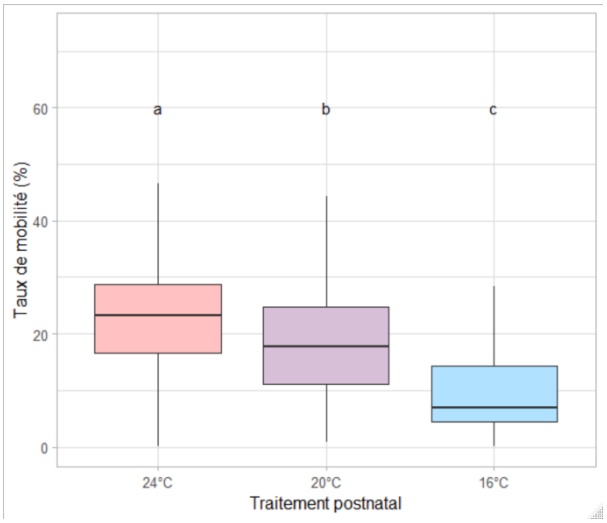


Figure 74. Taux de mobilité au stade AAP en fonction du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

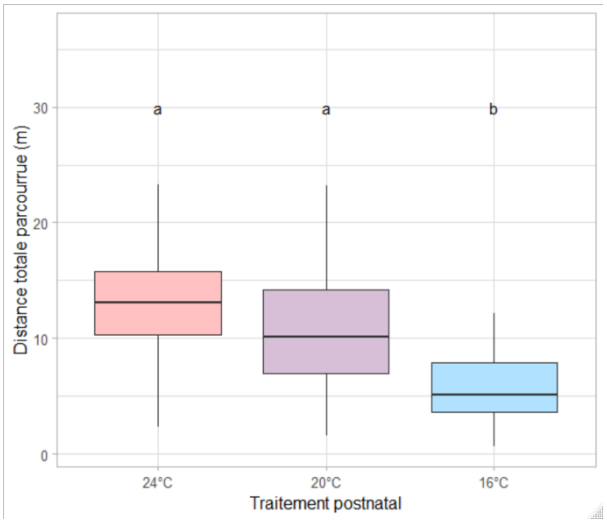


Figure 75. Distance totale parcourue au stade AAP en fonction du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

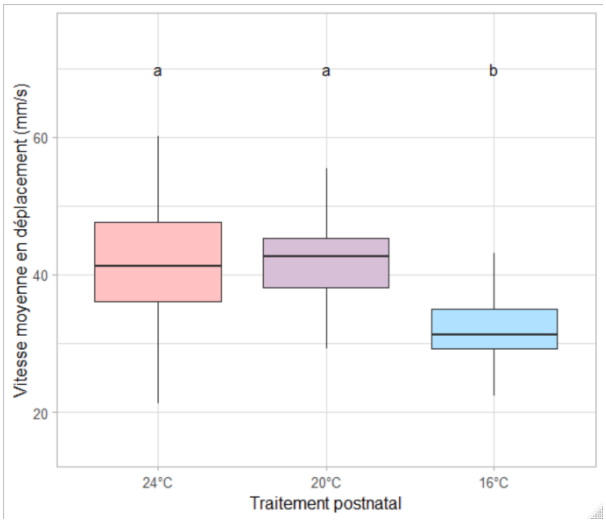


Figure 76. Vitesse moyenne en déplacement au stade AAP en fonction du traitement postnatal. Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0.05$). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Effet covariable. Au stade naissance, la fréquence cardiaque n'a pas été corrélée au taux de mobilité (test de chi^2 de Wald, ddl=1, χ^2=2.91, p=0.08), ni à la distance totale parcourue (test de chi^2 de Wald, ddl=1, χ^2=1.94, p=0.16), mais a été positivement liée à la vitesse moyenne en déplacement (test de chi^2 de Wald, ddl=1, χ^2=4.57, p=0.16). Les individus présentant une fréquence cardiaque plus élevée à la naissance ont ainsi obtenu une vitesse moyenne en déplacement à la naissance plus élevée. Au contraire, au stade AAP, la fréquence cardiaque a été positivement liée au taux de mobilité (tests de chi^2 de Wald, $p<0.007$; Figure 77) et à la distance totale parcourue (test de chi^2 de Wald, $p<0.002$; Figure 78) mais pas à la vitesse moyenne en déplacement (test de chi^2 de Wald, ddl=1, χ^2=0.53, p=0.46).

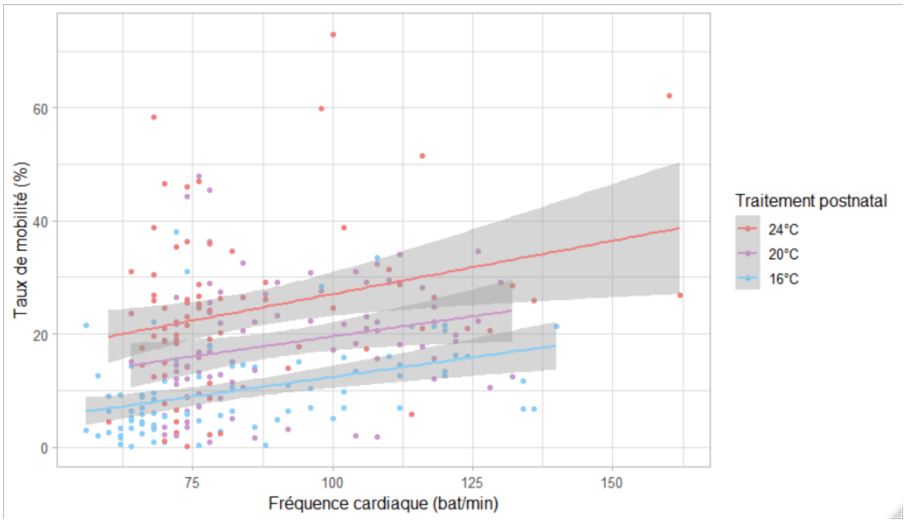


Figure 77. Taux de mobilité au stade AAP en fonction de la fréquence cardiaque au stade AAP et du traitement postnatal.
En saumon sont représentés les individus du traitement postnatal à 24°C, en mauve ceux du traitement postnatal à 20°C et en bleu ciel ceux du traitement postnatal à 16°C. Les droites représentent les régressions linéaires ajustées et les surfaces grisées les intervalles de confiance à 95%.

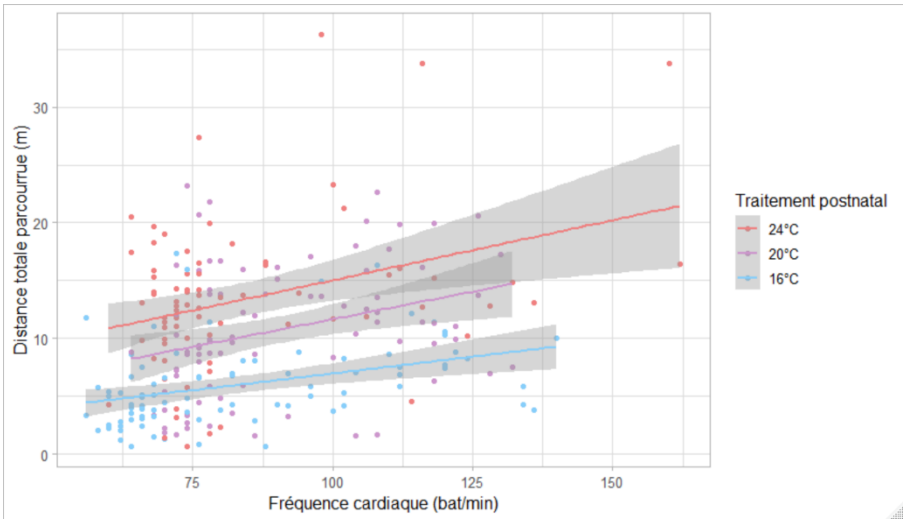


Figure 78. Distance totale parcourue au stade AAP en fonction de la fréquence cardiaque au stade AAP et du traitement postnatal.
En saumon sont représentés les individus du traitement postnatal à 24°C, en mauve ceux du traitement postnatal à 20°C et en bleu ciel ceux du traitement postnatal à 16°C. Les droites représentent les régressions linéaires ajustées et les surfaces grisées les intervalles de confiance à 95%.

Préférences thermiques

Le traitement postnatal a également modifié les préférences thermiques au stade régression (test du chi^2 de Wald, ddl=2, χ^2=15.63, p<0.001), les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 20°C présentant des préférences thermiques plus élevées que ceux du traitement postnatal à 16°C (test de Tukey, p=0.04 ; Figure 79).

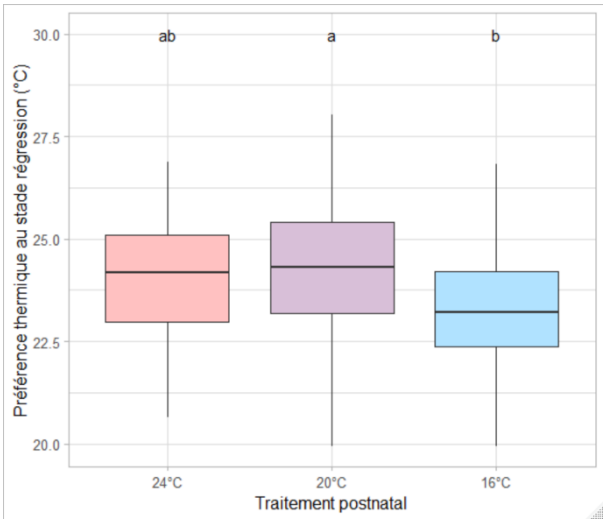


Figure 79. Préférences thermiques au stade régression en fonction du traitement postnatal. Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0.05$). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

d. Mesures un mois après la métamorphose

Morphologie

L'effet du traitement postnatal sur la morphologie a été maintenu après un mois, suivant la métamorphose, passé dans des conditions similaires (tests du chi^2 de Wald, $p<0.02$). En effet, les individus du traitement postnatal à 16°C ont présenté une longueur totale et une masse supérieures à ceux des traitements postnataux à 24°C et à 20°C (tests du Tukey, $p<0.001$). Leur condition corporelle était supérieure à celle des individus du traitement postnatal à 24°C (test du Tukey, $p=0.01$). Cependant, les individus s'étant développés dans le traitement à 20°C n'étaient plus différents de ceux s'étant développés dans le traitement postnatal à 24°C, contrairement à ce qui a été observé au stade régression (tests du Tukey, $p>0.06$).

Physiologie

L'effet du traitement postnatal sur la physiologie a également été maintenu (test du chi^2 de Wald, ddl=2, $\chi^2=12.89$, $p=0.002$; Figure 80). En effet, les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 16°C avaient des fréquences cardiaques mesurées à 20°C plus faibles que ceux s'étant développés dans le traitement à 24°C (test de Tukey, $p=0.02$; Figure 80). Ces différences n'étaient pas significatives à 24°C (tests du Tukey, $p>0.11$; Figure 80).

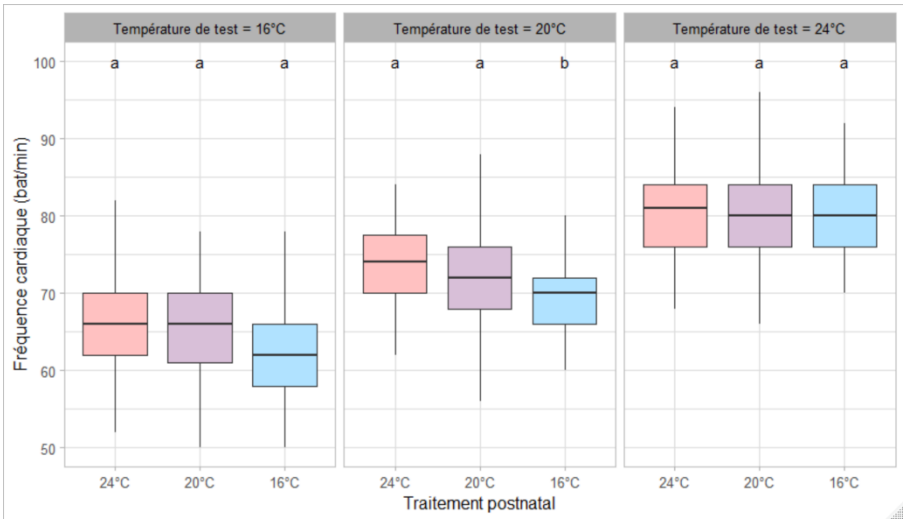


Figure 80. Fréquence cardiaque mesurée un mois après la métamorphose en fonction du traitement postnatal et de la température de test.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

De plus, la température de test a impacté positivement la fréquence cardiaque (test du chi^2 de Wald, ddl=2, χ^2=870.80, p<0.001 ; Figure 81).

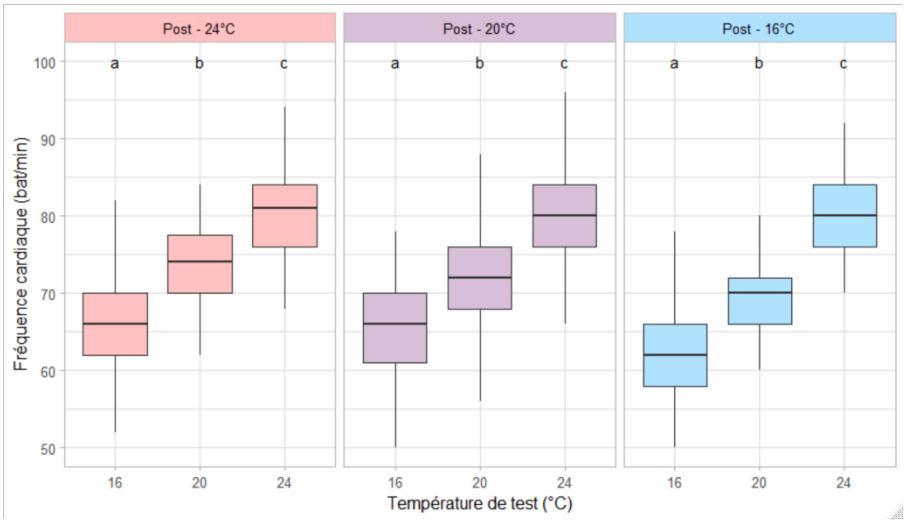


Figure 81. Fréquence cardiaque mesurée un mois après la métamorphose en fonction de la température de test et du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Saut

L'effet du traitement postnatal a également été persistant au niveau des performances de locomotion et notamment sur les distances de saut (test du chi^2 de Wald, dd=2, χ^2=71.84, p<0.001 ; Figure 82). En effet, d'une manière générale, les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 20°C ont présenté des distances de saut inférieures à ceux des

traitements à 24°C et à 16°C (tests du Tukey, p<0.02 ; sauf au cours des mesures réalisées à 24°C où la différence n'a pas été significative entre les individus du traitement postnatal 16°C et ceux du traitement postnatal à 20°C, p=0.12 ; Figure 82).

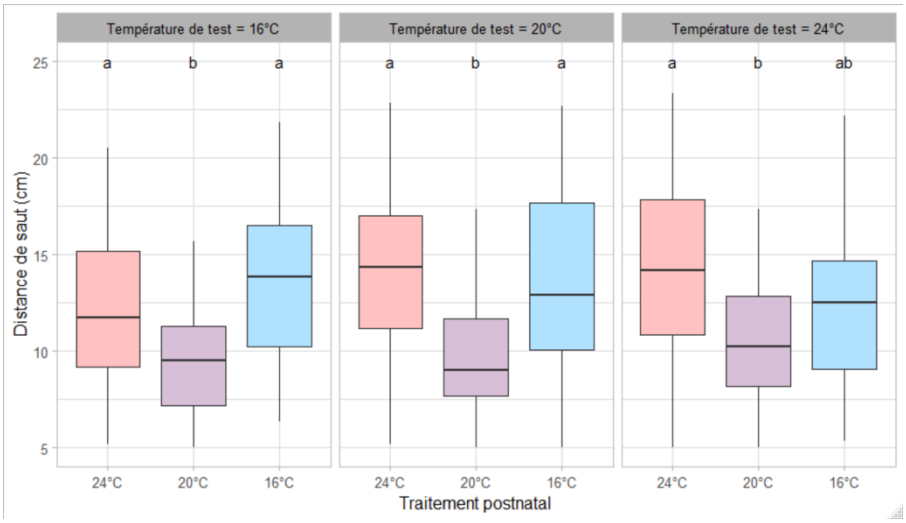


Figure 82. Distance de saut mesurée un mois après la métamorphose en fonction du traitement postnatal et de la température de test.
Des lettres différentes indiquent une différence significative (p<0.05). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

De plus, la température de test a également impacté la distance de saut et ce en interaction avec le traitement postnatal (test du chi^2 de Wald, ddl=4, χ^2=33.53, p<0.001 ; Figure 83). Les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 24°C ont ainsi présenté des performances plus faibles lorsqu'ils ont été testés à 16°C (tests de Tukey, p<0.001) alors que ceux du traitement postnatal à 16°C ont présenté des performances plus faibles lorsqu'ils ont été testés à 24°C (tests de Tukey, p<0.04 ; Figure 83).

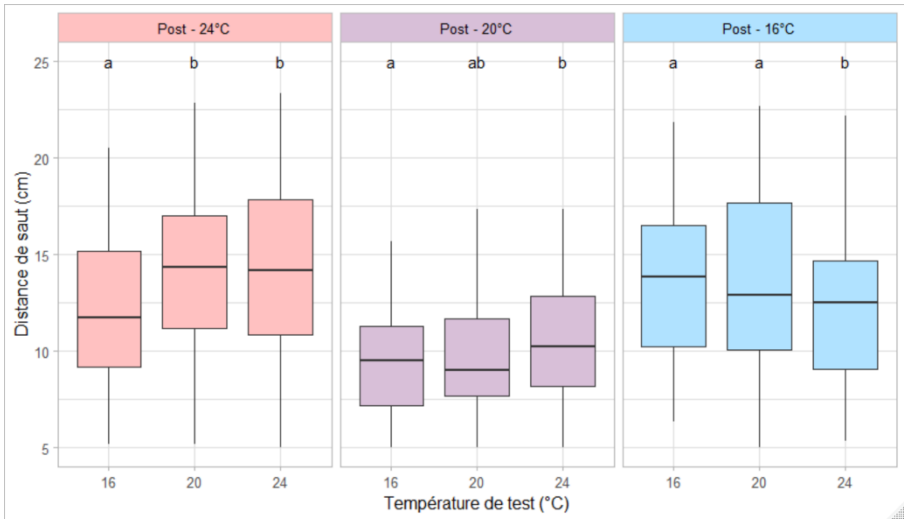


Figure 83. Distance de saut mesurée un mois après la métamorphose en fonction de la température de test et du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0.05$). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane.

Préférences thermiques

L'effet du traitement postnatal sur les préférences thermiques a également été conservé (test du chi^2 de Wald, ddl=2, χ^2=31.16, $p<0.001$; Figure 84). Les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 20°C ont présenté des préférences thermiques plus élevées que ceux des traitements postnataux à 24°C et à 16°C (test de Tukey, $p<0.003$; Figure 84).

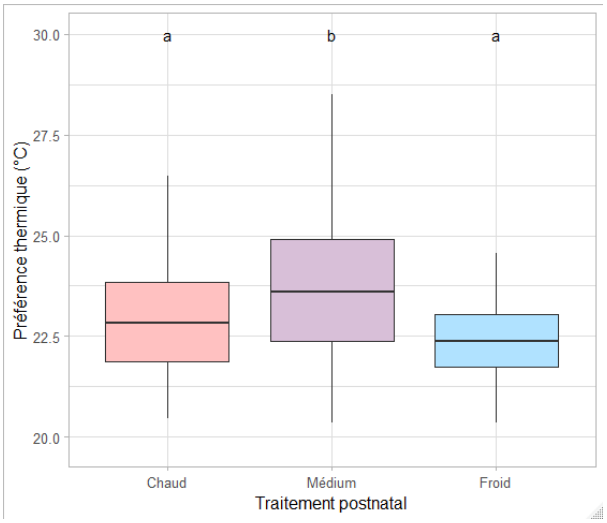


Figure 84. Préférences thermiques mesurées un mois après la métamorphose en fonction du traitement postnatal.
Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0.05$). Les encadrés représentent l'intervalle entre le premier et le troisième quartile et les moustaches représentent la répartition de 95% des valeurs. Les lignes horizontales au milieu des encadrés représentent la médiane

.

Tableau 2. Tableau de synthèse des résultats aux analyses statistiques du chapitre III.
FC : fréquence cardiaque ; Tukey[1] : les résultats à ces tests de Tukey sont ceux obtenus sur un modèle avec le paramètre testé comme effet fixe (i.e., sans effet d'interaction).

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Durée de développement									
ANOVA (type II)	Durée $_{\text{Initial-Précoce}}$	Prénatal	2 - 27	102.34	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-3.29	**0.007**
							24°C-16°C	-13.70	**<0.001**
							20°C-16°C	-10.41	**<0.001**
ANOVA (type II)	Durée $_{\text{Précoce-Intermédiaire}}$	Prénatal	2 - 27	12.03	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-2.45	0.05
							24°C-16°C	-4.91	**<0.001**
							20°C-16°C	-2.45	0.05
ANOVA (type III)	Durée $_{\text{Intermédiaire-Tardif}}$	(Intercept)	1 - 24	0.18	0.68	-	-	-	-
		Prénatal	2 - 24	4.50	**0.02**	Tukey[1]	24°C-20°C	-1.63	0.25
							24°C-16°C	-7.17	**<0.001**
							20°C-16°C	-5.54	**<0.001**
		FC $_{\text{Intermédiaire}}$	1 - 24	0.006	0.94	-	-	-	-
		Prénatal*FC $_{\text{Intermédiaire}}$	2 - 24	3.23	0.06	-	-	-	-
ANOVA (type III)	Durée $_{\text{Tardif-Naissance}}$	(Intercept)	1 - 24	0.52	0.48	-	-	-	-
		Prénatal	2-24	4.70	**0.02**	Tukey[1]	24°C-20°C	-0.55	0.85
							24°C-16°C	-1.94	0.15
							20°C-16°C	-1.39	0.36
		FC $_{\text{Intermédiaire}}$	1 - 24	1.59	0.22	-	-	-	-
		Prénatal*FC $_{\text{Intermédiaire}}$	2 - 24	4.57	**0.02**	-	-	-	-
ANOVA (type II)	Durée $_{\text{Initial-Naissance}}$	Prénatal	2-27	47.71	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-2.51	**0.047**
							24°C-16°C	-9.43	**<0.001**
							20°C-16°C	-6.92	**<0.001**

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Chi² de Wald (type III)	Durée $_{\text{Naissance-AAP (log)}}$	(Intercept)	1	5720.57	**<0.001**	-	-	-	-
		Prénatal	2	26.33	**<0.001**	-	-	-	-
		Postnatal	2	2627.58	**<0.001**	Tukey[1]	24°C-20°C	-5.43	**0.01**
							24°C-16°C	-29.34	**<0.001**
							20°C-16°C	-23.93	**<0.001**
		Prénatal*Postnatal	4	39.40	**<0.001**	(Voir modèles sur sous-groupes ci-dessous)			
Chi² de Wald (type II)	Durée $_{\text{Naissance-AAP (log)}}$ - Postnatal 24°C	Prénatal	2	15.97	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	2.72	**0.03**
							24°C-16°C	3.90	**0.002**
							20°C-16°C	1.18	0.47
Chi² de Wald (type II)	Durée $_{\text{Naissance-AAP (log)}}$ - Postnatal 20°C	Prénatal	2	13.20	**0.001**	Tukey	24°C-20°C	1.97	0.14
							24°C-16°C	3.63	**0.003**
							20°C-16°C	1.66	0.24
Chi² de Wald (type II)	Durée $_{\text{Naissance-AAP (log)}}$ - Postnatal 16°C	Prénatal	2	0.47	0.79	-	-	-	-
ANOVA (type II)	Durée $_{\text{AAP-AMA}}$	Postnatal	2	508.10	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	1.51	0.38
							24°C-16°C	20.05	**<0.001**
							20°C-16°C	18.98	**<0.001**
ANOVA (type II)	Durée $_{\text{AMA-Sortie}}$	Postnatal	2	292.42	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	5.03	**0.01**
							24°C-16°C	16.65	**<0.001**
							20°C-16°C	11.71	**<0.001**
ANOVA (type II)	Durée $_{\text{Sortie-Régression}}$	Postnatal	2	218.89	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-0.18	0.98
							24°C-16°C	12.67	**<0.001**
							20°C-16°C	13.04	**<0.001**

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
ANOVA (type II)	Durée $_{\text{Naissance-Régression}}$	Postnatal	2	6970.30	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	5.82	**0.01**
							24°C-16°C	74.91	**<0.001**
							20°C-16°C	69.74	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Durée totale $_{\text{Initial-Régression}}$	(Intercept)	1	280.49	**<0.001**	-	-	-	-
		Prénatal	2	0.59	0.75	-	-	-	-
		Postnatal	2	197.90	**<0.001**	Tukey[1]	24°C-20°C	5.83	**0.01**
							24°C-16°C	75.21	**<0.001**
							20°C-16°C	70.05	**<0.001**
		Prénatal*Postnatal	4	0.35	0.99	(Voir modèles sur sous-groupes ci-dessous)			
Chi^2 de Wald (type II)	Durée $_{\text{Initial-Régression}}$ - Postnatal 24°C	Prénatal	2	9.38	**0.009**	Tukey	24°C-20°C	0.89	0.65
							24°C-16°C	-2.08	0.11
							20°C-16°C	-2.98	**0.02**
Chi^2 de Wald (type II)	Durée $_{\text{Initial-Régression}}$ - Postnatal 20°C	Prénatal	2	2.13	0.35	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Durée $_{\text{Initial-Régression}}$ - Postnatal 16°C	Prénatal	2	9.30	**0.01**	Tukey	24°C-20°C	0.03	0.99
							24°C-16°C	-2.63	**0.03**
							20°C-16°C	-2.65	**0.03**
Phénotypie - Morphologie									
Chi^2 de Wald (type II)	Longueur totale $_{\text{Naissance}}$	Prénatal	2	0.35	0.84	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Longueur totale $_{\text{AAP}}$	Postnatal	2	4907.3	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	1.34	0.45
							24°C-16°C	60.67	**<0.001**
							20°C-16°C	60.53	**<0.001**

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus SVL/Longueur totale $_{AAP}$	Postnatal	2	18.65	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-4.29	**0.03**
							24°C-16°C	-2.57	0.12
							20°C-16°C	1.72	0.31
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus largeur/Longueur totale $_{AAP}$	Postnatal	2	18.00	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-4.16	**0.03**
							24°C-16°C	-2.80	0.10
							20°C-16°C	1.35	0.44
Chi^2 de Wald (type II)	Longueur totale $_{AMA}$	Postnatal	2	2469.80	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-3.52	0.05
							24°C-16°C	40.71	**<0.001**
							20°C-16°C	45.17	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus SVL/Longueur totale $_{AMA}$	Postnatal	2	7.58	**0.02**	Tukey	24°C-20°C	-2.63	0.12
							24°C-16°C	-2.04	0.21
							20°C-16°C	0.55	0.85
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus largeur/Longueur totale $_{AMA}$	Postnatal	2	17.47	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-4.16	**0.03**
							24°C-16°C	-2.44	0.14
							20°C-16°C	1.7	0.31
Chi^2 de Wald (type II)	Longueur totale $_{Sortie}$	Postnatal	2	154.67	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-2.94	0.09
							24°C-16°C	8.91	**0.002**
							20°C-16°C	11.99	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus SVL/Longueur totale $_{Sortie}$	Postnatal	2	111.93	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	0.87	0.69
							24°C-16°C	9.50	**0.001**
							20°C-16°C	8.83	**0.002**
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus largeur/Longueur totale $_{Sortie}$	Postnatal	2	130.86	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	1.50	0.38
							24°C-16°C	10.49	**<0.001**
							20°C-16°C	9.25	**0.002**

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Chi^2 de Wald (type II)	Longueur totale $_{Régression}$	Postnatal	2	824.83	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-2.24	0.18
							24°C-16°C	23.61	**<0.001**
							20°C-16°C	26.10	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus largeur/Longueur totale $_{Régression}$	Postnatal	2	7.37	**0.03**	Tukey	24°C-20°C	-0.20	0.98
							24°C-16°C	1.69	0.28
							20°C-16°C	2.58	0.17
Chi^2 de Pearson	Sortie du premier membre antérieur	Postnatal	2	6.53	**0.04**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Masse $_{Sortie}$	Postnatal	1868.60	2	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-3.84	**0.04**
							24°C-16°C	34.95	**<0.001**
							20°C-16°C	39.70	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Condition corporelle $_{Sortie}$	Postnatal	139.38	2	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	1.66	0.33
							24°C-16°C	10.87	**0.001**
							20°C-16°C	9.45	**0.002**
Chi^2 de Wald (type II)	Masse $_{Régression}$	Postnatal	1952.80	2	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-2.65	0.12
							24°C-16°C	36.60	**<0.001**
							20°C-16°C	40.49	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Condition corporelle $_{Régression}$	Postnatal	10.87	2	**0.004**	Tukey	24°C-20°C	1.76	0.27
							24°C-16°C	3.14	0.05
							20°C-16°C	1.72	0.34
Chi^2 de Wald (type II)	Vitesse de régression de la queue	Postnatal	28.26	2	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-5.00	**0.02**
							24°C-16°C	-4.06	**0.03**
							20°C-16°C	0.80	0.72
Chi^2 de Wald (type II)	Longueur totale $_{Naissance}$	Taille moyenne des œufs à la capture	1	11.32	**<0.001**	-	-	-	-

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Phénotypie - Physiologie									
ANOVA (type II)	FC $_{Précoce}$	Prénatal	2-27	8.67	**0.001**	Tukey	24°C-20°C	2.48	0.05
							24°C-16°C	4.14	**<0.001**
							20°C-16°C	1.66	0.24
ANOVA (type II)	FC $_{Intermédiaire}$	Prénatal	2 - 27	5.83	**0.008**	Tukey	24°C-20°C	2.13	0.10
							24°C-16°C	3.38	**0.006**
							20°C-16°C	1.25	0.43
ANOVA (type II)	FC $_{Tardif}$	Prénatal	2 - 27	11.27	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	0.56	0.84
							24°C-16°C	4.37	**<0.001**
							20°C-16°C	3.80	**0.002**
Chi^2 de Wald (type II)	FC $_{Naissance}$	Prénatal	2	11.17	**0.004**	Tukey	24°C-20°C	-0.69	0.77
							24°C-16°C	-3.01	**0.02**
							20°C-16°C	-2.59	**0.04**
Chi^2 de Wald (type II)	FC $_{AAP}$	Postnatal	2	1.84	0.40	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	FC $_{AMA}$	Postnatal	2	38.73	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	1.47	0.39
							24°C-16°C	-4.40	**0.02**
							20°C-16°C	-6.01	**0.01**
Chi^2 de Wald (type II)	FC $_{Sortie}$	Postnatal	2	62.22	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-1.85	0.27
							24°C-16°C	-7.52	**0.003**
							20°C-16°C	-5.85	**0.01**
Chi^2 de Wald (type II)	FC $_{Régression}$	Postnatal	2	16.10	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	0.31	0.95
							24°C-16°C	-3.29	0.06
							20°C-16°C	-3.65	**0.047**
ANOVA (type II)	Profil cardiaque	Taille de ponte	1 - 27	8.55	**0.007**	-	-	-	-

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Chi^2 de Wald (type II)	FC $_{Naissance}$	Longueur totale $_{Naissance}$	1	4.34	**0.04**	-	-	-	-
Performances									
Chi^2 de Wald (type II)	Taux de mobilité $_{Naissance}$	Prénatal	2	1.55	0.46	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Distance totale $_{Naissance}$	Prénatal	2	1.22	0.54	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Vitesse moyenne en déplacement $_{Naissance}$	Prénatal	2	4.03	0.13	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Taux de mobilité $_{AAP}$	Postnatal	2	75.85	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-3.60	**0.046**
							24°C-16°C	-8.61	**0.002**
							20°C-16°C	-5.13	**0.02**
Chi^2 de Wald (type II)	Distance totale $_{AAP}$	Postnatal	2	83.10	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-3.14	**0.01**
							24°C-16°C	-8.90	**0.001**
							20°C-16°C	-5.90	0.07
Chi^2 de Wald (type II)	Vitesse moyenne en déplacement $_{AAP}$	Postnatal	2	57.55	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	1.70	0.31
							24°C-16°C	-5.38	**0.01**
							20°C-16°C	-7.27	**0.005**
Chi^2 de Wald (type II)	Taux de mobilité $_{Naissance}$	FC $_{Naissance}$	1	2.91	**0.08**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Distance totale $_{Naissance}$	FC $_{Naissance}$	1	1.94	0.16	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Vitesse moyenne en déplacement $_{Naissance}$	FC $_{Naissance}$	1	4.57	**0.03**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Taux de mobilité $_{AAP}$ – Postnatal 24°C	FC $_{APP}$	1	7.19	**0.007**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Taux de mobilité $_{AAP}$ – Postnatal 20°C	FC $_{APP}$	1	9.31	**0.002**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Taux de mobilité $_{AAP}$ – Postnatal 16°C	FC $_{APP}$	1	16.48	**<0.001**	-	-	-	-

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Chi^2 de Wald (type II)	Distance totale $_{AAP}$ – Postnatal 24°C	FC $_{APP}$	1	9.75	**0.002**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Distance totale $_{AAP}$ – Postnatal 20°C	FC $_{APP}$	1	11.29	**<0.001**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Distance totale $_{AAP}$ – Postnatal 16°C	FC $_{APP}$	1	13.33	**<0.001**	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Vitesse moyenne en déplacement $_{AAP}$	FC $_{APP}$	1	0.37	0.54	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	Préférences thermiques $_{Régression}$	Postnatal	2	15.63	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	0.90	0.67
							24°C-16°C	-2.86	**0.09**
							20°C-16°C	-3.81	**0.04**
Effets persistants									
Chi^2 de Wald (type II)	Longueur totale $_{1\ mois}$	Postnatal	2	498.26	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-3.48	0.06
							24°C-16°C	17.33	**0.001**
							20°C-16°C	21.14	**0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Résidus largeur/Longueur totale $_{1\ mois}$	Postnatal	2	7.66	**0.02**	Tukey	24°C-20°C	1.30	0.47
							24°C-16°C	2.75	0.09
							20°C-16°C	1.57	0.35
Chi^2 de Wald (type II)	Masse $_{1\ mois}$	Postnatal	2	462.11	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-0.52	0.86
							24°C-16°C	18.37	**0.001**
							20°C-16°C	19.06	**0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Condition corporelle $_{1\ mois}$	Postnatal	2	27.14	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	2.22	0.19
							24°C-16°C	5.19	**0.01**
							20°C-16°C	3.06	0.08

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Chi^2 de Wald (type II)	$FC_{1\ mois}$	Postnatal	2	12.89	**0.002**	(Voir modèles sur sous-groupes ci-dessous)			
		Température de test	2	870.80	**<0.001**				
		Postnatal*Température de test	4	11.19	**0.02**				
Chi^2 de Wald (type II)	$FC_{1\ mois}$ – Postnatal 24°C	Température de test	2	377.73	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-9.65	**<0.001**
							24°C-16°C	-19.43	**<0.001**
							20°C-16°C	-9.78	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	$FC_{1\ mois}$ – Postnatal 20°C	Température de test	2	192.11	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-8.24	**<0.001**
							24°C-16°C	-13.78	**<0.001**
							20°C-16°C	-5.54	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	$FC_{1\ mois}$ – Postnatal 16°C	Température de test	2	421.28	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-12.52	**<0.001**
							24°C-16°C	-20.35	**<0.001**
							20°C-16°C	-7.83	**<0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	$FC_{1\ mois}$ – Température de test 24°C	Postnatal	2	0.91	0.64	-	-	-	-
Chi^2 de Wald (type II)	$FC_{1\ mois}$ – Température de test 20°C	Postnatal	2	17.74	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-1.64	0.11
							24°C-16°C	-4.17	**0.02**
							20°C-16°C	-2.68	0.34
Chi^2 de Wald (type II)	$FC_{1\ mois}$ – Température de test 16°C	Postnatal	2	6.53	**0.03**	Tukey	24°C-20°C	0.003	1.00
							24°C-16°C	-2.21	0.18
							20°C-16°C	-2.23	0.18
Chi^2 de Wald (type II)	$Locomotion_{1\ mois}$	Postnatal	2	71.84	**<0.001**	(Voir modèles sur sous-groupes ci-dessous)			
		Température de test	2	10.54	**0.005**				
		Postnatal*Température de test	4	33.53	**<0.001**				

Test	Variable dépendante	Paramètre(s)	Ddl	F/χ^2	p	Post-hoc	Comparaison	Ratio de T	p
Chi^2 de Wald (type II)	Locomotion $_{1\ mois}$ – Postnatal 24°C	Température de test	2	23.74	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-0.03	0.99
							24°C-16°C	-4.23	**0.001**
							20°C-16°C	-4.21	**0.001**
Chi^2 de Wald (type II)	Locomotion $_{1\ mois}$ – Postnatal 20°C	Température de test	2	6.72	**0.03**	Tukey	24°C-20°C	-1.64	0.23
							24°C-16°C	-2.56	**0.03**
							20°C-16°C	-0.92	0.63
Chi^2 de Wald (type II)	Locomotion $_{1\ mois}$ – Postnatal 16°C	Température de test	2	8.16	**0.02**	Tukey	24°C-20°C	2.43	**0.04**
							24°C-16°C	2.51	**0.04**
							20°C-16°C	0.08	0.99
Chi^2 de Wald (type II)	Locomotion $_{1\ mois}$ – Température de test 24°C	Postnatal	2	36.23	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-6.00	**0.01**
							24°C-16°C	-3.18	0.06
							20°C-16°C	2.54	0.12
Chi^2 de Wald (type II)	Locsomotion $_{1\ mois}$ – Température de test 20°C	Postnatal	2	63.21	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-7.50	**0.005**
							24°C-16°C	-1.44	0.40
							20°C-16°C	5.77	**0.009**
Chi^2 de Wald (type II)	Locomotion $_{1\ mois}$ – Température de test 16°C	Postnatal	2	57.87	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	-4.99	**0.02**
							24°C-16°C	2.52	0.12
							20°C-16°C	7.38	**0.003**
Ch^2 de Wald (type II)	Préférences thermiques $_{1\ mois}$	Postnatal	2	31.16	**<0.001**	Tukey	24°C-20°C	3.35	**0.003**
							24°C-16°C	-2.22	0.07
							20°C-16°C	-5.50	**<0.001**

4. Discussion – Conclusion

Les effets des conditions thermiques sur le développement des jeunes ont été beaucoup étudiés sous des régimes constants mais plus rarement dans un contexte d'interactions croisées entre les grandes phases de développement (Goldstein et al., 2017; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Watkins & Vraspir, 2006). Nous avons étudié les effets des environnements thermiques pré et postnataux en interaction afin d'identifier la sensibilité relative des phases de développement prénatal et postnatal, ainsi que les potentiels effets persistants et en interaction. De plus, l'importance de considérer la physiologie dans l'étude de la plasticité développementale chez les ectothermes a récemment été identifiée (Refsnider et al., 2019) et nous avons mesuré des paramètres physiologiques tout au long du développement.

a. Effets sur la durée de développement

Les traitements pré et postnataux ont influencé les durées de développement prénatal et postnatal, aussi bien seul qu'en interaction. Une phénologie précoce de naissance et/ou d'émergence permet d'améliorer l'aptitude des jeunes sur le long terme, notamment en allongeant la période d'activité avant le premier hiver (Le Henanff et al., 2013; Wapstra et al., 2010; Warner & Shine, 2007). Il est important de souligner que les jeunes se développant à 16°C ont basculé vers un développement pluriannuel alors que ceux se développant à 20°C ou à 24°C ont présenté un développement annuel. Cette trajectoire est donc directement liée aux conditions thermiques postnatales et pourrait permettre aux jeunes d'accumuler plus de réserves et de décaler l'émergence à une période plus favorable au printemps suivant (Richter-Boix et al., 2006).

Un effet d'interaction entre le traitement prénatal et le traitement postnatal sur la durée naissance-AAP a été observé. Des effets croisés des conditions thermiques pré et postnatales sur des paramètres morphologiques indépendants de la taille et sur les performances de locomotion (vitesse d'accélération) ont été décrits chez les amphibiens (Watkins & Vraspir, 2006). De plus, un effet du traitement prénatal au sein des groupes de traitement postnatal à 24°C et à 16°C a également été observé sur la durée totale de développement (*i.e.*, la période initial-régression), avec les individus issus du traitement prénatal à 20°C se développant plus rapidement que ceux des autres traitements (en moyenne et bien que toutes les différences ne soient pas significatives). Ainsi, les individus issus du traitement thermique prénatal correspondant à la température préférée des mâles adultes mesurée en laboratoire (Lange et al., *In prep.*) semblent plus rapides à se développer que ceux des traitements à une température

supérieure ou inférieure (Lorioux et al., 2012). Cela pourrait leur conférer des bénéfices au niveau de l'aptitude à long terme (Le Henanff et al., 2013; Wapstra et al., 2010; Warner & Shine, 2007). A notre connaissance, c'est la première fois que ce type d'effet croisé entre les conditions pré et postnatales avec une influence positive de la température préférée du parent sur la durée totale de développement est décrit.

Un effet d'interaction entre la fréquence cardiaque et le traitement prénatal a été observé sur la durée de développement des périodes intermédiaire-tardif et tardif-naissance. Il est intéressant de noter que malgré une absence de différence significative de fréquence cardiaque entre les individus se développant à 20°C et ceux se développant à 24°C au stade intermédiaire et au stade tardif, les relations observées entre la fréquence cardiaque et la durée de développement sont opposées. En effet, la relation est positive pour les individus se développant à 24°C et négative pour ceux se développant à 20°C. Ainsi, les variations de fréquence cardiaque sont importantes à considérer pour comprendre les variations de durées de développement et les interactions avec les conditions thermiques.

b. Effets morphologiques

Le traitement prénatal n'a pas entrainé de différence significative en ce qui concerne la morphologie à la naissance. Cependant, un effet parental a été observé sous la forme d'une relation positive avec la taille moyenne des œufs au stade initial. Cette relation a été observée à plusieurs reprises chez d'autres espèces d'amphibiens (Kaplan, 1985; Tejedo & Reques, 1992; Walls & Altig, 1986; Williamson & Bull, 1989).

Les individus du traitement postnatal à 16°C ont atteint une longueur totale, une masse et une condition corporelle (masse relative à la longueur totale) plus importantes au cours de leur développement postnatal. Ce résultat est en accord avec la règle température-taille (Walczyńska et al., 2016). Le traitement postnatal a influencé l'organisation morphologique des individus. En effet, au stade AAP, les individus du traitement postnatal à 24°C présentaient une longueur museau-cloaque relative et une largeur de corps relative supérieures à celles des individus du traitement postnatal à 20°C. Au stade sortie, ce sont les individus du traitement postnatal à 16°C qui présentaient une longueur museau-cloaque relative à la longueur totale et une largeur de corps relative à la longueur totale supérieures à celles des individus des deux autres traitements postnataux. Un effet de la température et des conditions trophiques sur les proportions corporelles a précédemment été démontré, indiquant que la croissance de la queue serait moins sensible au stress environnemental que la croissance du corps (Merilä et al., 1999). Dans cette

étude, tous les têtards étaient nourris *ad libitum* et la seule source de variation des conditions de développement des têtards était leur environnement thermique. Ceci semble alors suggérer qu'un développement postnatal à 20°C serait peut-être plus stressant pour les têtards qu'un développement à 24°C ou à 16°C.

c. Effets physiologiques

Pendant le développement prénatal, la fréquence cardiaque a été façonnée par le traitement prénatal. Une compensation cardiaque des individus se développant dans un milieu plus froid peut être observée lors d'un passage à un environnement plus chaud (Du et al., 2010; Du & Shine, 2010). Cette compensation n'a pas été observée au cours du développement prénatal, pendant lequel les individus se développant à 16°C ont montré une fréquence cardiaque inférieure à ceux se développant à 24°C, malgré des mesures réalisées à 20°C. Cependant, une inversion a été constatée à la naissance, suite à 24h passées en conditions thermiques similaires à 20°C (avant leur transfert vers leur traitement thermique postnatal). Cette augmentation de la fréquence cardiaque chez les individus se développant à 16°C pourrait correspondre à une augmentation du métabolisme pour engendrer une croissance compensatoire (Burraco et al., 2020; Hornick et al., 2000). A l'inverse, cette diminution de la fréquence cardiaque chez les individus se développant à 24°C pourrait correspondre à une diminution du métabolisme pour induire une croissance réduite (Hornick et al., 2000).

En ce qui concerne la relation entre la fréquence cardiaque à la naissance et la taille de ponte, deux hypothèses pourraient l'expliquer. La première hypothèse est qu'un nombre total d'œufs plus important pourrait réduire les zones d'échange avec l'air ambiant propres à chaque œuf (Seymour, 1999; Stahlschmidt et al., 2008). La réponse typique des amphibiens adultes à l'hypoxie semble être une bradycardie hypoxique (Pelster, 1999). Nous avons observé une relation négative entre la fréquence cardiaque et le nombre total d'œufs. Les embryons pourraient alors réagir de manière similaire aux adultes, comme c'est le cas pour certains poissons (S. Chen et al., 2006). Il est aussi possible qu'un nombre total d'œufs plus élevé puisse apporter une protection vis-à-vis de la déshydratation. Les plus petites pontes pourraient alors présenter une augmentation de leur fréquence cardiaque pour compenser le manque d'oxygène induit par des échanges limités par une déshydratation plus importante (Seymour, 1999). Des expérimentations supplémentaires sont cependant nécessaires pour évaluer le lien entre taille de ponte, pertes hydriques et fréquence cardiaque.

d. Effets sur les performances

A la naissance, le traitement prénatal n'a pas influencé les performances de locomotion des têtards (mesurées à 20°C pour tous les groupes) alors qu'au stade AAP, les individus s'étant développés à 24°C pendant le développement postnatal ont présenté des performances supérieures à celles des individus à 16°C (également mesurées à 20°C pour tous les groupes). De plus, au stade naissance, une relation positive entre la fréquence cardiaque et la vitesse moyenne en déplacement a été observée alors qu'au stade AAP, les relations positives ont été observées entre la fréquence cardiaque et le taux de mobilité et entre la fréquence cardiaque et la distance totale. Les performances de locomotion au stade AAP semblent donc avoir été façonnées par le traitement thermique postnatal tout en covariant avec la fréquence cardiaque.

e. Effets sur les préférences thermiques

Au stade régression, le traitement postnatal a influencé la température préférée des individus. L'effet de l'environnement postnatal sur les préférences thermiques des amphibiens a été observé récemment (Goldstein et al., 2017). Dans cette étude, les individus issus du traitement postnatal à 20°C ont présenté une température préférée plus élevée que celle des individus des traitements postnataux à 16°C. Il est possible que les jeunes s'étant développés à 20°C pendant le développement postnatal cherchent à utiliser l'environnement thermique pour augmenter leur métabolisme (Watkins & Vraspir, 2006). Cependant, les températures mesurées ici correspondent à celles post-métamorphoses et il serait intéressant de mesurer les températures préférées des têtards, notamment pour observer si l'environnement thermique prénatal peut les influencer.

f. Effets persistants un mois après la sortie

Des différences entre les différents traitements thermiques postnataux ont été observées un mois après la métamorphose au niveau de la morphologie, de la physiologie, de la locomotion et des préférences thermiques. En ce qui concerne la physiologie, les individus s'étant développés à 16°C ont présenté une fréquence cardiaque plus basse que ceux s'étant développés à 24°C lors des mesures réalisées à 20°C. De plus, la longueur totale et la masse des individus s'étant développés à 16°C ont été supérieures à celles de ceux s'étant développés à 20°C ou 24°C. Cependant, il n'y avait plus de différence significative au niveau de la masse entre les individus s'étant développés à 20°C et ceux s'étant développés à 24°C (mais une longueur totale inférieure). En revanche, les individus s'étant développés à 20°C ont présenté des performances de locomotion inférieures à celles des individus s'étant développés à 24°C ou à 16°C. De plus,

les individus s'étant développés à 20°C ont montré une préférence pour des températures supérieures que ceux s'étant développés à 24°C ou à 16°C. Il est possible que les jeunes s'étant développés à 20°C aient pu utiliser l'environnement thermique pour augmenter leur métabolisme afin de compenser un environnement thermique ultérieur moins favorable (Watkins & Vraspir, 2006), d'autant plus que la température de test a aussi influencé les performances physiologiques. Enfin, la température de test et le traitement postnatal en interaction ont influencé les performances de locomotion. Ainsi, les individus semblent montrer une acclimatation des performances de locomotion, avec les individus se développant à 24°C présentant des performances supérieures à 24°C et les individus se développant à 16°C des performances supérieures à 16°C (Wilson et al., 2000). Le traitement postnatal semble donc avoir des effets persistants sur la morphologie, la physiologie et les performances des individus (Niehaus et al., 2006).

SYNTHESE DES RESULTATS

© L. Lange

« Je sais pourquoi tant de gens aiment couper du bois. C'est une activité où l'on voit tout de suite le résultat » - Albert Einstein

Dans le cadre de ce travail de thèse, j'ai pu étudier des volets complémentaires de la stratégie de reproduction de l'Alyte accoucheur, une espèce caractérisée par une reproduction en partie terrestre et des soins parentaux mâles (SPM) exclusifs. Les résultats principaux des trois chapitres précédents sont synthétisés ci-dessous.

A. Evidences de la sélection de l'habitat

- La présence d'Alytes accoucheurs était fortement associée au type de substrat, avec des contacts plus fréquents avec le substrat de type sciure de bois, qui maintient une humidité élevée, et au type de refuge artificiel, avec des contacts plus fréquents sous les refuges en caoutchouc noir, qui présentent des températures plus élevées (CHAPITRE I. A.).
- Une interaction entre le type de refuge artificiel et la température a été observée, montrant que les refuges en caoutchouc (plus chauds) étaient plus attractifs à basse température, alors que la présence sous les refuges en bois était indépendante des conditions thermiques (CHAPITRE I. A.).
- Le nombre de mâles porteurs observés par session était fortement corrélé à la moyenne quotidienne de la température de l'air et le pic d'observation a eu lieu au printemps, à la période où la température de l'air était la plus proche de la température de préférence mesurée chez les mâles porteurs (CHAPITRE I. B.).

B. Evidences de thermorégulation

- Sur le terrain, la température des mâles porteurs était fortement corrélée à la température du substrat, avec un seuil à 22°C environ, en-dessous duquel la température corporelle des mâles était positivement corrélée à la température du substrat avec une pente de 0.8 et au-dessus duquel la température corporelle des mâles était moins fortement corrélée, avec une pente de 0.2 (CHAPITRE I. B.).
- La déviation à la droite de régression (évaluée comme les résidus de la régression) était significativement plus élevée au-dessus du seuil qu'en-dessous (test de Wilcoxon, $W=8519$, $p<0.001$) ; (CHAPITRE I. B.).
- En conditions contrôlées en laboratoire, les mâles ont montré des préférences thermiques plus élevées lorsqu'ils portaient des œufs (20±0.2°C) que lorsqu'ils n'en portaient pas (19.3±0.2) (CHAPITRE I. B.).

C. Coûts des soins parentaux

1. Altération de la locomotion et déterminants de la désertion

- Les mâles porteurs ont présenté des performances de locomotion diminuées que ce soit au niveau du nombre de sauts, de la distance de saut, du temps de retournement, de la réponse musculaire à la charge des œufs et du nombre de sauts utilisés en locomotion volontaire (CHAPITRE II.).
- Chez les mâles porteurs, la taille de ponte relative à la taille corporelle a négativement influencé la distance de saut et le temps de retournement (CHAPITRE II.).
- Les mâles ayant abandonné leur ponte ont montré des performances similaires aux mâles non-porteurs, au niveau de la distance de saut, de la réponse musculaire à la charge des œufs et de l'utilisation volontaire de sauts (CHAPITRE II.).

2. Compromis basé sur la fécondité

- Les mâles ayant abandonné leur ponte étaient significativement plus petits et avaient une fécondité résiduelle supérieure à celle des autres mâles (CHAPITRE II.).
- Bien que cela ne rentrait pas dans la thématique définie initialement, l'expérimentation sur les influences à court terme et les effets persistants de l'environnement thermique sur le développement a permis d'obtenir des informations complémentaires quant à l'effet de la fécondité résiduelle sur le succès à l'éclosion (nombre de têtards en vie à la naissance divisé par nombre total d'œufs). En effet, la taille de ponte relative a négativement influencé le succès à l'éclosion (Figure 85).

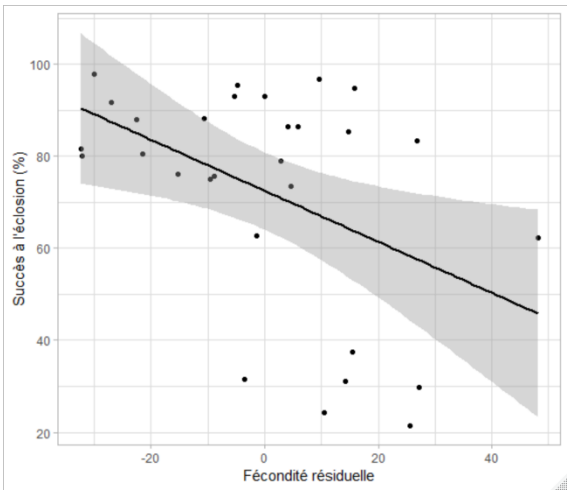


Figure 85. Succès à l'éclosion en fonction de la fécondité résiduelle des mâles.
Résultat complémentaire obtenu au cours de l'expérimentation sur les influences à court terme et les effets persistants de l'environnement thermique sur le développement. La droite représente la régression linéaire ajustée et la surface grisée l'intervalle de confiance à 95%.

D. Influences des conditions thermiques pré et post natales

1. Effet du traitement prénatal

- Les conditions thermiques ont une influence très forte sur la vitesse de développement embryonnaire. Il a été possible d'obtenir une courbe de performance thermique de la durée de développement prénatal sous régime thermique constant. Ainsi, le développement a été 1.3 fois plus long à 16°C qu'à 18°C, 1.2 fois plus long à 18°C qu'à 20°C et 1.3 fois plus long à 20°C qu'à 22°C. Cependant, la durée de développement à 24°C n'a pas été significativement différente de celle à 22°C, ni de celle à 20°C (CHAPITRE I. B.).
- Au cours de l'expérimentation sur l'influence du traitement thermique sur le développement (2019), la durée de développement embryonnaire a été significativement différente entre les traitements thermiques prénataux (16°C, 20°C, 24°C) (CHAPITRE III.).
- En 2019, le traitement prénatal a influencé la physiologie, et notamment la fréquence cardiaque et ce, à tous les stades. Les jeunes s'étant développés à 24°C ont alors montré une fréquence supérieure pendant le développement embryonnaire à ceux s'étant développés à 16°C. A la naissance, l'effet du traitement prénatal a été également observé, mais ce sont cette fois les jeunes s'étant développés à 16°C qui ont présenté une fréquence cardiaque supérieure à ceux s'étant développés à 24° (CHAPITRE III.).
- En 2019, le traitement prénatal n'a cependant pas influencé ni la morphologie, ni le comportement (CHAPITRE III.).

2. Effet du traitement postnatal

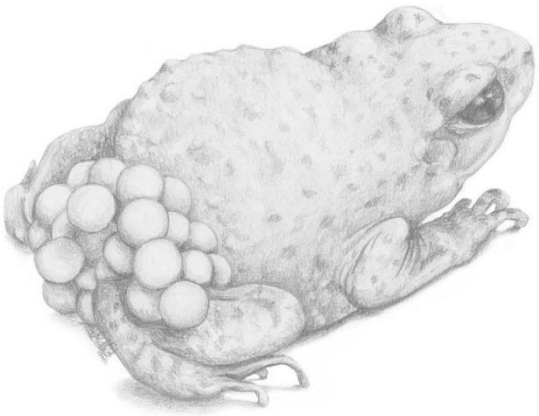
- La durée de développement larvaire a été significativement différente entre les traitements thermiques postnataux. Les jeunes se développant à 16°C ont présenté une durée de développement larvaire fortement plus longue que celle des jeunes se développant à 24°C ou à 20°C. Ils sont alors passés d'un développement annuel à un développement pluriannuel. Bien que les différences étaient moins importantes, les jeunes se développant à 24°C ont été plus rapides que ceux se développant à 20°C (CHAPITRE III.).
- Le traitement postnatal a également influencé la morphologie, avec les individus du traitement à 16°C étant d'une manière générale bien plus longs et lourds que ceux des traitements à 24°C et à 20°C (CHAPITRE III.).

- Le traitement postnatal a aussi impacté les performances de locomotion, les individus du traitement à 20°C présentant des performances de saut inférieures à ceux des traitements à 24°C et à 16° (CHAPITRE III.).
- L'effet du traitement postnatal a de plus été observé sur les préférences thermiques, avec par exemple les individus du traitement à 20°C préférant des températures plus chaudes que ceux du traitement à 24°C et à 16°C après avoir passé un mois dans des conditions thermiques similaires à la suite de la régression de la queue (CHAPITRE III.).
- Enfin, le traitement postnatal a influencé la physiologie pendant le développement postnatal (CHAPITRE III.).

3. Effets croisés des traitements pré et postnataux

- Les traitements pré et postnataux ont influencé la durée de développement entre la naissance et la fin de la croissance somatique (stade AAP). Au sein de leur groupe de traitement postnatal, les individus du traitement prénatal à 16°C ont été plus rapides que ceux du traitement prénatal à 24°C (sauf pour le groupe du traitement postnatal à 16°C, où ces différences n'étaient plus significatives) ; (CHAPITRE III.).
- Au sein des groupes de traitement postnatal à 16°C et à 24°C, ce sont finalement les individus du traitement prénatal à 20°C qui ont été les plus rapides pour compléter la totalité de leur développement pré et postnatal (CHAPITRE III.).

DISCUSSION GENERALE



© X. O'Reilly Berkeley

« Je ne perds jamais. Soit je gagne, soit j'apprends. » - Nelson Mandela

A. Soins parentaux et contraintes de la reproduction chez l'Alyte accoucheur

1. Evidences de la sélection d'habitat

Dans le milieu naturel, les mâles Alytes accoucheurs ont favorisé les refuges avec substrat de type sciure de bois par rapport à ceux sans substrat. Les fibres de bois présentent la propriété de retenir l'humidité (Gruda, 2008) ce qui crée un microhabitat favorable permettant de minimiser leurs pertes hydriques. Cette propriété est particulièrement importante pour les amphibiens dont les besoins hydriques et thermiques sont importants et conflictuels (Köhler et al., 2011). De plus, l'humidité permet d'améliorer le développement des œufs (Janzen et al., 1995) et d'éviter leur dessiccation (Taigen et al., 1984) ; (Figure 86).

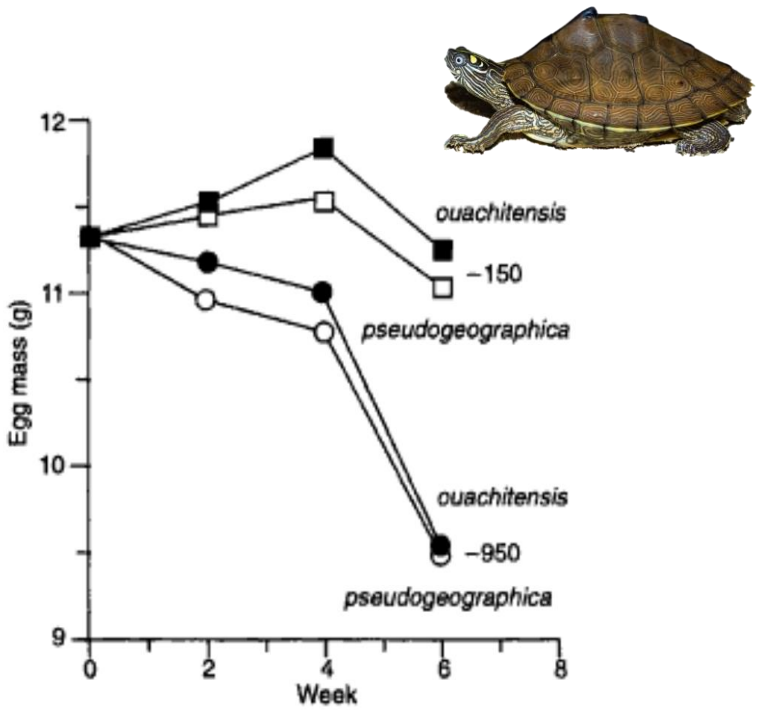


Figure 86. Effet du taux d'humidité du substrat (en kPa) sur la masse des œufs de Graptemys ouachitensis (symbôles pleins) et G. pseudogeographica (symbôles ouverts).
Les valeurs sont les moyennes ajustées par la masse initiale depuis des analyses de covariances sur des mesures répétées. [Crédit photo : Jeromi Hefner] (Janzen et al., 1995)

Les Alytes accoucheurs semblent donc sélectionner leurs refuges diurnes sur la base de critères hydriques. De plus, la présence d'Alytes accoucheurs a varié en fonction de l'interaction entre la température ambiante et le type de refuge. Ainsi, les refuges en caoutchouc noir, plus chauds, étaient plus attractifs lorsque les températures ambiantes étaient plus faibles. En revanche, à mesure que la température ambiante a augmenté, cette attraction a diminué. Au contraire, l'occupation des refuges en bois est restée constante. Sur le terrain, les tapis en caoutchouc captent les radiations solaires et montent en température plus rapidement (LL comm. pers.). Ce

matériau présente alors des bénéfices thermiques lorsque la température est faible alors que le bois s'est révélé comme constamment attractif pour les espèces de reptiles et d'amphibiens et ce, sans effet de la température (Grant et al., 1992). Les Alytes accoucheurs semblent donc sélectionner leurs refuges diurnes non seulement sur la base de critères hydriques mais aussi sur la base de critères thermiques.

Enfin, un pic d'occupation des refuges par les mâles porteurs a été constaté au printemps. Ce pic pourrait être représentatif de la phénologie de reproduction de l'espèce (Márquez, 1992), mais il pourrait également être dû à une variation de l'utilisation des refuges et donc de l'habitat en fonction de la saison. En effet, les mâles porteurs pourraient favoriser ces refuges en début de saison pour se chauffer lorsque les températures sont fraiches, puis les délaisser au cours de la saison, lorsque les températures sont hautes et qu'ils deviennent alors défavorables.

Ces évidences suggèrent que les Alytes accoucheurs thermorégulent activement sur le terrain en sélectionnant leurs refuges diurnes.

2. Evidences de thermorégulation

Ainsi, les Alytes accoucheurs sélectionnent leurs refuges diurnes en fonction des paramètres hydriques et thermiques des microhabitats qu'ils fournissent. De plus, une corrélation entre la température corporelle sur le terrain des mâles porteurs et la température du substrat a été mise en évidence. La nature de cette relation différait si la température corporelle de l'individu était inférieure ou supérieure à 21.9°C. D'après le modèle de Huey & Slatkin, 1976, il est attendu que les animaux thermoconforment jusqu'à ce que le bénéfice de la thermoconformité soit dépassé par le bénéfice de la thermorégulation (Basson et al., 2017). En-dessous de 21.9°C, les coûts de la thermorégulation pourraient donc être supérieurs aux bénéfices de la thermoconformité et les Alytes accoucheurs pourraient favoriser la thermoconformité. Au-dessus de 21.9°C, les coûts de la thermoconformité pourraient être supérieurs aux bénéfices de la thermorégulation et les Alytes accoucheurs pourraient alors thermoréguler activement. Aussi, des différences plus importantes entre la température des individus et celle du substrat ont été observées au-dessus de 21.9°C. Ce résultat pourrait être caractéristique d'une thermorégulation verticale dans le substrat, comme observé chez certaines espèces de fourmis (Penick & Tschinkel, 2008). La sélection des refuges avec substrat pourrait être également favorisée par cette thermorégulation verticale. En effet, le substrat en sciure de bois permet aux alytes de s'enfouir en creusant une petite loge qui leur est caractéristique (Figure 87), ce que le substrat initial (béton) ne permet pas.

Figure 87. Photo de terrain d'un alyte dans sa loge caractéristique.
© L. Bégué

Une thermorégulation active a été démontrée en laboratoire selon le statut reproducteur. En effet, les mâles ont montré des préférences thermiques supérieures lorsqu'ils portaient leurs œufs en comparaison avec les mâles non-porteurs et les individus adultes dont le sexe n'a pas pu être déterminé. Cette différence a été également détectée chez les mâles observés consécutivement avec les deux statuts. Ces données soulignent une thermorégulation parentale active des mâles par la sélection de températures plus élevées. Ceci pourrait permettre d'optimiser une phase critique du développement, celle du développement embryonnaire. La thermorégulation parentale a été documentée chez d'autres espèces d'ectothermes. Elle prend parfois la forme d'une sélection maternelle vers des températures plus basses pour éviter des températures extrêmes (Isaac & Gregory, 2004; Lin et al., 2008; Mathies & Andrews, 1997). L'unique référence disponible à ce jour (à ma connaissance) au sujet d'une régulation thermique paternelle fait part d'une modification de l'habitat par le crapaud buffle américain pour modérer les températures extrêmes (Cook et al., 2001). Chez d'autres espèces, une sélection maternelle pour des températures plus hautes et plus stables a également été observée (DeNardo et al., 2012; Lourdais et al., 2008) ; (Figure 88).

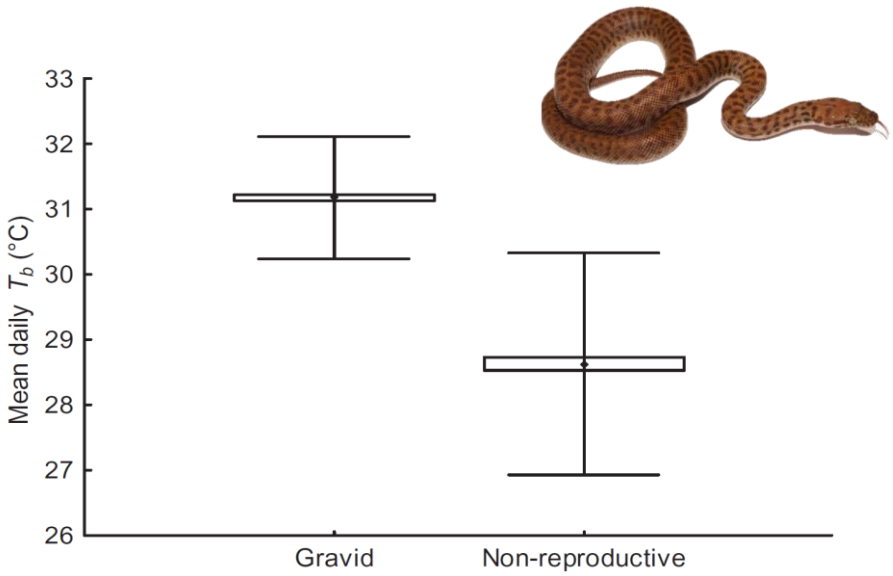


Figure 88. Température corporelle quotidienne moyenne (°C) mesurée chez des femelles gravides et des femelles non-reproductives d'Antaresia childreni.
Les diamants solides indiquent les moyennes, alors que les rectangles ouverts indiquent les erreurs standards et les barres d'erreurs représentent les déviations standards et ce, pour démontrer la variation inter-individuelle en température corporelle moyenne quotidienne pour chaque groupe. (Lourdais et al., 2008)

L'optimisation de la qualité du développement embryonnaire ou l'influence de la future date d'éclosion pourraient alors être des déterminants majeurs de l'émergence de ces comportements et ce, sans influence du sexe du parent (Anduaga & Huerta, 2001; Lorioux et al., 2012; Lorioux, Vaugoyeau, et al., 2013; Reed et al., 2009; Telemeco et al., 2010).

Ces différents résultats illustrent bien l'importance de la thermorégulation paternelle mais aussi de la régulation hydrique (choix des refuges). Le concept de thermo-hydrorégulation a fait l'objet d'un article de synthèse récent (Rozen-Rechels et al., 2019). Ce concept est proposé comme une capacité fonctionnelle intégrée des ectothermes terrestres et semi-terrestres avec des implications fondamentales sur les stratégies d'optimalité et les décisions comportementales (Rozen-Rechels et al., 2019). Chez les amphibiens, le taux d'humidité de l'air est aussi un facteur environnemental clé impactant la richesse des modes de reproduction et la diversité phylogénétique (da Silva et al., 2012). Le taux de dessiccation peut parfois être la source primaire de mortalité chez les espèces d'amphibiens avec soins parentaux en cas d'absence de l'adulte (Poo & Bickford, 2013) ; (Figure 89).

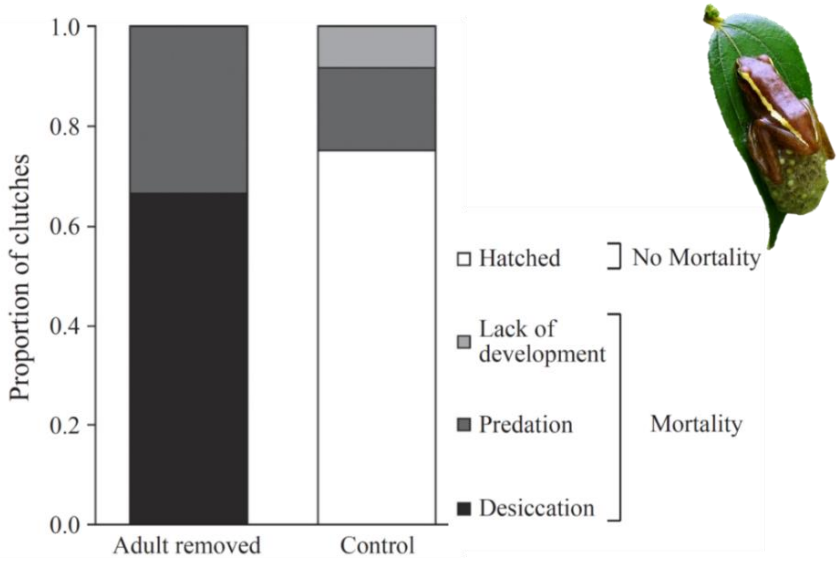


Figure 89. Destin des pontes de Chiromantis hansenae dans une expérience de retrait de l'adulte [Crédit photo : S. Poo] (Poo & Bickford, 2013)

De plus, la physiologie des amphibiens présente des adaptations aux contraintes abiotiques et notamment hydriques. En effet, les espèces utilisant des habitats avec des aridités similaires présentent une sensibilité des performances de locomotion à la déshydratation, une résistance à la perte en eau par évaporation et des taux d'absorption en eau similaires (Titon & Gomes, 2015). La déshydratation peut avoir des effets sévères allant jusqu'à la baisse de la fécondité sur les ectothermes (C. F. Smith et al., 2019) et différentes compensations physiologiques et comportementales sont observables. Les femelles peuvent par exemple augmenter leur prise en eau (Lourdais et al., 2015) ou sélectionner des microhabitats à la fois chauds et humides (Stahlschmidt et al., 2011). Certaines espèces peuvent même favoriser des microhabitats humides en dépit de leurs propriétés thermiques défavorables (Pintor et al., 2016). Cependant, un conflit entre les besoins thermiques et hydriques est souvent constaté (Anderson & Andrade, 2017; Köhler et al., 2011; Mitchell & Bergmann, 2016). En effet, les températures ambiantes hautes ont tendance à maximiser les performances mais entrainent des taux de perte hydrique importants (Köhler et al., 2011; Mitchell & Bergmann, 2016). A l'inverse, des températures ambiantes basses ralentissent la dessiccation mais réduisent potentiellement les performances (Köhler et al., 2011; Mitchell & Bergmann, 2016). De plus, les performances et les préférences thermiques peuvent parfois être directement réduites par la déshydratation (Anderson & Andrade, 2017). Certaines espèces peuvent alors favoriser des températures intermédiaires (Köhler et al., 2011). En conséquence, les choix comportementaux peuvent optimiser ce conflit physiologique entre la balance hydrique et thermique (Köhler et al., 2011), notamment pour favoriser le développement de leurs jeunes (Stahlschmidt et al., 2011).

Il serait particulièrement pertinent d'étudier l'hydrorégulation chez l'Alyte accoucheur en période de reproduction. En effet, lors du port des œufs, les Alytes accoucheurs pourraient exprimer des comportements d'hydratation active, en immergeant leurs œufs dans l'eau à intervalles réguliers au cours du développement embryonnaire par exemple (Boulenger, 1897) ; (Figure 90). Chez cette espèce, le mâle pourrait donc contrôler activement l'environnement thermique et l'hydratation des œufs lors du développement des embryons.

Figure 90. Photo d'un Alyte accoucheur immergeant sa ponte récente (coloration jaune vs. marron) dans l'eau. © Françoise Serre-Collet

Les Alytes accoucheurs pourraient ainsi réaliser des soins parentaux non seulement thermiques mais aussi hydriques. Cependant, les soins parentaux ne sont pas sans contraintes.

3. Contraintes et coûts des soins parentaux

a. Altération de la locomotion

Il a été mis en évidence que le port des œufs de l'alyte altérait les performances de locomotion des mâles. L'altération de la locomotion peut avoir des répercussions sur les comportements alimentaires et d'anti-prédation (D. R. Webb, 1987), pouvant induire des effets sur l'aptitude (Burris, 2011; Munguía-Steyer et al., 2019; D. R. Webb, 1987). En effet, les soins parentaux sont souvent accompagnés de contraintes énergétiques induites par la limitation des

mouvements et/ou par l'incompatibilité des comportements reproductifs et des comportements alimentaires (Lourdais et al., 2002). Chez l'Alyte accoucheur, le mâle maintient son alimentation pendant le port des œufs (LL comm. pers.). Le port des œufs induit donc probablement des coûts supplémentaires de transport en relation avec les comportements alimentaires. De plus, comme évoqué précédemment, les mâles pourraient aussi fournir des soins hydriques directs aux œufs en les immergeant dans l'eau à intervalles réguliers. De tels comportements parentaux augmenteraient alors la mobilité et pourraient ajouter des coûts énergétiques et/ou de survie pendant la reproduction de cette espèce. Les changements de comportement et l'altération de la locomotion ont également été observés chez les arthropodes pendant le port des œufs (Burris, 2011; Ruhland et al., 2016) ; (Figure 91).

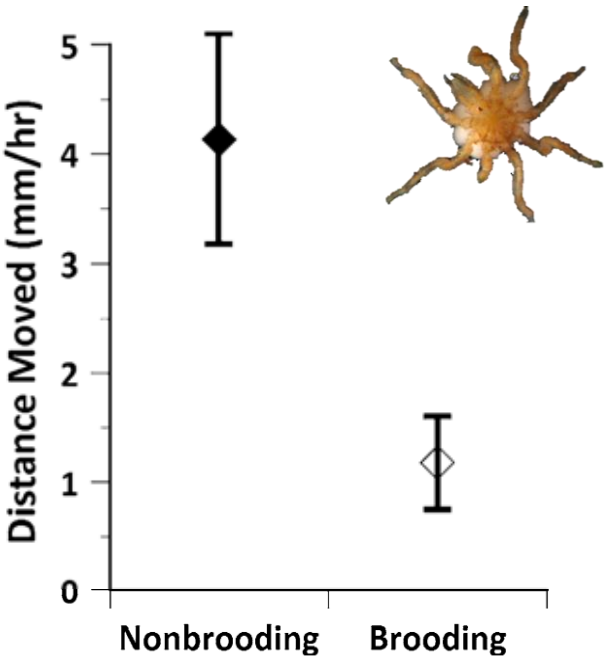


Figure 91. Distance moyenne parcourue de mâles araignée de mer non-porteurs (diamants pleins) et porteurs (diamants ouverts).
(Burris, 2011)

Les soins parentaux mâles (SPM) présentent donc les mêmes contraintes que pour les femelles, malgré le plus faible investissement prézygotique de ces derniers (Ruhland et al., 2016; Sawecki et al., 2019; Williams et al., 2016). De plus, l'altération des performances de locomotion est fortement liée à la taille de ponte relative à la taille des individus. La taille de ponte est un paramètre central dans l'étude des coûts potentiels de la reproduction (Stearns, 1992). Cette corrélation engendre donc un compromis entre le succès reproducteur potentiel du mâle en portant une ponte plus importante relativement à sa taille et l'impact sur sa locomotion. Ce compromis peut ainsi influencer les prises de décisions en ce qui concerne la reproduction et la sélection de partenaires. Cependant, les performances mesurées juste après l'abandon d'une

ponte par un mâle étaient similaires à celles des mâles sans œufs. L'altération de la locomotion semble donc être plutôt la conséquence d'un effet d'entrave des membres postérieurs du mâle causé par l'ancrage de sa ponte, qu'un effet de fatigue physiologique liée au transport d'une charge lourde pendant plusieurs jours. Toutefois, la taille de ponte n'impacte pas uniquement la locomotion et d'autres compromis peuvent être observés.

b. Compromis et désertion des pontes

Le risque d'abandon de la ponte par les mâles Alytes accoucheurs s'est montré corrélé à la taille de ponte relative. L'abandon est souvent réalisé pour favoriser la reproduction future lorsque les conditions de la reproduction actuelle ne sont pas optimales (Chuang et al., 2017; Consolmagno et al., 2016; Delia et al., 2013). Aussi, le succès à l'éclosion semble être plus faible pour les mâles dont le nombre d'œufs transportés est plus important. Ce résultat illustre une situation de compromis entre l'intérêt de favoriser un épisode de reproduction, en s'occupant d'une plus grande quantité de jeunes à la fois, et le risque de ne pas apporter les soins nécessaires à tous ses jeunes, lorsqu'ils sont trop nombreux (Stearns, 1992).

L'investissement parental semble donc coûteux, non seulement au niveau de la locomotion, mais aussi d'après les compromis qu'il engendre. Pour expliquer que l'investissement parental ait émergé et ait été maintenu, des bénéfices, qui pourraient s'exprimer au niveau de l'aptitude des jeunes, devraient être observés chez les Alytes accoucheurs.

B. Thermorégulation et sensibilité du développement

1. Effets parentaux

Les effets des traitements thermiques prénataux sur le développement des œufs sont en accord avec les changements de préférences thermiques des mâles porteurs. En effet, une température plus élevée a significativement réduit la durée de développement des œufs puis des têtards. La thermorégulation paternelle semble donc avoir de fortes influences phénologiques. Chez d'autres espèces, il a été démontré que même de petits changements au niveau de la variation thermique peuvent avoir d'importants bénéfices pour la progéniture (Foucart et al., 2018; G. D. Smith et al., 2015). De plus, les effets parentaux peuvent influencer le succès reproducteur et la survie à l'échelle de la vie et peuvent donc avoir un impact sur le maintien ou la dégradation au niveau de l'espèce (Durant et al., 2019). Ces effets devraient notamment être importants pour des espèces avec des comportements parentaux essentiels à la reproduction (Durant et al., 2019), comme c'est le cas pour l'alyte accoucheur.

La température préférée mesurée pour les mâles porteurs s'est située autour de 20°C. Le développement embryonnaire est nettement plus rapide au-dessus de 18°C et ce changement de température est donc avantageux. Ce choix peut amener à se questionner sur l'intérêt de cette température plutôt qu'une autre. En effet, le développement embryonnaire a été plus rapide à 22°C qu'à 20°C et aucun effet délétère n'a pu être mis en évidence sur le développement des jeunes à la suite d'un développement à une température plus élevée et ce, jusqu'à 24°C. Aussi, la variation des valeurs de préférences thermiques entre les individus mesurées en laboratoire était relativement importante et, certains mâles porteurs ont été mesurés à des températures hautement supérieures à 20°C, aussi bien dans le gradient thermique (jusqu'à 25.1°C) que dans le milieu naturel (jusqu'à 33.6°C). Les mâles pourraient donc avoir intérêt à sélectionner des températures plus élevées et la température préférée mesurée en laboratoire pourrait finalement avoir été influencée par les conditions d'expérimentation. En effet, les choix thermiques peuvent être altérés par des facteurs extérieurs, comme le stress (Terblanche et al., 2011). De plus, un changement de comportement de thermorégulation sur le terrain a été identifié pour les mâles porteurs au-dessus d'environ 22°C. Il est donc aussi possible que les bénéfices d'un développement embryonnaire à une température supérieure à 20°C soient contrebalancés par des coûts énergétiques pour le mâle porteur. Une température située autour de 20°C pourrait ainsi permettre de limiter les coûts associés à la thermorégulation et à l'investissement parental pour les mâles (Basson et al., 2017; Huey & Slatkin, 1976). Aussi, certains effets de conditions de développement défavorables ne sont observés que sur le long terme, comme les effets de report (Monaghan, 2008). Il est alors possible que certains effets délétères engendrés par un développement supérieur à 20°C n'aient pas été mis en évidence au cours des expérimentations présentées dans ce manuscrit.

Au contraire, les jeunes s'étant développés à 20°C au stade œuf sont ceux pour lesquels le développement postnatal a été le plus rapide au sein de chaque traitement thermique postnatal, (mais la différence n'était pas significative entre ceux s'étant développés à 20°C pendant le développement postnatal). De plus, alors que leurs congénères issus des traitements prénataux à 16°C et à 24°C ont présenté une inversion de leur physiologie au moment de la naissance (les individus s'étant développés au stade prénatal dans le traitement thermique à 16°C ont présenté une fréquence cardiaque plus basse pendant le développement embryonnaire puis plus haute à la naissance, et inversement pour les individus s'étant développés dans le traitement thermique à 24°C), les individus du traitement prénatal à 20°C sont restés à une fréquence cardiaque intermédiaire. Enfin, aucune différence de morphologie ou de performances de locomotion à la

naissance n'a été mise en évidence en fonction du traitement thermique prénatal. Il est alors possible que 20°C soit finalement une température optimale pour le développement des jeunes. Cette température ayant été choisie en fonction des préférences thermiques mesurées chez les mâles porteurs d'œufs, les mâles pourraient alors sélectionner préférentiellement la température optimale de développement pour leurs jeunes, comme cela a pu être montré chez d'autres espèces (Kurdíková et al., 2011). La température préférée des mâles pourrait alors correspondre à un compromis entre les bénéfices pour le développement et les contraintes pour les mâles.

Finalement, l'environnement thermique prénatal a fortement influencé les durées de développement. Cependant, l'environnement thermique postnatal peut également être déterminant.

2. Sensibilité thermique de trajectoires de développement

La phase de développement larvaire est une phase de grande plasticité chez les amphibiens (Ruthsatz et al., 2018). Une température plus élevée entraine généralement un développement plus rapide chez les ectothermes (Foucart et al., 2018; Singh et al., 2020). Cet effet a également été observé chez les Alytes accoucheurs. Les individus se sont développés plus rapidement à 24°C qu'à 20°C. Cette sensibilité thermique au stade larvaire est particulièrement marquée pour les individus à 16°C, qui ont présenté des trajectoires ontogéniques modifiées, en basculant vers un développement pluriannuel.

Alors que le traitement prénatal à 20°C pourrait être optimal pour le développement prénatal, il semble que ce ne soit pas le cas pour le développement postnatal. En effet, les individus s'étant développés dans le traitement postnatal à 20°C ont montré une taille et une masse inférieures au stade régression, ainsi que des performances de locomotion moindres un mois après la métamorphose (période pendant laquelle tous les individus ont été placés dans des conditions thermiques similaires). De plus, ils ont présenté des préférences thermiques plus hautes un mois après la métamorphose. Ce choix pourrait leur permettre d'améliorer leurs performances de locomotion (So & Schwanz, 2018), puisqu'un effet de la température de test a été démontré sur les individus de ce groupe de traitement postnatal. La température de test a également influencé la fréquence cardiaque des individus de ce groupe. La fréquence cardiaque est corrélée au métabolisme (Green, 2011), les individus du traitement postnatal à 20°C pourraient alors choisir une température plus haute afin d'accélérer leur métabolisme, ce qui pourrait leur permettre de moduler leur taux de croissance et ainsi compenser des conditions antérieures défavorables (Jobling, 1996). Alors qu'ils étaient plus petits et plus légers à la régression que ceux du

traitement à 24°C, ces différences n'étaient plus significatives un mois plus tard. Ces préférences thermiques ont ainsi pu permettre aux individus issus du traitement thermique postnatal à 20°C de compenser leur retard. Il est probable que les têtards thermorégulent de façon comportementale pour éviter d'avoir à se développer à 20°C. Pour confirmer cette dernière hypothèse, des expérimentations complémentaires sont nécessaires afin de mesurer les températures de préférence des têtards à la naissance.

Les individus du traitement postnatal à 24°C ont eu un développement larvaire plus rapide. Il semblerait donc que ce soit avantageux pour l'espèce de choisir d'initier sa reproduction tôt, afin que les têtards soient en développement larvaire pendant l'été, où ils auront accès à des températures élevées. A l'inverse, les individus du traitement postnatal à 16°C ont été beaucoup plus lents à se développer que les individus des deux autres traitements mais ils ont également été les plus grands et les plus lourds. Ce résultat correspond aux prédictions de la règle « température-taille » qui prédit que les individus vivant dans des conditions thermiques plus froides doivent être plus grands (Walczyńska et al., 2016). Il semblerait donc qu'une reproduction tardive où les têtards rencontreront des températures plus froides et hiverneront alors au stade têtard présente également des avantages. Lorsqu'un choix est possible (*i.e.,* plusieurs mares thermiquement différentes sont disponibles dans l'environnement), le mâle pourrait aussi sélectionner la mare dans laquelle déposer ses œufs sur la base de critères thermiques (Kurdíková et al., 2011), en fonction des conditions saisonnières, thermiques et temporelles. De plus, les individus de ces deux traitements (16°C et 24°C) ont présenté de meilleures performances de locomotion que ceux du traitement à 20°C. Il est alors possible que ces deux voies de développement alternatives représentent deux stratégies différentes ayant chacune des avantages spécifiques.

3. Plasticité et voies de développement alternatives

Les Alytes accoucheurs présentent donc une grande plasticité de vitesse de développement, avec deux voies de développement alternatives : un développement annuel *versus* un développement pluriannuel. Deux stratégies de reproduction sont souvent rencontrées chez les amphibiens en zone tempérée (K. D. Wells, 1977). La première correspond à une reproduction explosive, et notamment précoce, donc dans des conditions thermiques souvent fraiches (K. D. Wells, 1977). La seconde est une reproduction plus lente et étalée prenant alors place dans des conditions thermiques variables (K. D. Wells, 1977). De plus, certaines espèces présentent la capacité d'utiliser l'une ou l'autre stratégie en fonction de leur habitat (Martin, 2004). C'est le

cas de la grenouille rousse, qui montre une reproduction explosive en plaine et étalée en montagne (Martin, 2004). Les têtards développent alors des adaptations locales au niveau de leur vitesse de développement larvaire (Martin, 2004). L'Alyte accoucheur présente plutôt une reproduction de type étalé (Márquez, 1992). Cependant, il semble que la plasticité de développement larvaire de l'Alyte accoucheur permet de répondre aussi bien à une reproduction précoce qu'à une reproduction tardive. Ces adaptations impliquent probablement des changements de type « syndrome du rythme de vie » (traduit de l'anglais, *pace of life syndrome*), notamment au niveau du métabolisme, de la maturité sexuelle, du système immunitaire ou encore du comportement (Réale et al., 2010; Royauté et al., 2018; Wright et al., 2019) ; (Figure 92).

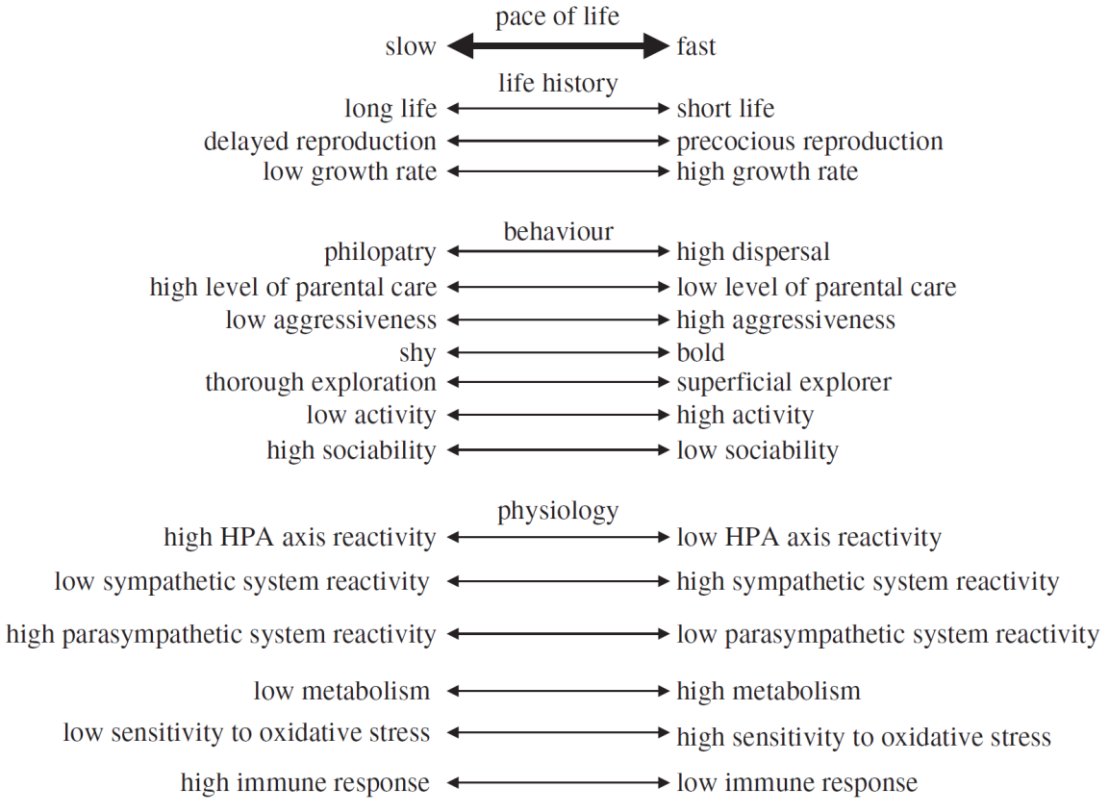


Figure 92. Schéma des intégrations potentielles des différents traits le long d'un continuum rythme de vie. Les doubles flèches symbolisent les variations présumées continues des stratégies d'histoire de vie entre les individus d'une population et leur relation supposée avec la personnalité et les traits physiologiques. (Réale et al., 2010)

Les contextes sélectifs prenant place dans ces deux stratégies sont vraisemblablement très différents. Dans le cadre d'une reproduction précoce, les jeunes se développent en même temps que d'autres espèces d'amphibiens mais aussi de prédateurs. Ils se développent donc dans des mares où les niveaux de compétitions et de prédations peuvent être importants (Pearman, 1995). Dans ce contexte, il est probablement adaptatif de se développer rapidement pour s'extraire de

ce milieu le plus vite possible. De plus, l'intérêt d'une reproduction précoce et d'une émergence précoce a été démontré à plusieurs reprises (Le Henanff et al., 2013; Wapstra et al., 2010; Warner & Shine, 2007). A l'inverse, dans le cadre d'une reproduction tardive et d'un hivernage au stade têtard, les jeunes pourraient se retrouver dans un milieu avec moins de compétition (Richter-Boix et al., 2006) ; (Figure 93) et moins de prédation.

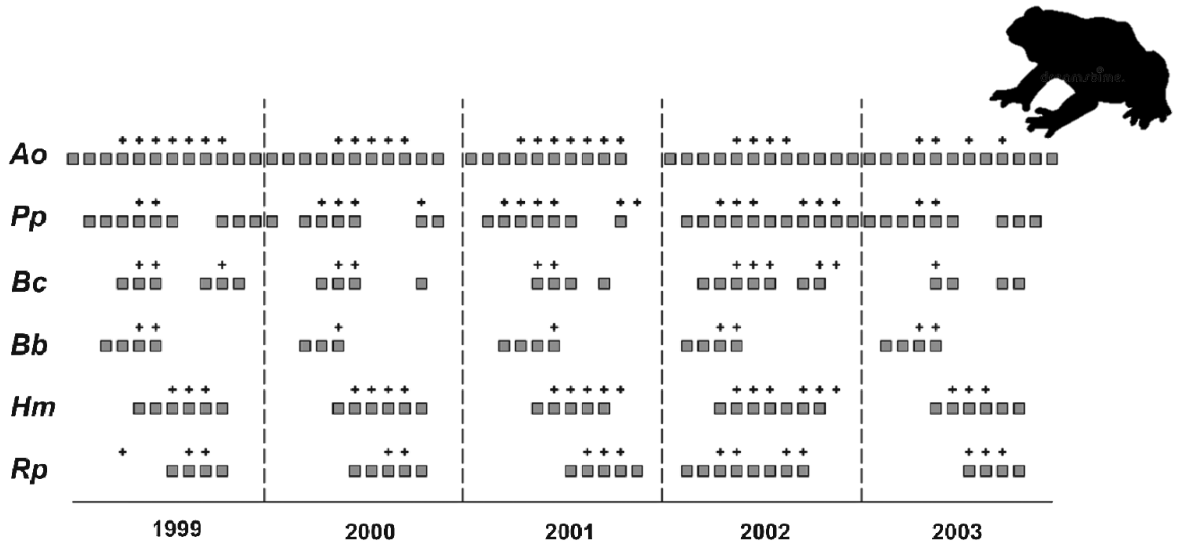


Figure 93. Diagramme montrant la présence ou l'absence de têtards (carrés gris) et la présence de têtards au stade AMA (croix) pour chaque espèce dans une aire méditerranéenne.
AMA = apparition des membres antérieurs, Ao = A. obstetricans, Pp = P. punctatus, Bc = Bufo calamita, Bb = Bufo bufo, Hm = Hyla meridionalis, and Rp = R. perezi. (Richter-Boix et al., 2006)

Enfin, le genre des Alytes est composé d'espèces à affinité méridionale et dont une d'entre-elles (*A. obstetricans*) a pu coloniser des climats plus froids et/ou une altitude plus élevée (Rodríguez-Rodríguez et al., 2020). Il a été récemment suggéré que les niches climatiques des différentes espèces résulteraient de contextes écologiques et d'adaptations climatiques contrastées (Rodríguez-Rodríguez et al., 2020). Par exemple, la physiologie thermophile spécialisée de *A. cisternasii* pourrait expliquer sa faible divergence intraspécifique de niche par rapport à celle de *A. dickhillenni* (Rodríguez-Rodríguez et al., 2020). *A. dickhillenni* présente deux caractéristiques similaires à *A. obstetricans* : les têtards des deux espèces peuvent hiverner et ces espèces sont présentes dans des zones plus froides que les trois autres (Rodríguez-Rodríguez et al., 2020; E. Wells et al., 2015). Il se pourrait alors que ce soit cette stratégie de plasticité de développement qui ait permis à *A. dickhillenni* et *A. obstetricans* de coloniser des niches dans des climats plus froids et/ou à des altitudes plus élevées.

Alytes obstetricans présente donc une stratégie de développement originale. Cependant, les Alytes présentent également une stratégie de reproduction originale avec des SPM exclusifs.

C. Apports et spécificités du modèle Alytes

1. Implications évolutives potentielles

Chez l'Alyte accoucheur, les soins parentaux sont exclusivement mâles. Plusieurs hypothèses ont été proposées quant à la sélection et au maintien des SPM (voir Introduction). Tout d'abord, la fécondation est externe, ce qui ne favorise pas l'émergence des soins maternels (Kahn et al., 2013). Cependant, l'émission des gamètes est plutôt synchrone chez les Alytes accoucheurs ce qui ne semble pas vraiment correspondre à cette hypothèse (Márquez, 1990). La sélection et le maintien des SPM peuvent se faire par le biais de la sélection sexuelle, notamment lorsque l'attractivité des mâles pour les femelles est augmentée lorsqu'ils réalisent des soins parentaux (Gomendio et al., 2008). Les mâles ne voient pas leur attractivité sexuelle augmenter et n'obtiennent pas un meilleur succès à l'éclosion lorsqu'ils ont une taille de ponte plus importante (Márquez, 1993). Ainsi, les connaissances actuelles ne suggèrent pas que les femelles choisissent leur partenaire sur la base d'un signal honnête de la qualité du père. Cependant, des pressions de sélections intersexuelles (Bosch et al., 2010; Márquez, 1995) et intrasexuelles (Verrell & Brown, 1993) ont été décrites chez l'Alyte accoucheur. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour explorer d'autres aspects des SPM chez l'Alyte, comme la qualité des comportements de thermorégulation et d'hydrorégulation par les mâles.

Une autre hypothèse suggère que les SPM puissent être favorisés par une faible probabilité de reproduction future (Owens, 2002). Chez l'Alyte accoucheur, les probabilités de reproduction future semblent élevées puisqu'un mâle peut non seulement porter plusieurs pontes à la fois, mais aussi plusieurs pontes à la suite au cours d'une même saison de reproduction (au moins dans certaines régions). En ce qui concerne les hypothèses de l'anisogamie et de la fécondité augmentée, il est nécessaire de compléter les recherches, notamment afin d'évaluer les coûts de la production des gamètes mâles et femelles, ainsi que de mesurer le temps de production des gamètes femelles et de le comparer au temps de SPM.

Deux hypothèses semblent alors se détacher en ce qui concerne les bénéfices des SPM chez l'Alyte accoucheur. La première est celle liée aux contraintes environnementales et pressions de sélection naturelle associées (Gomendio et al., 2008). En effet, dans cette thèse, une fin de métamorphose plus précoce a été constatée lorsque les jeunes se sont développés sous une température similaire à la préférence thermique mesurée chez les mâles porteurs. Une phénologie précoce peut améliorer l'aptitude sur le long terme (Le Henanff et al., 2013; Wapstra

et al., 2010; Warner & Shine, 2007). De plus, le port des œufs permet d'extraire les jeunes d'un environnement à fort taux de compétition et de prédation (Pearman, 1995) pendant une phase de leur développement où ils sont particulièrement vulnérables. Chez les femelles, l'hypothèse de la manipulation maternelle propose que les comportements parentaux femelles permettent l'amélioration de la qualité des jeunes et les performances individuelles de la femelle peuvent être décisives (Kurdíková et al., 2011). Une seconde hypothèse, celle de la paternité favorisée, pourrait expliquer l'émergence et/ou le maintien des SPM chez l'Alyte accoucheur (Alissa et al., 2017; Bose et al., 2019; Ringler et al., 2017). Le modèle de reproduction des amphibiens prend souvent la forme d'une reproduction aquatique avec fécondation externe (K. D. Wells, 1977), ce qui induit une incertitude de la paternité. Chez les Alytes accoucheurs, la fécondation est externe mais se déroule dans le milieu terrestre, ce qui limite la fécondation des gamètes femelles par les gamètes d'un autre mâle. De plus, la paternité est probablement garantie puisque i) un seul mâle à la fois féconde une femelle et ii) l'oviposition est directement assistée par le mâle (Figure 94) et iii) le mâle s'éloigne avec ses œufs après l'accouplement. Des expérimentations supplémentaires sont cependant nécessaires afin de confirmer les taux de paternité pour valider cette hypothèse.

Des implications évolutives ont donc probablement favorisé l'émergence et le maintien des SPM chez l'Alyte accoucheur mais la réalisation de ces soins est probablement soumise à une influence environnementale.

Figure 94. Amplexus d'Alyte accoucheur.
Un seul mâle se positionne sur le dos de la femelle pour récupérer ses œufs. Le mâle s'éloigne ensuite avec la ponte. © M. Berroneau

2. Influences environnementales et modulation des soins paternels

Les comportements parentaux sont plastiques, notamment en fonction de l'environnement abiotique. Par exemple, les conditions climatiques et/ou la saison peuvent faire varier le type de soins parentaux délivrés. Chez certains amphibiens, ils peuvent alors prendre la forme de soins d'hydratation pendant la saison sèche, et de protection vis-à-vis des prédateurs pendant la saison humide (Lehtinen et al., 2014). La quantité de soins délivrés peut aussi varier en réponse aux variations environnementales (Delia et al., 2013). Enfin, d'autres facteurs abiotiques peuvent impacter la réalisation des soins, comme par exemple la distance à la prochaine mare (Ringler et al., 2013). Les comportements parentaux peuvent aussi être flexibles en fonction de l'environnement biotique. Outre le rôle sélectif de la certitude de paternité dans l'émergence des SPM, ce facteur peut également moduler l'investissement d'un mâle envers des jeunes (Hunt & Simmons, 2002). Par exemple, le taux d'abandon de ses jeunes par un mâle peut être augmenté par la présence de mâles périphériques (traduit de l'anglais, *sneak males*) et par la diminution de la certitude de paternité associée à leur présence (Figure 95).

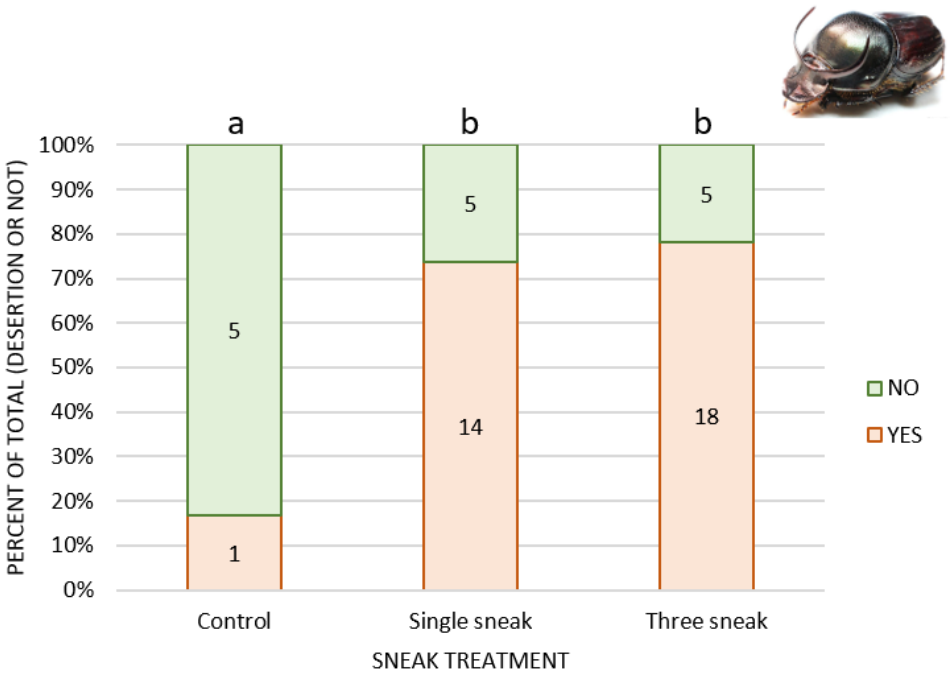


Figure 95. Effet de la présence de mâles périphériques (traduit de l'anglais, sneak males) sur la désertion des mâles de Onthophagus taurus.
Des lettres différentes indiquent une différence statistique avec p < 0.01. [Crédit photo : J. Kim] D'après les données de (Hunt & Simmons, 2002).

Aussi, l'implication du mâle peut être modifiée par le risque de compétition intraspécifique pour le territoire et/ou l'accès aux femelles (Ringler et al., 2013). Dans cette thèse, plusieurs signes d'une thermorégulation active sur le terrain et des effets de l'environnement thermique

sur le développement des jeunes ont été mis en évidence. Des variations individuelles dans l'expression des SPM en fonction des conditions environnementales sont alors attendues.

De plus, l'alyte accoucheur a une répartition géographique large, avec un gradient latitudinal intéressant (Figure 15) ainsi qu'un gradient altitudinal (présent jusqu'à 2400m (Bosch et al., 2009)). Chez les oiseaux, des différences inter populations dans la réalisation des comportements parentaux ont été mises en évidence en fonction de la latitude (Rohwer & Law, 2010). L'investissement des mâles peut également varier chez les oiseaux en fonction de l'altitude (Bruendl, 2017) ; (Figure 96) ou encore de la qualité et de la quantité de l'alimentation disponible (Sofaer et al., 2018; Yoon et al., 2017). Des différences inter populations d'investissement paternel en fonction de la disponibilité alimentaire croisée à l'environnement thermique ont également été observées chez les mammifères (Schradin & Pillay, 2004). Des variations inter-populationnelles des comportements parentaux réalisés par les Alytes accoucheurs en fonction des conditions environnementales sont alors également à prévoir.

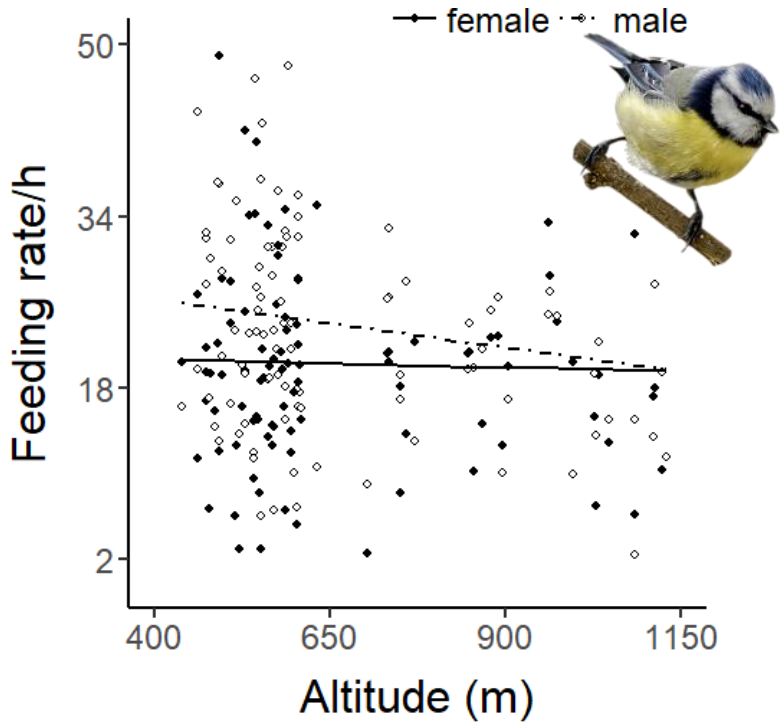


Figure 96. Effet de l'altitude sur l'investissement paternel des mésanges bleues. Taux de nourrissage par heure des femelles (ligne continue) et des mâles (ligne pointillée), en relation avec l'altitude (m ; contrôle de la taille des couvées linéaires et carrées, de la proportion de chenilles livrées et du facteur aléatoire d'identité du nichoir). Sont montrés les lignes prédites du meilleur ajustement et les points des valeurs brutes pour les femelles (cercle plein) et pour les mâles (cercle vide). (Bruendl, 2017)

D. Perspectives

1. Fluctuations thermiques

Les influences thermiques sur les ectothermes sont multiples. Nous avons montré que des différences de régimes thermiques constants influençaient fortement le développement des jeunes. Cependant, l'importance capitale des régimes thermiques fluctuants a également été démontrée chez les ectothermes (Colinet et al., 2015), aussi bien à l'échelle de l'espèce (Kern et al., 2015), qu'à l'échelle de la population (Folguera et al., 2009). Par exemple, en fonction de l'amplitude thermique rencontrée au cours du développement dans le milieu de vie, les individus ne s'adaptent pas de la même manière à différentes amplitudes de régimes thermiques subies plus tard au cours de leur vie (Folguera et al., 2009). Des effets sur les performances de vitesse de retournement, sur la masse et la survie ont pu être observés (Folguera et al., 2009). Les animaux provenant de régions avec une plus grande amplitude thermique se sont ainsi montrés plus résistants à des températures fluctuantes (Folguera et al., 2009) ; (Figure 97).

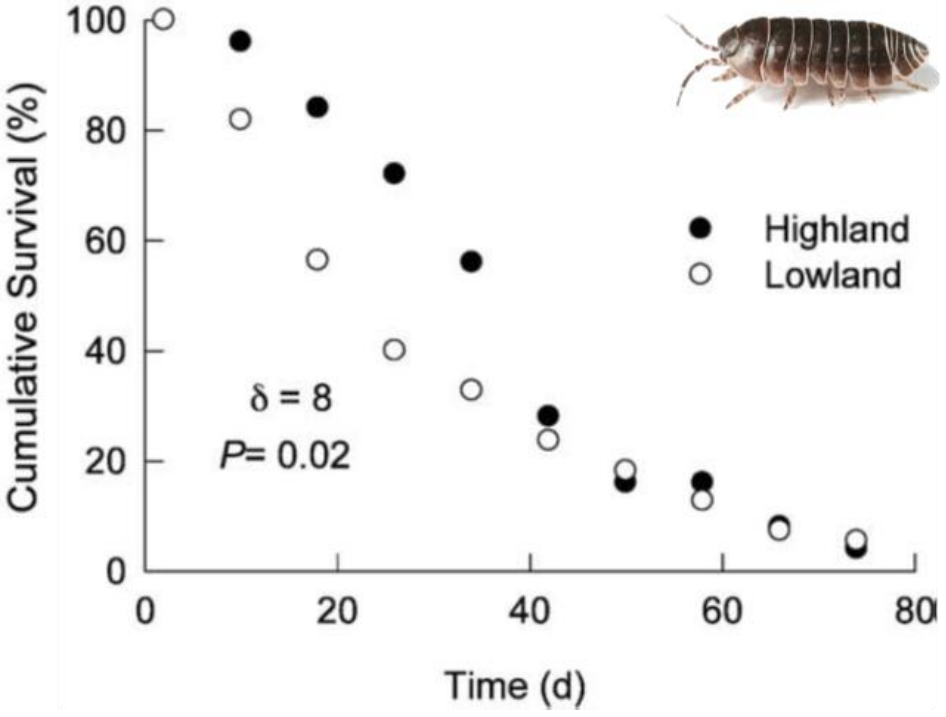


Figure 97. Survie cumulative (%) d'animaux provenant de populations de haute et basse altitudes acclimatés à des conditions expérimentales avec un milieu thermique fluctuant entre 32 et 16°C (24°C ± 8).
La population de haute altitude provient d'un milieu thermique plus fluctuant que la population de basse altitude. La population provenant d'un milieu thermique plus fluctuant se montre plus résistante à un milieu thermique fluctuant. (Folguera et al., 2009)

Les effets de la fluctuation de température peuvent être conséquents à cause de la relation exponentielle existant entre la température et la fréquence cardiaque (Du & Shine, 2010). En effet, cette relation implique qu'à température moyenne similaire, le développement soit plus

rapide dans un régime fluctuant que dans un régime constant car la fréquence cardiaque sera plus rapide lors des passages à une température élevée que dans une relation linéaire (Du & Shine, 2010). Ainsi, les courbes thermiques de performances de développement, qui sont souvent estimées sur la base de régimes thermiques constants, ne sont pas toujours indicatrices de l'influence des variations climatiques (Khelifa et al., 2019). Dans ce contexte, il pourrait alors être intéressant d'étudier les effets d'un environnement fluctuant sur le développement des Alytes accoucheurs.

2. Corrélats physiologiques et hormonaux

L'implication hormonale, dans l'initiation et le maintien des comportements parentaux, chez les mammifères et les oiseaux, a fait l'objet de nombreuses recherches depuis plusieurs dizaines d'années (R. E. Brown, 1985; Buntin, 1996; Knapp et al., 1999). A ce jour, les amphibiens ont suscité un intérêt limité, alors qu'ils présentent la plus grande diversité en comportements parentaux (Schulte & Mayer, 2017). Plusieurs pistes d'implications hormonales sont envisageables : celles des androgènes, des estrogènes et des corticostéroïdes, hormones notamment impliquées dans la régulation des comportements sociaux chez les amphibiens, ou encore l'arginine et la vasotocine chez les mâles (Wilczynski et al., 2005), voire la prolactine et la corticostérone (Moore et al., 2005). En ce qui concerne l'état hormonal des mâles amphibiens pendant la période de soins, chez des espèces à SPM exclusifs, très peu d'informations sont disponibles (Schulte & Mayer, 2017; Ten-Eyck & ul Haq, 2012; Townsend et al., 1991; Townsend & Moger, 1987). Un taux d'androgènes plasmatiques plus bas a été relevé chez les mâles d'une espèce de grenouille pendant la période de soins aux œufs (Townsend & Moger, 1987) ; (Figure 98). Cependant, l'apport de testostérone n'a pas montré d'effet sur le maintien des SPM (Townsend et al., 1991; Townsend & Moger, 1987).

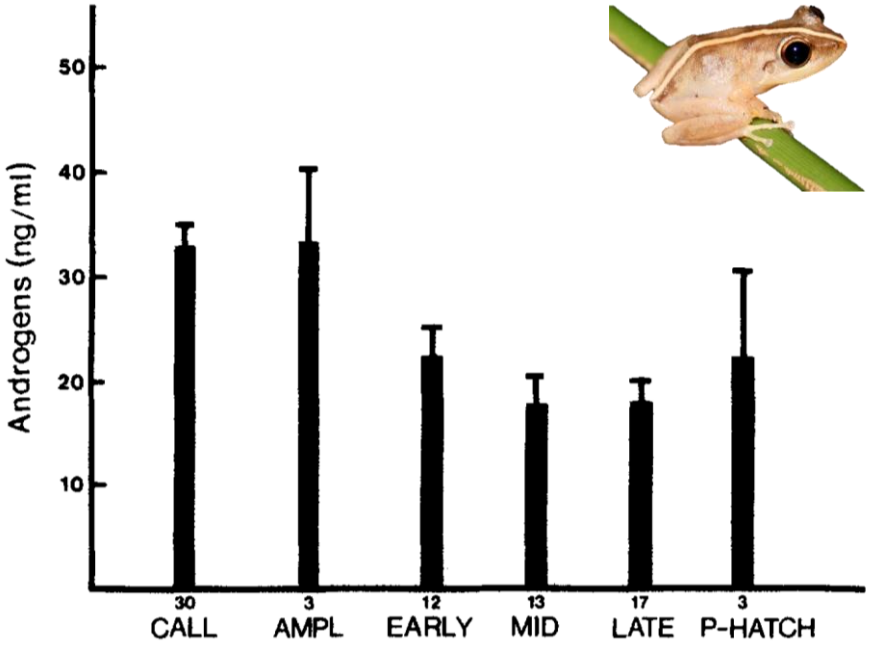


Figure 98. Taux d'androgènes dans le sang de mâle Eleutherodactylus coqui. Le sang a été collecté sur des mâles en vocalisation (CALL), en amplexus (AMPL), avec des œufs au premier tiers (EARLY), au deuxième tiers (MID) et au troisième tiers (LATE) du développement embryonnaire et avec des têtards (P-HATCH). Les barres représentent les valeurs moyennes et les erreurs standards ; les tailles d'échantillonnage sont indiquées sous les barres. [Crédit photo : W. Falcón] (Townsend & Moger, 1987)

L'injection d'arginine-vasotocine n'a pas non plus augmenté l'abandon des œufs par les mâles (Ten-Eyck & ul Haq, 2012). Elle a cependant entrainé une augmentation de l'émission de cris agressifs (Ten-Eyck & ul Haq, 2012). A l'inverse, l'injection d'arginine-vasotocine chez une autre espèce a induit une diminution des soins aux œufs chez les mâles et les femelles (Schulte & Summers, 2017). L'injection de mésotocine a entrainé une diminution du transport des têtards par les mâles (Schulte & Mayer, 2017). L'Alyte accoucheur serait un modèle d'étude pertinent pour étudier les médiateurs physiologiques des comportements paternels mais aussi les coûts physiologiques.

3. Implications de l'habitat et des conditions climatiques

Un lien entre le gradient longitudinal, les variations de ressources alimentaires et la durée des comportements parentaux a été démontré, notamment chez les oiseaux (Russell et al., 2004). Lorsque les ressources alimentaires sont abondantes tout au long de l'année, les espèces présentent souvent des soins parentaux longs sur peu de jeunes (Russell et al., 2004). A l'inverse, lorsque les ressources ne sont abondantes que sur une courte période de l'année, les espèces présentent plutôt des soins parentaux de courte durée sur de nombreux jeunes (Russell et al., 2004). Chez les anoures, c'est un lien entre le niveau de terrestrialité et la durée des soins parentaux qui a été mis en évidence (Vági et al., 2019) ; (Figure 99).

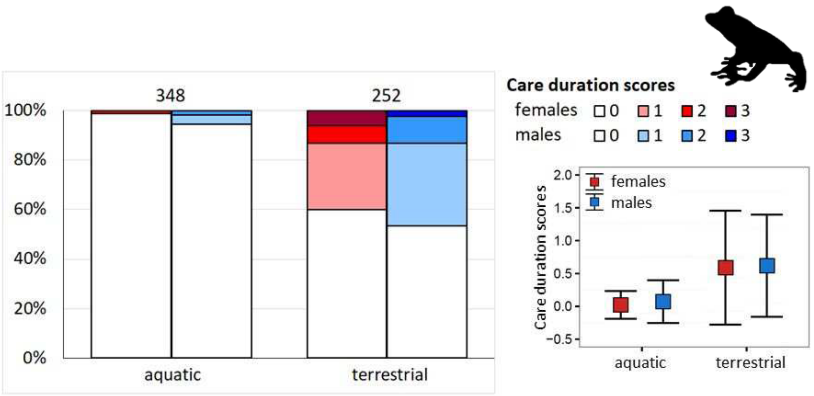


Figure 99. Durée des soins en fonction du milieu de reproduction aquatique ou terrestre et du sexe chez les grenouilles.
Nombre d'espèces réalisant différents scores de durée de soins (à gauche) et degré de scores de durée de soins (moyenne + déviation standard ; à droite). Les colorations bleues représentent les soins parentaux mâles, les colorations rouges les soins parentaux femelles. (Vági et al., 2019)

De plus, une influence de la disponibilité en eau a souvent été constatée. Ainsi, l'utilisation de points d'eau de très petite taille, par des grenouilles poisons néotropicales, a été associée à l'évolution de soins biparentaux avec nourrissage des têtards (J. L. Brown et al., 2008). Dans cet exemple, les soins sont exclusivement mâles dans le cas où de grands points d'eau sont utilisés (J. L. Brown et al., 2008). De la même manière, l'évolution de la reproduction terrestre des crapauds africains a également été reliée au taux d'escarpement de l'habitat et à la disponibilité en eau (Liedtke et al., 2017). Aussi, l'intérêt écologique d'une forme de comportement parental peut être plus ou moins grand en fonction du degré de terrestrialité (Méndez-Narváez et al., 2015). Les microhabitats, créés par la formation de nids de mousse, isolent plus efficacement vis-à-vis d'un gradient thermique plus large, lorsqu'ils sont utilisés dans un habitat terrestre, que dans un habitat aquatique (Méndez-Narváez et al., 2015). De plus, les pressions de sélection s'exerçant sur les œufs ne sont pas les mêmes en fonction de l'habitat. Dans un habitat arboricole, la pression de sélection la plus forte est souvent la dessiccation, alors que dans l'habitat terrestre, le risque de prédation est prédominant (Bickford, 2004). Enfin, les informations phylogénétiques disponibles sur les hylidés et mantellidés suggèrent que la transition vers des soins parentaux plus complexes est souvent accompagnée de changements écologiques (Lehtinen & Nussbaum, 2003). Il existe cinq espèces d'*Alytes* (E. Wells et al., 2015). Celles-ci sont établies dans des régions avec des caractéristiques climatiques propres (Ouest de l'Europe, Méditerranéenne, nord de l'Afrique, insulaire) et elles réalisent toutes des SPM exclusifs (E. Wells et al., 2015). Comparer les modalités de comportements parentaux entre les différentes espèces d'Alytes pourrait apporter des informations complémentaires sur l'évolution des SPM et sur l'implication de l'habitat et des conditions climatiques sur la sélection et le maintien des SPM.

E. Conclusion générale

Les recherches réalisées au cours de cette thèse ont apporté des évidences concrètes de sélection d'habitat par les Alytes accoucheurs. En effet, ils choisissent leurs refuges diurnes en fonction de leurs propriétés hydrique et thermique. Cette thèse est également la première étude mettant en évidence les bénéfices d'une thermorégulation parentale chez une espèce d'amphibiens réalisant des soins parentaux mâles exclusifs avec portage des œufs. Aussi, un compromis proximal entre performances de locomotion et taille de ponte relative a été clairement mis en évidence. Enfin, cette thèse apporte de nouvelles connaissances concernant l'influence croisée de l'environnement au cours du développement. De plus, elle décrit l'implication des modifications de la physiologie (fréquence cardiaque) tout au long des développements embryonnaire et larvaire. Ces multiples résultats permettent d'améliorer les connaissances disponibles au sujet d'une catégorie de soins parentaux peu fréquente, les soins parentaux mâles exclusifs. Ces soins sont d'autant moins fréquents dans la région ouest du Paléarctique, où seuls les membres du taxon Alytes les expriment. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mesurer les préférences thermiques des têtards mais aussi pour identifier de potentiels soins parentaux mâles d'hydrorégulation. Des recherches supplémentaires pourront s'intéresser à l'importance des fluctuations thermiques sur le développement des Alytes accoucheurs, à l'étude des implications hormonales des soins parentaux mâles des Alytes accoucheurs, ou encore évaluer la plasticité des soins parentaux mâles exclusifs des différentes espèces d'Alytes en réponse à leur habitat (gradients latitudinal et longitudinal).

BIBLIOGRAPHIE

Abbey-Lee, R. N., & Dingemanse, N. J. (2019). Adaptive individual variation in phenological responses to perceived predation levels. *Nature Communications*, *10*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09138-5

Ahnesjo, I. (1995). Temperature affects male and female potential reproductive rates differently in the sex-role reversed pipefish, *Syngnathus typhle*. *Behavioral Ecology*, *6*(2), 229–233. https://doi.org/10.1093/beheco/6.2.229

Aïdam, A., Michel, C. L., & Bonnet, X. (2013). Effect of ambient temperature in neonate aspic vipers: growth, locomotor performance and defensive behaviors. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *319*(6), 310–318. https://doi.org/10.1002/jez.1794

Alibardi, L. (2003). Adaptation to the land: the skin of reptiles in comparison to that of amphibians and endotherm amniotes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *298*(1), 12–41. https://doi.org/10.1002/jez.b.24

Alissa, L. M., Muniz, D. G., & Machado, G. (2017). Devoted fathers or selfish lovers? Conflict between mating effort and parental care in a harem-defending arachnid. *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(1), 191–201. https://doi.org/10.1111/jeb.12998

Alonso-Alvarez, C., & Velando, A. (2012). Benefits and costs of parental care. In *The evolution of parental care* (pp. 40–61). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199692576.003.0003

Amiel, J. J., Chua, B., Wassersug, R. J., & Jones, D. R. (2011). Temperature-dependent regulation of blood distribution in snakes. *Journal of Experimental Biology*, *214*(9), 1458–1462. https://doi.org/10.1242/jeb.053934

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. *Ecology and Evolution*, *7*(21), 9066–9075. https://doi.org/10.1002/ece3.3219

Anduaga, S., & Huerta, C. (2001). Effect of parental care on the duration of larval development and offspring survival in *Nicrophorus mexicanus* Matthews (Coleoptera: Silphidae). *The Coleopterists Bulletin*, *55*(3), 264–270. https://doi.org/10.1649/0010-

065x(2001)055[0264:eopcot]2.0.co;2

Angilletta, M. J. (2009). *Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis.* Oxford University Press.

Angilletta, M. J., Cooper, B. S., Schuler, M. S., & Boyles, J. G. (2010). The evolution of thermal physiology in endotherms. *Frontiers in Bioscience - Elite*, *2*, 861–881. https://doi.org/10.2741/e148

Angilletta, M. J., & Sears, M. W. (2003). Is parental care the key to understanding endothermy in birds and mammals? *The American Naturalist*, *162*(6), 821–825. https://doi.org/10.1086/380921

Badyaev, A. V., & Ghalambor, C. K. (2001). Evolution of life histories along elevational gradients: trade-off between parental care and fecundity. *Ecology*, *82*(10), 2948–2960. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[2948:EOLHAE]2.0.CO;2

Basson, C. H., Levy, O., Angilletta, M. J., & Clusella-Trullas, S. (2017). Lizards paid a greater opportunity cost to thermoregulate in a less heterogeneous environment. *Functional Ecology*, *31*(4), 856–865. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12795

Beck, C. W. (1998). Mode of fertilization and parental care in anurans. *Animal Behaviour*, *55*(2), 439–449. https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0619

Beebee, T. J. C., & Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology ? *Biological Conservation*, *125*(3), 271–285. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009

Bickford, D. P. (2004). Differential parental care behaviors of arboreal and terrestrial microhylid frogs from Papua New Guinea. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *55*(4), 402–409. https://doi.org/10.1007/s00265-003-0717-x

Birks, S. M. (1997). Paternity in the Australian brush-turkey, *Alectura lathami*, a megapode bird with uniparental male care. *Behavioral Ecology*, *8*(5), 560–568. https://doi.org/10.1093/beheco/8.5.560

Bleu, J., Gamelon, M., & Sæther, B. E. (2016). Reproductive costs in terrestrial male vertebrates: insights from bird studies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *283*(1823), 20152600. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2600

Blouin-Demers, G., Weatherhead, P. J., & McCracken, H. A. (2003). A test of the thermal coadaptation hypothesis with black rat snakes (*Elaphe obsoleta*) and northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Journal of Thermal Biology*, *28*(4), 331–340. https://doi.org/10.1016/S0306-4565(03)00009-3

Böll, S., & Linsenmair, K. (1998). Size-dependent male reproductive success and size-assortative mating in the midwife toad *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*, *19*(1), 75–89. https://doi.org/10.1163/156853898X00340

Bosch, J., Beebee, T., Schmidt, B., Tejedo, M., Martinez-Solano, I., Salvador, A., Garcia-Paris, M., Gile, R., Arntzen, J. W., Diaz-Paniagua, C., & Marquez, L. C. (2009). Alytes obstetricans (errata version published in 2016). *The IUCN Red List of Threatened Species 2009, e.T55268A8*. https://doi.org/10.2305

Bosch, J., & Márquez, R. (1996). Discriminant functions for sex identification in two midwife toads (*Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*). *Herpetological Journal*, *6*, 105–110.

Bosch, J., Márquez, R., & Eekhout, X. (2010). Intensity of female preference for call source level in midwife toads *Alytes cisternasii* and *A. obstetricans*. *Behaviour*, *147*(9), 1185–1199. https://doi.org/10.1163/000579510X511051

Bose, A. P. H., Lau, M. J., Cogliati, K. M., Neff, B., & Balshine, S. (2019). Cannibalism of young is related to low paternity and nest take-overs in an intertidal fish. *Animal Behaviour*, *153*, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.04.018

Bouazza, A., Slimani, T., El Mouden, H., Blouin-Demers, G., & Lourdais, O. (2016). Thermal constraints and the influence of reproduction on thermoregulation in a high-altitude gecko (*Quedenfeldtia trachyblepharus*). *Journal of Zoology*, *300*(1), 36–44. https://doi.org/10.1111/jzo.12353

Boulenger, G. (1897). *The tailless batrachians of Europe*. Printed for the Ray Society.

Brown, J. L., Morales, V., & Summers, K. (2008). Divergence in parental care, habitat selection and larval life history between two species of Peruvian poison frogs: an experimental analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, *21*(6), 1534–1543. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01609.x

Brown, L. E., & Crespo, E. G. (2000). Burrowing behavior of the midwife toads *Alytes cisternasii* and *Alytes obstetricans* (Anura, Discoglossidae). *Alytes*, *17*(3–4), 101–113.

Brown, R. E. (1985). Hormones and paternal behavior in vertebrates. *American Zoologist*, *25*, 895–910.

Browne, R. K., & Edwards, D. L. (2003). The effect of temperature on the growth and development of the endangered green and golden bell frog (*Litoria aurea*). *Journal of Thermal Biology*, *28*(4), 295–299. https://doi.org/10.1016/S0306-4565(03)00006-8

Bruendl, A. C. (2017). *Parental invesment across an altitudinal gradient in blue tits (*Cyanistes caeruleus*)*. University of Exeter.

Bukhari, S. A., Saul, M. C., James, N., Bensky, M. K., Stein, L. R., Trapp, R., & Bell, A. M. (2019). Neurogenomic insights into paternal care and its relation to territorial aggression. *Nature Communications*, *10*(1), 4437. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12212-7

Buntin, J. D. (1996). Neural and hormonal control of parental behavior in birds. *Advances in the Study of Behavior*, *25*(C), 161–213. https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60333-2

Burger, J. (1989). Incubation temperature has long-term effects on behaviour of young pine snakes (*Pituophis melanoleucus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *24*(4), 201–207. https://doi.org/10.1007/BF00295199

Burggren, W. W., & Infantino, R. L. J. (1994). The respiratory transition from water to air breathing during amphibian metamorphosis. *American Zoologist*, *34*, 238–246. https://doi.org/10.2307/3883689

Burraco, P., Valdés, A. E., & Orizaola, G. (2020). Metabolic costs of altered growth trajectories across life transitions in amphibians. *Journal of Animal Ecology*, *89*(3), 855–866. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13138

Burris, Z. P. (2011). Costs of exclusive male parental care in the sea spider *Achelia simplissima* (Arthropoda: Pycnogonida). *Marine Biology*, *158*(2), 381–390. https://doi.org/10.1007/s00227-010-1566-6

Cambar, R., & Martin, S. (1959). Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du crapaud accoucheur (*Alytes obstetricans*). *Société Linnéenne de Bordeaux*, *98*, 3–91.

Campeny, R., & Casinos, A. (1989). Densities and buoyancy in tadpoles of midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Zoologischer Anzeiger*, *223*(1–2), 6–12.

Cayuela, H., Valenzuela-Sánchez, A., Teulier, L., Martínez-Solano, Í., Léna, J. P., Merilä, J., Muths, E., Shine, R., Quay, L., Denoël, M., Clobert, J., & Schmidt, B. R. (2020). Determinants and consequences of dispersal in vertebrates with complex life cycles: a review of pond-breeding amphibians. *Quarterly Review of Biology*, *95*(1), 1–36. https://doi.org/10.1086/707862

Chen, S., Hong, W., Zhang, Q., Wu, R., & Wang, Q. (2006). Rates of oxygen consumption and tolerance of hypoxia and desiccation in Chinese black sleeper (*Bostrichthys sinensis*) and mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) embryos. *Acta Oceanologica Sinica*, *25*(4), 91–98.

Chen, Y.-H., Yu, H.-T., & Kam, Y.-C. (2007). The ecology of male egg attendance in an arboreal breeding frog, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae), from Taiwan. *Zoological Science*, *24*(5), 434–440. https://doi.org/10.2108/zsj.24.434

Chuang, M.-F., Borzée, A., & Kam, Y. (2019). Attendance to egg clutches by male *Kurixalus eiffingeri* increases hatching success and decreases predation by invasive slugs (*Parmarion martensi*) in Taiwan. *Ethology*, *125*(1), 40–46. https://doi.org/10.1111/eth.12822

Chuang, M.-F., Lee, W.-H., Sun, J.-S., You, C.-H., Kam, Y.-C., & Poo, S. (2017). Predation risk and breeding site value determine male behavior and indirectly affect survivorship of their offspring. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *71*(8), 122. https://doi.org/10.1007/s00265-017-2349-6

Clutton-Brock, T. H. (1991). *The evolution of parental care*. Princeton University Press.

Cody, M. L., & Smallwood, J. A. (1996). *Long-term studies of vertebrate communities*. Academic Press.

Colinet, H., Sinclair, B. J., Vernon, P., & Renault, D. (2015). Insects in fluctuating thermal environments. *Annual Review of Entomology*, *60*(1), 123–140. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021017

Collins, J. P. (1979). Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Ecology*, *60*(4), 738–749. https://doi.org/10.2307/1936611

Consolmagno, R. C., Requena, G. S., Machado, G., & Brasileiro, C. A. (2016). Costs and

benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *70*(5), 785–795. https://doi.org/10.1007/s00265-016-2102-6

Cook, C. L., Ferguson, J. W. H., & Telford, S. R. (2001). Adaptive male parental care in the giant bullfrog, *Pyxicephalus adspersus*. *Journal of Herpetology*, *35*(2), 310–315. https://doi.org/10.2307/1566122

Corben, C. J., Ingram, G. J., & Tyler, M. J. (1974). Gastric brooding: unique form of parental care in an Australian frog. *Science*, *186*(4167), 946–947. https://doi.org/10.1126/science.186.4167.946

Crespi, B., & Semeniuk, C. (2004). Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate reproductive mode. *American Naturalist*, *163*(5), 635–653. https://doi.org/10.1086/382734

Crump, M. L. (1996). Parental care among the amphibia. *Advances in the Study of Behavior*, *25*, 109–144. https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60331-9

Crump, M. L. (2015). Anuran reproductive modes : evolving perspectives. *Journal of Herpetology*, *49*(1), 1–16. https://doi.org/10.1670/14-097

da Silva, F. R., Almeida-Neto, M., do Prado, V. H. M., Haddad, C. F. B., & de Cerquira Rossa-Feres, D. (2012). Humidity levels drive reproductive modes and phylogenetic diversity of amphibians in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, *39*(9), 1720–1732. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02726.x

Damme, R. Van, Bauwens, D., Braña, F., & Verheyen, R. F. (1992). Incubation temperature differentially affects hatching time, egg survival, and hatchling performance in the lizard *Podarcis muralis*. In *Herpetologica* (Vol. 48, pp. 220–228). Allen PressHerpetologists' League. https://doi.org/10.2307/3892675

Dawkins, R., & Carlisle, T. R. (1976). Parental investment, mate desertion and a fallacy. *Nature*, *262*(5564), 131–133. https://doi.org/10.1038/260170a0

de Cian, E., Lanzi, E., & Roson, R. (2013). Seasonal temperature variations and energy demand: A panel cointegration analysis for climate change impact assessment. *Climatic Change*, *116*(3–4), 805–825. https://doi.org/10.1007/s10584-012-0514-5

Delia, J. R. J., Bravo-Valencia, L., & Warkentin, K. M. (2017). Patterns of parental care in Neotropical glassfrogs: fieldwork alters hypotheses of sex-role evolution. *Journal of*

Evolutionary Biology, *30*(5), 898–914. https://doi.org/10.1111/jeb.13059

Delia, J. R. J., Ramirez-Bautista, A., & Summers, K. (2013). Parents adjust care in response to weather conditions and egg dehydration in a Neotropical glassfrog. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *67*(4), 557–569. https://doi.org/10.1007/s00265-013-1475-z

Delia, J. R. J., Ramírez-Bautista, A., & Summers, K. (2014). Glassfrog embryos hatch early after parental desertion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1785), 20133237. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3237

DeNardo, D. F., Lourdais, O., & Stahlschmidt, Z. R. (2012). Are females maternal manipulators, selfish mothers, or both? Insight from pythons. *Herpetologica*, *68*(3), 299–307. https://doi.org/10.1655/herpetologica-d-12-00023.1

Dickerson, B. R., Brinck, K. W., Willson, M. F., Bentzen, P., & Quinn, T. P. (2005). Relative importance of salmon body size and arrival time at breeding grounds to reproductive success. *Ecology*, *86*(2), 347–352. https://doi.org/10.1890/03-625

Dodd, C. K. (2010). *Amphibian ecology and conservation : a handbook of techniques*. Oxford University Press.

Domínguez-López, M. E., Kacoliris, F. P., & Simoy, M. V. (2018). Escape behavior in gravid and non-gravid females of *Gonatodes albogularis* (Squamata: Sphaerodactylidae). *Phyllomedusa*, *17*(1), 73–81. https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v17i1p73-81

Downie, J. R., Robinson, E., Linklater-McLennan, R. J., Somerville, E., & Kamenos, N. (2005). Are there costs to extended larval transport in the Trinidadian stream frog, *Mannophryne trinitatis* (Dendrobatidae)? *Journal of Natural History*, *39*(22), 2023–2034. https://doi.org/10.1080/00222930400026985

Du, W. G., Lu, Y. W., & Shen, J. Y. (2005). The influence of maternal thermal environments on reproductive traits and hatchling traits in a Lacertid lizard, *Takydromus septentrionalis*. *Journal of Thermal Biology*, *30*(2), 153–161. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.09.005

Du, W. G., & Shine, R. (2010). Why do the eggs of lizards (*Bassiana duperreyi*: Scincidae) hatch sooner if incubated at fluctuating rather than constant temperatures? *Biological Journal of the Linnean Society*, *101*(3), 642–650. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01525.x

Du, W. G., Ye, H., Zhao, B., Warner, D. A., & Shine, R. (2010). Thermal acclimation of heart rates in reptilian embryos. *PLoS ONE*, *5*(12), e15308. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015308

Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University press.

Dugas, M. B., Wamelink, C. N., Killius, A. M., & Richards-Zawacki, C. L. (2016). Parental care is beneficial for offspring, costly for mothers, and limited by family size in an egg-feeding frog. *Behavioral Ecology*, *27*(2), 476–483. https://doi.org/10.1093/beheco/arv173

Dugas, M. B., Wamelink, C. N., & Richards-Zawacki, C. L. (2015). Both sexes pay a cost of reproduction in a frog with biparental care. *Biological Journal of the Linnean Society*, *115*(1), 211–218. https://doi.org/10.1111/bij.12461

Dulac, C., O'Connell, L. A., & Wu, Z. (2014). Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science*, *345*(6198), 765–770. https://doi.org/10.1126/science.1253291

Dupoué, A., Stahlschmidt, Z. R., Michaud, B., & Lourdais, O. (2015). Physiological state influences evaporative water loss and microclimate preference in the snake *Vipera aspis*. *Physiology and Behavior*, *144*, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.042

Durant, S. E., Willson, J. D., & Carroll, R. B. (2019). Parental effects and climate change: will avian incubation behavior shield embryos from increasing environmental temperatures? *Integrative and Comparative Biology*, *59*(4), 1068–1080. https://doi.org/10.1093/icb/icz083

Dvořák, J., & Gvoždík, L. (2009). Oviposition preferences in newts: does temperature matter? *Ethology*, *115*(6), 533–539. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2009.01633.x

Eens, M., & Pinxten, R. (2000). Sex-role reversal in vertebrates: behavioural and endocrinological accounts. *Behavioural Processes*, *51*(1–3), 135–147. https://doi.org/10.1016/S0376-6357(00)00124-8

Elphick, M. J., & Shine, R. (1998). Longterm effects of incubation temperatures on the morphology and locomotor performance of hatchling lizards (*Bassiana duperreyi*, Scincidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, *63*(3), 429–447. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1998.tb01527.x

Eme, J., Mueller, C. A., Manzon, R. G., Somers, C. M., Boreham, D. R., & Wilson, J. Y. (2015). Critical windows in embryonic development: shifting incubation temperatures alter heart

rate and oxygen consumption of Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) embryos and hatchlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *179*, 71–80. https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2014.09.005

Engelmann, W. E., Fritzsche, J., & Obst, F. J. (1985). *Lurche und Kriechtiere Europas*. Beobachten und bestimmen.

Eyck, H. J. F., Buchanan, K. L., Crino, O. L., & Jessop, T. S. (2019). Effects of developmental stress on animal phenotype and performance: a quantitative review. *Biological Reviews*, *94*(3), 1143–1160. https://doi.org/10.1111/brv.12496

Farmer, C. G. (2000). Parental care: the key to understanding endothermy and other convergent features in birds and mammals. *The American Naturalist*, *155*(3), 326–334. https://doi.org/10.1086/303323

Fernandes, T. L., Antoniazzi, M. M., Sasso-Cerri, E., Egami, M. I., Lima, C., Rodrigues, M. T., & Jared, C. (2011). Carrying progeny on the back: reproduction in the Brazilian aquatic frog *Pipa carvalhoi*. *South American Journal of Herpetology*, *6*(3), 161–176. https://doi.org/10.2994/057.006.0302

Fernández-Beaskoetxea, S., Carrascal, L. M., Fernández-Loras, A., Fisher, M. C., & Bosch, J. (2015). Short term minimum water temperatures determine levels of infection by the amphibian chytrid fungus in *Alytes obstetricans* tadpoles. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120237

Folguera, G., Bastías, D. A., & Bozinovic, F. (2009). Impact of experimental thermal amplitude on ectotherm performance: adaptation to climate change variability? *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *154*(3), 389–393. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.07.008

Forster, J., Hirst, A. G., & Woodward, G. (2011). Growth and development rates have different thermal responses. *American Naturalist*, *178*(5), 668–678. https://doi.org/10.1086/662174

Foucart, T., Heulin, B., & Lourdais, O. (2018). Small changes, big benefits: testing the significance of maternal thermoregulation in a lizard with extended egg retention. *Biological Journal of the Linnean Society*, *125*(2), 280–291. https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly105

Franklin, A. M., & Stuart-Fox, D. (2017). Single and multiple mating reduces longevity of

female dumpling squid (*Euprymna tasmanica*). *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(5), 977–984. https://doi.org/10.1111/jeb.13063

Fritzsch, B. (1990). The evolution of metamorphosis in amphibians. *Journal of Neurobiology*, *21*(7), 1011–1021. https://doi.org/10.1002/neu.480210707

Furness, A. I., & Capellini, I. (2019). The evolution of parental care diversity in amphibians. *Nature Communications*, *10*(1), 4709. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12608-5

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. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1360*(1), 75–100. https://doi.org/10.1111/nyas.12835

Gilbert, J. D. J., & Manica, A. (2015). The evolution of parental care in insects: a test of current hypotheses. *Evolution*, *69*(5), 1255–1270. https://doi.org/10.1111/evo.12656

Gilbert, J. D. J., Thomas, L. K., & Manica, A. (2010). Quantifying the benefits and costs of parental care in assassin bugs. *Ecological Entomology*, *35*(5), 639–651. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01221.x

Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, *293*(5538), 2248–2251. https://doi.org/10.1126/science.1061967

Gillooly, J. F., Charnov, E. L., West, G. B., Savage, V. M., & Brown, J. H. (2002). Effects of size and temperature on developmental time. *Nature*, *417*(6884), 70–73. https://doi.org/10.1038/417070a

Goldstein, J. A., von Seckendorr Hoff, K., & Hillyard, S. D. (2017). The effect of temperature on development and behaviour of relict leopard frog tadpoles. *Conservation Physiology*, *5*(1), 1–8. https://doi.org/10.1093/conphys/cow075

Gomendio, M., García-González, F., Reguera, P., & Rivero, A. (2008). Male egg carrying in *Phyllomorpha laciniata* is favoured by natural not sexual selection. *Animal Behaviour*, *75*(3), 763–770. https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2006.12.029

Gonçalves, H., Maia-Carvalho, B., Sousa-Neves, T., García-París, M., Sequeira, F., Ferrand, N., & Martínez-Solano, I. (2015). Multilocus phylogeography of the common midwife toad, *Alytes obstetricans* (Anura, Alytidae): contrasting patterns of lineage diversification and genetic structure in the Iberian refugium. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *93*,

363–379. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.08.009

Goodman, R. M., & Walguarnery, J. W. (2007). Incubation temperature modifies neonatal thermoregulation in the lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *307*(8), 439–448. https://doi.org/10.1002/jez.397

Gorman, H. E., & Nager, R. G. (2004). Prenatal developmental conditions have long–term effects on offspring fecundity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *271*(1551), 1923–1928. https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2799

Graitson, E., & Naulleau, G. (2005). Les abris artificiels : un outil pour les inventaires herpétologiques et le suivi des populations de reptiles. *Bulletin de La Société Herpétologique Française*, *115*, 5–22.

Grant, B. W., Tucker, A. D., Lovich, J. E., Mills, A. M., Dixon, P. M., & Gibbons, J. W. (1992). The use of coverboads in estimating patterns of reptile and amphibian biodiversity. *Wildlife 2001: Populations*, 379–403.

Green, J. A. (2011). The heart rate method for estimating metabolic rate: review and recommendations. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *158*(3), 287–304. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.09.011

Gross, M. R. (2005). The evolution of parental care. *The Quarterly Review of Biology*, *80*(1), 37–45. https://doi.org/10.1086/431023

Gross, M. R., & Shine, R. (1981). Parental care and mode of fertilization in ectothermic vertebrates. *Evolution*, *35*(4), 775. https://doi.org/10.2307/2408247

Gruda, N. (2008). The effect of wood fiber mulch on water retention, soil temperature and growth of vegetable plants. *Journal of Sustainable Agriculture*, *32*(4), 629–643. https://doi.org/10.1080/10440040802395049

Gururaja, K. V., Dinesh, K. P., Priti, H., & Ravikanth, G. (2014). Mud-packing frog: a novel breeding behaviour and parental care in a stream dwelling new species of *Nyctibatrachus* (Amphibia, Anura, Nyctibatrachidae). *Zootaxa*, *3796*(1), 33–61. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3796.1.2

Guyétant, R. (1975). *Etude des interactions intraspécifiques chez les têtards de quelques amphibiens anoures . Conséquences physiologiques*. Université de Besançon.

Halliday, T. R., & Verrell, P. A. (1988). Body size and age in amphibians and reptiles. *Journal of Herpetology*, *22*(3), 253. https://doi.org/10.2307/1564148

Hallson, L. R., & Björklund, M. (2012). Selection in a fluctuating environment leads to decreased genetic variation and facilitates the evolution of phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*, *25*(7), 1275–1290. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02512.x

Hampton, P. (2007). A comparison of the success of artificial cover types for capturing amphibians and reptiles. *Amphibia-Reptilia*, *28*(3), 433–437. https://doi.org/10.1163/156853807781374809

Hanley, D. (2013). Eggshell conspicuousness is related to paternal brood patch vascularisation in the American thrashers. *Avian Biology Research*, *6*(2), 163–177. https://doi.org/10.3184/175815513X665926

Hayward, A., & Gillooly, J. F. (2011). The cost of sex: quantifying energetic investment in gamete production by males and females. *PLoS ONE*, *6*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016557

Heard, G. W., Robertson, P., & Scroggie, M. P. (2008). Microhabitat preferences of the endangered growling grass frog *Litoria raniformis* in southern Victoria. *Australian Zoologist*, *34*(3), 414–425. https://doi.org/10.7882/AZ.2008.019

Hepp, G. R., Kennamer, R. A., & Johnson, M. H. (2006). Maternal effects in Wood ducks: incubation temperature influences incubation period and neonate phenotype. *Functional Ecology*, *20*(2), 308–314. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01108.x

Heyer, R., Donnelly, M. A., Foster, M., & Mcdiarmid, R. (2014). *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonia Institution.

Hoare, J. M., O'Donnell, C. F. J., Westbrooke, I., Hodapp, D., & Lettink, M. (2009). Optimising the sampling of skinks using artificial retreats based on weather conditions and time of day. *Applied Herpetology*, *6*(4), 379–390. https://doi.org/10.1163/157075309X12531848432985

Hornick, J. ., Van Eenaeme, C., Gérard, O., Dufrasne, I., & Istasse, L. (2000). Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domestic Animal Endocrinology*, *19*(2), 121–132. https://doi.org/10.1016/S0739-7240(00)00072-2

Hourdry, J., L'Hermite, A., & Ferrand, R. (1996). Changes in the digestive tract and feeding behavior of anuran amphibians during metamorphosis. *Physiological Zoology*, *69*(2), 219–251. https://doi.org/10.1086/physzool.69.2.30164181

Huang, W. S., & Pike, D. A. (2013). Testing cost-benefit models of parental care evolution using lizard populations differing in the expression of maternal care. *PLoS ONE*, *8*(2), e54065. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054065

Huey, R. B., Berrigan, D., Gilchrist, G. W., & Herron, J. C. (1999). Testing the adaptive significance of acclimation: a strong inference approach. *American Zoologist*, *39*(2), 323–336. https://doi.org/10.1093/icb/39.2.323

Huey, R. B., & Slatkin, M. (1976). Cost and benefits of lizard thermoregulation. *The Quarterly Review of Biology*, *51*(3), 363–384. https://doi.org/10.1086/409470

Hunt, J., & Simmons, L. W. (2002). Confidence of paternity and paternal care: covariation revealed through the experimental manipulation of the mating system in the beetle *Onthophagus taurus*. *Journal of Evolutionary Biology*, *15*(5), 784–795. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00442.x

Isaac, L. A., & Gregory, P. T. (2004). Thermoregulatory behaviour of gravid and non-gravid female grass snakes (*Natrix natrix*) in a thermally limiting high-latitude environment. *Journal of Zoology*, *264*(4), 403–409. https://doi.org/10.1017/S095283690400593X

Janzen, F. J., Ast, J. C., & Paukstis, G. L. (1995). Influence of the hydric environment and clutch on eggs and embryos of two sympatric Map Turtles. *Functional Ecology*, *9*(6), 913–922. https://doi.org/10.2307/2389990

Jobling, M. (1996). Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. In *Global Warming. Implications for freshwater and marine fish.* (pp. 225–254). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511983375

Jones, S. C., & Munn, A. (2015). Long-term changes in food availability mediate the effects of temperature on growth, development and survival in striped marsh frog larvae: implications for captive breeding programmes. *Conservation Physiology*, *3*(1), cov029. https://doi.org/10.1093/conphys/cov029

Kahn, A. T., Schwanz, L. E., & Kokko, H. (2013). Paternity protection can provide a kick-start for the evolution of male-only parental care. *Evolution*, *67*(8), 2207–2217.

https://doi.org/10.1111/evo.12103

Kaplan, R. H. (1985). Maternal influences on offspring development in the California newt, *Taricha torosa*. *Copeia*, *1985*(4), 1035. https://doi.org/10.2307/1445258

Kaplan, R. H., & Phillips, P. C. (2006). Ecological and developmental context of natural selection: maternal effects and thermally induced plasticity in the frog *Bombina orientalis*. *Evolution*, *60*(1), 142–156. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01089.x

Kawecki, T. J. (2000). The evolution of genetic canalization under fluctuating selection. *Evolution*, *54*(1), 1–12. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00001.x

Kern, P., Cramp, R. L., & Franklin, C. E. (2015). Physiological responses of ectotherms to daily temperature variation. *The Journal of Experimental Biology*, *218*(19), 3068–3076. https://doi.org/10.1242/jeb.123166

Khelifa, R., Blanckenhorn, W. U., Roy, J., Rohner, P. T., & Mahdjoub, H. (2019). Usefulness and limitations of thermal performance curves in predicting ectotherm development under climatic variability. *Journal of Animal Ecology*, *88*(12), 1901–1912. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13077

Kight, S. L., Batino, M., & Zhang, Z. (2006). Temperature-dependent parental investment in the giant waterbug *Belostoma flumineum* (Heteroptera: Belostomatidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *93*(2), 340–342. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[0340:tdpiit]2.0.co;2

Kingsolver, J., & Huey, R. B. (2008). Size, temperature, and fitness: three rules. *Evolutionary Ecology Research*, *10*, 251–268.

Klug, H., & Bonsall, M. B. (2009). Life history and the evolution of parental care. *Evolution*, *64*(3), 823–835. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00854.x

Klug, H., & Bonsall, M. B. (2014). What are the benefits of parental care? The importance of parental effects on developmental rate. *Ecology and Evolution*, *4*(12), 2330–2351. https://doi.org/10.1002/ece3.1083

Knapp, R., Wingfield, J. C., & Bass, A. H. (1999). Steroid hormones and paternal care in the plainfin midshipman fish (*Porichthys notatus*). *Hormones and Behavior*, *89*(35), 81–89. https://doi.org/10.1006/hbeh.1998.1499

Köhler, A., Sadowska, J., Olszewska, J., Trzeciak, P., Berger-Tal, O., & Tracy, C. R. (2011). Staying warm or moist? Operative temperature and thermal preferences of common frogs (*Rana temporaria*), and effects on locomotion. *The Herpetological Journal*, *21*(1), 17–26.

Kokko, H., & Jennions, M. D. (2008). Parental investment, sexual selection and sex ratios. *Journal of Evolutionary Biology*, *21*(4), 919–948. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01540.x

Kurdíková, V., Smolinský, R., & Gvoždík, L. (2011). Mothers matter too: benefits of temperature oviposition preferences in newts. *PLoS ONE*, *6*(8), e23842. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023842

Kvarnemo, C. (2006). Evolution and maintenance of male care: is increased paternity a neglected benefit of care? *Behavioral Ecology*, *17*(1), 144–148. https://doi.org/10.1093/beheco/ari097

Ladyman, M., Bonnet, X., Lourdais, O., Bradshaw, D., & Naulleau, G. (2003). Gestation, thermoregulation, and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: evidence for fecundity-independent costs. *Physiological and Biochemical Zoology*, *76*(4), 497–510. https://doi.org/10.1086/376420

Lange, L., Brischoux, F., & Lourdais, O. (2020). Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties. *Amphibia-Reptilia*, *41*(2), 275–280. https://doi.org/10.1163/15685381-20201246

Lantyer-Silva, A. S. F., Solé, M., & Zina, J. (2014). Reproductive biology of a bromeligenous frog endemic to the Atlantic Forest: *Aparasphenodon arapapa* Pimenta, Napoli and Haddad, 2009 (Anura: Hylidae). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *86*(2), 867–880. https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130521

Latham, D., & Knowles, M. (2008). Assessing the use of artificial hibernacula by great crested newts *Triturus cristatus* and other amphibians for habitat enhancement, Northumberland, England. *Conservation Evidence*, *5*, 74–79.

Le Galliard, J.-F., Le Bris, M., & Clobert, J. (2003). Timing of locomotor impairment and shift in thermal preferences during gravidity in a viviparous lizard. *Functional Ecology*, *17*(6), 877–885. https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2003.00800.x

Le Henanff, M., Meylan, S., & Lourdais, O. (2013). The sooner the better: reproductive

phenology drives ontogenetic trajectories in a temperate squamate (*Podarcis muralis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, *108*(2), 384–395. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.02005.x

Lehtinen, R. M., Green, S. E., & Pringle, J. L. (2014). Impacts of paternal care and seasonal change on offspring survival: a multiseason experimental study of a Caribbean frog. *Ethology*, *120*(4), 400–409. https://doi.org/10.1111/eth.12215

Lehtinen, R. M., & Nussbaum, R. A. (2003). Parental care: a phylogenetic perspective. In *Reproductive biology and phylogeny of Anura* (pp. 343–386). Science Publishers.

Lettink, M., & Cree, A. (2007). Relative use of three types of artificial retreats by terrestrial lizards in grazed coastal shrubland, New Zealand. *Applied Herpetology*, *4*(3), 227–243. https://doi.org/10.1163/157075407781268336

Li, M. A., Zhihua, L. I. N., Jianfang, G. A. O., Hong, L. I., Xiang, J. I., & Hongliang, L. U. (2018). Maternal thermal effects on female reproduction and hatchling phenotype in the chinese skink (*Plestiodon chinensis*). *Asian Herpetological Research*, *9*(4), 250–257. https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.180056

Liedtke, H. C., Muller, H., Hafner, J., Penner, J., Gower, D. J., Mazuch, T., Rodel, M.-O., & Loader, S. P. (2017). Terrestrial reproduction as an adaptation to steep terrain in African toads. *Proceedings of the Royal Society B*, *284*, 1–9. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2598

Lillywhite, H. B. (2006). Water relations of tetrapod integument. *The Journal of Experimental Biology*, *209*(2), 202–226. https://doi.org/10.1242/jeb.02007

Lin, C. X., Zhang, L., & Ji, X. (2008). Influence of pregnancy on locomotor and feeding performances of the skink, *Mabuya multifasciata*: why do females shift thermal preferences when pregnant? *Zoology*, *111*(3), 188–195. https://doi.org/10.1016/j.zool.2007.06.005

Lind, J., & Cresswell, W. (2005). Determining the fitness consequences of antipredation behavior. *Behavioral Ecology*, *16*(5), 945–956. https://doi.org/10.1093/beheco/ari075

Lion, M. B., Mazzochini, G. G., Garda, A. A., Lee, T. M., Bickford, D., Costa, G. C., & Fonseca, C. R. (2019). Global patterns of terrestriality in amphibian reproduction. *Global Ecology and Biogeography*, *January 2018*, 1–13. https://doi.org/10.1111/geb.12886

Lissåker, M., & Kvarnemo, C. (2006). Ventilation or nest defense - Parental care trade-offs in a fish with male care. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *60*(6), 864–873. https://doi.org/10.1007/s00265-006-0230-0

Loman, J. (2002). Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *Journal of Zoology*, *258*, 115–129. https://doi.org/10.1017/S0952836902001255

Lorioux, S., DeNardo, D. F., Gorelick, R., & Lourdais, O. (2012). Maternal influences on early development: preferred temperature prior to oviposition hastens embryogenesis and enhances offspring traits in the Children's python, *Antaresia childreni*. *The Journal of Experimental Biology*, *215*(8), 1346–1353. https://doi.org/10.1242/jeb.059113

Lorioux, S., Lisse, H., & Lourdais, O. (2013). Dedicated mothers: predation risk and physical burden do not alter thermoregulatory behaviour of pregnant vipers. *Animal Behaviour*, *86*(2), 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. (2013). Stage dependence of phenotypical and phenological maternal effects: insight into squamate reptile reproductive strategies. *The American Naturalist*, *182*(2), 223–233. https://doi.org/10.1086/670809

Lourdais, O., Bonnet, X., & Doughty, P. (2002). Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal of Experimental Zoology*, *292*(5), 487–493. https://doi.org/10.1002/jez.10065

Lourdais, O., Heulin, B., & Denardo, D. F. (2008). Thermoregulation during gravidity in the children's python (*Antaresia childreni*): a test of the preadaptation hypothesis for maternal thermophily in snakes. *Biological Journal of the Linnean Society*, *93*(3), 499–508. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00925.x

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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *189*, 102–106. https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2015.07.019

Lourdais, O., Shine, R., Bonnet, X., Guillon, M., & Naulleau, G. (2004). Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*, *104*(3), 551–560. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12961.x

Maciel, T., & Juncá, F. (2009). Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema diplolister* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura). *Zoologia (Curitiba)*, *26*(3), 413–418. https://doi.org/10.1590/S1984-46702009000300005

Maia-Carvalho, B., Gonçalves, H., Ferrand, N., & Martínez-Solano, I. (2014). Multilocus assessment of phylogenetic relationships in alytes (anura, alytidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *79*(1), 270–278. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.05.033

Marconato, A., Bisazza, A., & Fabris, M. (1993). The cost of parental care and egg cannibalism in the river bullhead, *Cottus gobio L.* (Pisces, Cottidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *32*(4), 229–237. https://doi.org/10.1007/BF00166512

Márquez, R. (1990). *Male parental care, sexual selection and the mating system of the midwife toads* Alytes obstetricans *and* Alytes cisternasii. The university of Chicago.

Márquez, R. (1992). Terrestrial paternal care and short breeding seasons: reproductive phenology of the midwife toads *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*. *Ecography*, *15*(3), 279–288. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1992.tb00036.x

Márquez, R. (1993). Male reproductive success in two midwife toads, *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *32*(4), 283–291. https://doi.org/10.1007/BF00166518

Márquez, R. (1995). Female choice in the midwife toads (*Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*). *Behaviour*, *132*(1), 151–161. https://doi.org/10.1163/156853995X00342

Martin, R. (2004). *Biodiversité génétique et structurelle chez* Rana temporaria L. *(Amphibia : Anura) : approche intégrative le long d'un gradient altitudinal*. Université Savoie Mont-Blanc.

Mathies, T., & Andrews, R. M. (1997). Influence of pregnancy on the thermal biology of the lizard, *Sceloporus jarrovi* : why do pregnant females exhibit low body temperatures? *Functional Ecology*, *11*(4), 498–507. https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1997.00119.x

Méndez-Narváez, J., Flechas, S. V., & Amézquita, A. (2015). Foam nests provide context-dependent thermal insulation to embryos of three leptodactylid frogs. *Physiological and Biochemical Zoology*, *88*(3), 246–253. https://doi.org/10.1086/680383

Merilä, J., Laurila, A., Laugen, A. T., & Räsänen, K. (1999). Heads or tails ? Variation in tadpole body proportions in response to temperature and food stress. In *Evolutionary Ecology Research* (Vol. 6, Issue 5). Evolutionary Ecology.

Michael, D. R., Blanchard, W., Scheele, B. C., & Lindenmayer, D. B. (2018). Comparative use of active searches and artificial refuges to detect amphibians in terrestrial environments. *Austral Ecology*. https://doi.org/10.1111/aec.12677

Michael, D. R., Lunt, I. D., & Robinson, W. A. (2004). Enhancing fauna habitat in grazed native grasslands and woodlands: use of artificially placed log refuges by fauna. *Wildlife Research*, *31*(1), 65–71. https://doi.org/10.1071/WR02106

Mihaila, C., Schramm, J., Strathmann, F. G., Lee, D. L., Gelein, R. M., Luebke, A. E., & Mayer-Pröschel, M. (2011). Identifying a window of vulnerability during fetal development in a maternal iron restriction model. *PLoS ONE*, *6*(3), e17483. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017483

Milne, T., Bull, M. C., & Hutchinson, M. N. (2003). Fitness of the endangered Pygmy Blue Tongue Lizard *Tiliqua adelaidensis* in artificial burrows. *Journal of Herpetology*, *37*(4), 762–766. https://doi.org/10.1670/38-03N

Miner, B. G., Sultan, S. E., Morgan, S. G., Padilla, D. K., & Relyea, R. A. (2005). Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, *20*(12), 685–692. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.002

Mitchell, A., & Bergmann, P. J. (2016). Thermal and moisture habitat preferences do not maximize jumping performance in frogs. *Functional Ecology*, *30*(5), 733–742. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12535

Monaghan, P. (2008). Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1497), 1635–1645. https://doi.org/10.1098/rstb.2007.0011

Monteiro, N. M., Almada, V. C., & Vieira, M. N. (2005). Implications of different brood pouch structures in syngnathid reproduction. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *85*(5), 1235–1241. https://doi.org/10.1017/S0025315405012373

Moore, F. L., Boyd, S. K., & Kelley, D. B. (2005). Historical perspective: hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Hormones and Behavior*, *48*(4), 373–383.

https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.05.011

Munguía-Steyer, R., González-García, E., Castaños, C. E., & Córdoba-Aguilar, A. (2019). Costly parenting: physiological condition over time and season in males of the giant waterbug *Abedus dilatatus*. *Physiological Entomology*, *44*(3–4), 236–244. https://doi.org/10.1111/phen.12299

Nazareth, T. M., & Machado, G. (2010). Mating system and exclusive postzygotic paternal care in a Neotropical harvestman (Arachnida : Opiliones). *Animal Behaviour*, *79*(3), 547–554. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.11.026

Niehaus, A. C., Wilson, R. S., & E, F. C. (2006). Short- and long-term consequences of thermal variation in the larval environment of anurans. *Journal of Animal Ecology*, *75*(3), 686–692. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01089.x

Osbourn, M. S., Connette, G. M., & Semlitsch, R. D. (2014). Effects of fine-scale forest habitat quality on movement and settling decisions in juvenile pond-breeding salamanders. *Ecological Applications*, *24*(7), 1719–1729.

Owens, I. P. F. (2002). Male–only care and classical polyandry in birds: phylogeny, ecology and sex differences in remating opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *357*(1419), 283–293. https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0929

Pandian, T. J., & Marian, M. P. (1985). Time and energy costs of metamorphosis in the Indian bullfrog *Rana tigrina*. *Copeia*, *1985*(3), 653. https://doi.org/10.2307/1444758

Pearman, P. B. (1995). Effects of pond size and consequent predator density on two species of tadpoles. *Oecologia*, *102*(1), 1–8. https://doi.org/10.2307/4220920

Pellet, J., & Schmidt, B. R. (2005). Monitoring distributions using call surveys: estimating site occupancy, detection probabilities and inferring absence. *Biological Conservation*, *123*(1), 27–35. https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2004.10.005

Pelster, B. (1999). Environmental influences on the development of the cardiac system in fish and amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *124*(4), 407–412. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00132-4

Penick, C. A., & Tschinkel, W. R. (2008). Thermoregulatory brood transport in the fire ant,

Solenopsis invicta. *Insectes Sociaux*, *55*(2), 176–182. https://doi.org/10.1007/s00040-008-0987-4

Piersma, T., & Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution*, *18*(5), 228–233. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00036-3

Pingault, J.-B., & Goldberg, J. (2008). Stratégies reproductives, soin parental et lien parent-progéniture dans le monde animal. *Devenir*, *20*(3), 249. https://doi.org/10.3917/dev.083.0249

Pintor, A. F. V., Schwarzkopf, L., & Krockenberger, A. K. (2016). Hydroregulation in a tropical dry-skinned ectotherm. *Oecologia*, *182*(4), 925–931. https://doi.org/10.1007/s00442-016-3687-1

Pinya, S., & Pérez-Mellado, V. (2014). Clutch size in wild populations of *Alytes muletensis*. *Acta Herpetologica*, *9*(1), 115–117. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-13105

Pitcher, T. J. (1986). *The behaviour of teleost fishes*. Springer Science & Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8263-8

Polo-Cavia, N., Oliveira, J. M., Redondo Villa, A. J., & Márquez, R. (2016). Background colour matching in a wild population of *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*, *37*(3), 1–8. https://doi.org/10.1163/15685381-00003050

Poo, S., & Bickford, D. P. (2013). The adaptive significance of egg attendance in a south-east Asian tree frog. *Ethology*, *119*(8), 671–679. https://doi.org/10.1111/eth.12108

Portik, D. M., & Blackburn, D. C. (2016). The evolution of reproductive diversity in Afrobatrachia: a phylogenetic comparative analysis of an extensive radiation of African frogs. *Evolution*, *70*(9), 2017–2032. https://doi.org/10.1111/evo.12997

Quesada-Hidalgo, R., Solano-Brenes, D., Requena, G. S., & Machado, G. (2019). The good fathers: efficiency of male care and the protective role of foster parents in a Neotropical arachnid. *Animal Behaviour*, *150*, 147–155. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.02.007

Rasband, W. S., & S., W. (2012). ImageJ: Image processing and analysis in Java. *Astrophysics Source Code Library, Record Ascl:1206.013*.

Ratikainen, I. I., Haaland, T. R., & Wright, J. (2018). Differential allocation of parental investment and the trade-off between size and number of offspring. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *285*(1884), 20181074. https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1074

Réale, D., Garant, D., Humphries, M. M., Bergeron, P., Careau, V., & Montiglio, P. O. (2010). Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1560, pp. 4051–4063). Royal Society. https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0208

Reed, T. E., Warzybok, P., Wilson, A. J., Bradley, R. W., Wanless, S., & Sydeman, W. J. (2009). Timing is everything: flexible phenology and shifting selection in a colonial seabird. *Journal of Animal Ecology*, *78*(2), 376–387. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01503.x

Refsnider, J. M., Clifton, I. T., & Vazquez, T. K. (2019). Developmental plasticity of thermal ecology traits in reptiles: trends, potential benefits, and research needs. In *Journal of Thermal Biology* (Vol. 84, pp. 74–82). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.06.005

Reguera, P., & Gomendio, M. (1999). Predation costs associated with parental care in the golden egg bug *Phyllomorpha laciniata* (Heteroptera: Coreidae). *Behavioral Ecology*, *10*(5), 541–544. https://doi.org/10.1093/beheco/10.5.541

Requena, G. S., Buzatto, B. A., Martins, E. G., & Machado, G. (2012). Paternal care decreases foraging activity and body condition, but does not impose survival costs to caring males in a neotropical arachnid. *PLoS ONE*, *7*(10), e46701. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046701

Richter-Boix, A., Llorente, G. A., & Montori, A. (2006). Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia*, *27*, 549–559. https://doi.org/10.1163/156853807780202549

Ridley, M. (1978). Paternal care. *Animal Behaviour*, *26*(PART 3), 904–932. https://doi.org/10.1016/0003-3472(78)90156-2

Ringler, E., Beck, K. B., Weinlein, S., Huber, L., & Ringler, M. (2017). Adopt, ignore, or kill? Male poison frogs adjust parental decisions according to their territorial status. *Scientific Reports*, *7*, 1–6. https://doi.org/10.1038/srep43544

Ringler, E., Pašukonis, A., Fitch, W. T., Huber, L., Hödl, W., & Ringler, M. (2015). Flexible compensation of uniparental care: female poison frogs take over when males disappear. *Behavioral Ecology*, *26*(4), 1219–1225. https://doi.org/10.1093/beheco/arv069

Ringler, E., Pašukonis, A., Hödl, W., & Ringler, M. (2013). Tadpole transport logistics in a Neotropical poison frog: indications for strategic planning and adaptive plasticity in anuran parental care. *Frontiers in Zoology*, *10*(1), 67. https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-67

Rodriguez-Diaz, T., & Braña, F. (2011). Plasticity and limitations of extended egg retention in oviparous *Zootoca vivipara* (Reptilia: Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, *102*(1), 75–82. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01559.x

Rodríguez-Díaz, T., González, F., Ji, X., & Braña, F. (2010). Effects of incubation temperature on hatchling phenotypes in an oviparous lizard with prolonged egg retention: are the two main hypotheses on the evolution of viviparity compatible? *Zoology*, *113*(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/j.zool.2009.05.001

Rodríguez-Rodríguez, E. J., Beltrán, J. F., Tejedo, M., Nicieza, A. G., Llusia, D., Márquez, R., & Aragón, P. (2020). Niche models at inter- and intraspecific levels reveal hierarchical niche differentiation in midwife toads. *Scientific Reports*, *10*(1), 10942. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67992-6

Rohwer, V. G., & Law, J. S. Y. (2010). Geographic variation in nests of yellow warblers breeding in Churchill, Manitoba, and Elgin, Ontario. *The Condor*, *112*(3), 596–604. https://doi.org/10.1525/cond.2010.090229

Royan, A., Muir, A. P., & Downie, J. R. (2010). Variability in escape trajectory in the Trinidadian stream frog and two treefrogs at different life-history stages. *Canadian Journal of Zoology*, *88*(9), 922–934. https://doi.org/10.1139/Z10-059

Royauté, R., Anderson Berdal, M., Garrison, C. R., & Dochtermann, N. A. (2018). Paceless life? A meta-analysis of the pace-of-life syndrome hypothesis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *72*(64). https://doi.org/10.1007/s00265-018-2472-z

Royle, N. J., Alonzo, S. H., & Moore, A. J. (2016). Co-evolution, conflict and complexity: what have we learned about the evolution of parental care behaviours? *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *12*, 30–36. https://doi.org/10.1016/J.COBEHA.2016.08.004

Royle, N. J., Smiseth, P. T., & Kölliker, M. (2012). *The evolution of parental care*. Princeton University Press.

Rozen-Rechels, D., Dupoué, A., Lourdais, O., Chamaillé-Jammes, S., Meylan, S., Clobert, J., & Le Galliard, J. F. (2019). When water interacts with temperature: ecological and evolutionary implications of thermo-hydroregulation in terrestrial ectotherms. *Ecology and Evolution*, *9*(17), 10029–10043. https://doi.org/10.1002/ece3.5440

Rubalcaba, J. G., Gouveia, S. F., & Olalla-Tárraga, M. A. (2019). Upscaling microclimatic conditions into body temperature distributions of ectotherms. *The American Naturalist*, *193*(5), 677–687. https://doi.org/10.1086/702717

Ruhland, F., Chiara, V., & Trabalon, M. (2016). Age and egg-sac loss determine maternal behaviour and locomotor activity of wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Behavioural Processes*, *132*, 57–65. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.09.011

Russell, E. M., Yom-Tov, Y., & Geffen, E. (2004). Extended parental care and delayed dispersal: northern, tropical, and southern passerines compared. *Behavioral Ecology*, *15*(5), 831–838. https://doi.org/10.1093/beheco/arh088

Ruthsatz, K., Peck, M. A., Dausmann, K. H., Sabatino, N. M., & Glos, J. (2018). Patterns of temperature induced developmental plasticity in anuran larvae. *Journal of Thermal Biology*, *74*, 123–132. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.03.005

Ryan, T. J., Philippi, T., Leiden, Y. A., Dorcas, M. E., Wigley, T. B., & Gibbons, J. W. (2002). Monitoring herpetofauna in a managed forest landscape: effects of habitat types and census techniques. *Forest Ecology and Management*, *167*(1–3), 83–90. https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00692-2

Sawecki, J., Miros, E., Border, S. E., & Dijkstra, P. D. (2019). Reproduction and maternal care increase oxidative stress in a mouthbrooding cichlid fish. *Behavioral Ecology*, *30*(6), 1662–1671. https://doi.org/10.1093/beheco/arz133

Scheffers, B., McDonald, E., Hocking, D. J., Conner, C. A., & Semlitsch, R. D. (2009). Comparison of two artificial cover objects for sampling herpetofaunal communities in Missouri. *Herpetological Review*, *40*(4), 419–421.

Schoch, R. R. (2009). Evolution of life cycles in early amphibians. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, *37*(1), 135–162.

https://doi.org/10.1146/annurev.earth.031208.100113

Schoch, R. R. (2014). *Amphibian evolution. The life of early land vertebrates*. SPi Publishers.

Schradin, C., & Pillay, N. (2004). The Striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) from the succulent karoo, South Africa: a territorial group-living solitary forager with communal breeding and helpers at the nest. *Journal of Comparative Psychology*, *118*(1), 37–47. https://doi.org/10.1037/0735-7036.118.1.37

Schulte, L. M., & Mayer, M. (2017). Poison frog tadpoles seek parental transportation to escape their cannibalistic siblings. *Journal of Zoology*, *303*, 83–89. https://doi.org/10.1111/jzo.12472

Schulte, L. M., & Summers, K. (2017). Searching for hormonal facilitators: are vasotocin and mesotocin involved in parental care behaviors in poison frogs? *Physiology and Behavior*, *174*, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.005

Schwarzkopf, L., & Andrews, R. M. (2012). Are moms manipulative or just selfish? Evaluating the "maternal manipulation hypothesis" and implications for life-history studies of reptiles. *Herpetologica*, *68*(2), 147–159. https://doi.org/10.1655/herpetologica-d-11-00009.1

Seebacher, F., & Alford, R. A. (2002). Shelter microhabitats determine body temperature and dehydration rates of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*). *Journal of Herpetology*, *36*(1), 69–75. https://doi.org/10.1670/0022-1511%282002%29036%5B0069%3ASMDBTA%5D2.0.CO

Seebacher, F., & Grigaltchik, V. S. (2014). Embryonic developmental temperatures modulate thermal acclimation of performance curves in tadpoles of the frog *Limnodynastes peronii*. *PLoS ONE*, *9*(9), e106492. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106492

Seshadri, K. S., Gururaja, K. V., & Bickford, D. P. (2015). Breeding in bamboo: a novel anuran reproductive strategy discovered in Rhacophorid frogs of the Western Ghats, India. *Biological Journal of the Linnean Society*, *114*(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/bij.12388

Seymour, R. S. (1999). Respiration of aquatic and terrestrial amphibian embryos. *American Zoologist*, *39*, 261–270. https://doi.org/10.2307/3884249

Shine, R. (1995). A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *The American Naturalist*, *145*(5), 809–823. https://doi.org/10.1086/285769

Shine, R. (2005). Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *36*, 23–46. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152631

Shine, R. (2006). Is increased maternal basking an adaptation or a pre-adaptation to viviparity in lizards ? *Journal of Experimental Zoology*, *305*(A), 524–535. https://doi.org/10.1002/jez.a

Shine, R. (2012). Manipulative mothers and selective forces: the effects of reproduction on thermoregulation in reptiles. *Herpetologica*, *68*(3), 289–298. https://doi.org/10.1655/herpetologica-d-12-00004.1

Shine, R., & Harlow, P. (1993). Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia*, *96*(1), 122–127. https://doi.org/10.1007/BF00318039

Singh, S. K., Das, D., & Rhen, T. (2020). Embryonic temperature programs phenotype in reptiles. *Frontiers in Physiology*, *11*, 35. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00035

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. *Scientific Reports*, *9*(1), 15499. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51810-9

Smith, G. D., Hopkins, G. R., Mohammadi, S., M. Skinner, H., Hansen, T., Brodie, E. D., & French, S. S. (2015). Effects of temperature on embryonic and early larval growth and development in the rough-skinned newt (*Taricha granulosa*). *Journal of Thermal Biology*, *51*, 89–95. https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2015.03.010

So, C. K. J., & Schwanz, L. E. (2018). Thermal plasticity due to parental and early-life environments in the jacky dragon (*Amphibolurus muricatus*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, *329*(6–7), 308–316. https://doi.org/10.1002/jez.2197

Sofaer, H. R., Sillett, T. S., Yoon, J., Power, M. L., Morrison, S. A., & Ghalambor, C. K. (2018). Offspring growth and mobility in response to variation in parental care: a comparison between populations. *Journal of Avian Biology*, *49*(5), jav-01646. https://doi.org/10.1111/jav.01646

Stahlschmidt, Z. R., Brashears, J., & DeNardo, D. F. (2011). The role of temperature and humidity in python nest site selection. *Animal Behaviour*, *81*(5), 1077–1081. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.02.024

Stahlschmidt, Z. R., & DeNardo, D. F. (2009). Effect of nest temperature on egg-brooding dynamics in Children's pythons. *Physiology & Behavior*, *98*, 302–306. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.06.004

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

Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press.

Stiver, K. A., & Alonzo, S. H. (2009). Parental and mating effort: is there necessarily a trade-off? *Ethology*, *115*(12), 1101–1126. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2009.01707.x

Sutherland, W. J. (2006). *Ecological census techniques: a handbook*. Cambridge University Press.

Svensson, I. (1988). Reproductive costs in two sex-role reversed Pipefish species (Syngnathidae). *Journal of Animal Ecology1*, *57*(3), 929–942. https://doi.org/10.2307/5102

Svensson, M. E., & Haas, A. (2005). Evolutionary innovation in the vertebrate jaw: a derived morphology in anuran tadpoles and its possible developmental origin. *BioEssays*, *27*(5), 526–532. https://doi.org/10.1002/bies.20224

Taigen, T. L., Pough, F. H., & Stewart, M. M. (1984). Water balance of terrestrial anuran (*Eleutherodactylus coqui*) eggs: importance of parental care. *Ecology*, *65*(1), 248–255. https://doi.org/10.2307/1939477

Tallamy, D. W. (2000). Sexual selection and the evolution of exclusive paternal care in arthropods. *Animal Behaviour*, *60*(5), 559–567. https://doi.org/10.1006/ANBE.2000.1507

Tallamy, D. W., & Brown, W. (1999). Semelparity and the evolution of maternal care in insects. *Animal Behaviour*, *57*, 727–730. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.1008

Team, R. D. (2005). *A language and environment for statistical computing* (ISBN 3-900051-07-0). R foundation for statistical computing.

Tejedo, M., & Reques, R. (1992). Effects of egg size and density on metamorphic traits in tadpoles of the Natterjack toad (*Bufo calamita*). *Journal of Herpetology*, *26*(2), 152. https://doi.org/10.2307/1564855

Telemeco, R. S., Radder, R. S., Baird, T. A., & Shine, R. (2010). Thermal effects on reptile reproduction: adaptation and phenotypic plasticity in a montane lizard. *Biological Journal of the Linnean Society*, *100*(3), 642–655. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01439.x

Ten-Eyck, G. R., & ul Haq, A. (2012). Arginine vasotocin activates aggressive calls during paternal care in the Puerto Rican coquí frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Neuroscience Letters*, *525*(2), 152–156. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.07.058

Terblanche, J. S., Hoffmann, A. A., Mitchell, K. A., Rako, L., Le Roux, P. C., & Chown, S. L. (2011). Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *Journal of Experimental Biology*, *214*(22), 3713–3725. https://doi.org/10.1242/jeb.061283

Titon, B., & Gomes, F. R. (2015). Relation between water balance and climatic variables associated with the geographical distribution of anurans. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140761

Townsend, D. S. (1986). The costs of male parental care and its evolution in a neotropical frog. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *19*(3), 187–195. https://doi.org/10.1007/bf00300859

Townsend, D. S., & Moger, W. H. (1987). Plasma androgen levels during male parental care in a tropical frog (*Eleutherodactylus*). *Hormones and Behavior*, *21*(1), 93–99. https://doi.org/10.1016/0018-506X(87)90034-1

Townsend, D. S., Palmer, B., & Guillette, L. J. (1991). The lack of influence of exogenous testosterone on male parental behavior in a neotropical frog (*Eleutherodactylus*): a field experiment. *Hormones and Behavior*, *25*(3), 313–322. https://doi.org/10.1016/0018-506X(91)90004-2

Townsend, D. S., Stewart, M. M., & Pough, F. H. (1984). Male parental care and its adaptive significance in a neotropical frog. *Animal Behaviour*, *32*(2), 421–431. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(84)80278-X

Treasure, A. M., & Chown, S. L. (2019). Phenotypic plasticity in locomotor performance of a monophyletic group of weevils accords with the 'warmer is better' hypothesis. *Journal of Experimental Biology*, *222*(9), 1–9. https://doi.org/10.1242/jeb.195255

Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. In *Sexual selection & the descent of man* (pp. 136–179). Aldine Publishing Company.

Úbeda, C. A., & Nuñez, J. (2006). New parental care behaviours in two telmatobiine genera from temperate Patagonian forests: *Batrachyla* and *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae). *Amphibia Reptilia*, *27*(3), 441–444. https://doi.org/10.1163/156853806778190015

Uller, T. (2008). Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology and Evolution*, *23*(8), 432–438. https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.04.005

Vági, B., Végvári, Z., Liker, A., Frckleton, R. P., & Székely, T. (2019). Parental care and the evolution of terrestriality in frogs. *Proceedings of the Royal Society B*, *286*(1900), 20182737. https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2737

Valencia, L. B., & Delia, J. R. J. (2016). Maternal care in a glassfrog: care function and commitment to offspring in *Ikakogi tayrona*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *70*(1), 41–48. https://doi.org/10.1007/s00265-015-2022-x

van Bergen, E., & Beldade, P. (2019). Seasonal plasticity in anti-predatory strategies: Matching of color and color preference for effective crypsis. *Evolution Letters*, *3*(3), 313–320. https://doi.org/10.1002/evl3.113

Van den Bergh, B. R. H., Loomans, E. M., & Mennes, M. (2015). Early life influences on cognition, behavior, and emotion in humans: from birth to age 20. *Advances in Neurobiology*, *10*, 315–331. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1372-5_15

Vargas-Salinas, F., Quintero-Ángel, A., Osorio-Domínguez, D., Rojas-Morales, J. A., Escobar-Lasso, S., David, P., Gutiérrez-Cárdenas, A., Rivera-Correa, M., & Amézquita, A. (2014). Breeding and parental behaviour in the glass frog *Centrolene savagei* (Anura: Centrolenidae). *Journal of Natural History*, *48*(27–28), 1689–1705. https://doi.org/10.1080/00222933.2013.840942

Verrell, P. A., & Brown, L. E. (1993). Competition among females for mates in a species with male parental care, the midwife toad *Alytes obstetricans*. *Ethology*, *93*(3), 247–257. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1993.tb00993.x

Vockenhuber, E. A., Hödl, W., & Amézquita, A. (2009). Glassy fathers do matter: egg attendance enhances embryonic survivorship in the glass frog *Hyalinobatrachium valerioi*. *Journal of Herpetology*, *43*(2), 340–344. https://doi.org/10.1670/08-092R1.1

Wakelin, M., Smuts-Kennedy, C., Thurley, T., & Webster, N. (2003). Artificial cover objects for Leiopelmatid Frogs. *DOC Science Internal Series*, *120*, 17.

Walczyńska, A., Kiełbasa, A., & Sobczyk, M. (2016). "Optimal thermal range" in ectotherms: defining criteria for tests of the temperature-size-rule. *Journal of Thermal Biology*, *60*, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.06.006

Walls, S. C., & Altig, R. (1986). Female reproductive biology and larval life history of Ambystoma salamanders: a comparison of egg size, hatchling size, and larval growth. *Herpetologica*, *42*(3), 334–345. https://doi.org/10.2307/3892312

Walters, R. J., & Hassall, M. (2006). The temperature-size rule in ectotherms: may a general explanation exist after all? *The American Naturalist*, *167*(4), 510–523. https://doi.org/10.1086/501029

Wapstra, E., Uller, T., While, G. M., Olsson, M., & Shine, R. (2010). Giving offspring a head start in life: field and experimental evidence for selection on maternal basking behaviour in lizards. *Journal of Evolutionary Biology*, *23*(3), 651–657. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01924.x

Warner, D. A., & Shine, R. (2007). Fitness of juvenile lizards depends on seasonal timing of hatching, not offspring body size. *Oecologia*, *154*(1), 65–73. https://doi.org/10.1007/s00442-007-0809-9

Watkins, T. B., & Vraspir, J. (2006). Both incubation temperature and posthatching temperature affect swimming performance and morphology of Wood frog tadpoles (*Rana sylvatica*). *Physiological and Biochemical Zoology*, *79*(1), 140–149. https://doi.org/10.1086/498182

Webb, D. R. (1987). Thermal tolerance of avian embryos: a review. *The Condor*, *89*(4), 874. https://doi.org/10.2307/1368537

Webb, J. K., Brown, G. P., & Shine, R. (2001). Body size, locomotor speed and antipredator behaviour in a tropical snake (*Tropidonophis mairii*, Colubridae): the influence of incubation environments and genetic factors. *Functional Ecology*, *15*(5), 561–568. https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00570.x

Webb, P. W. (1986). Locomotion and predator-prey relationships. In *Predator-prey relationships* (pp. 24–41). University of Chicago Press.

Wells, E., Garcia-Alonso, D., Rosa, G. M., & Tapley, B. (2015). *Husbandry guidelines for*

Alytes.

Wells, K. D. (1977). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, *25*(3), 666–693. https://doi.org/10.1016/0003-3472(77)90118-X

West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.

Westneat, D. F., & Fox, C. W. (2010). *Evolutionary behavioral ecology*. Oxford University Press.

Westneat, D. F., & Sargent, R. C. (1996). Sex and parenting: the effects of sexual conflict and parentage on parental strategies. *Trends in Ecology and Evolution*, *11*(2 SPEC. ISS.), 87–91. https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81049-4

Weygoldt, P. (1980). Complex brood care and reproductive behaviour in captive poison-arrow frogs, *Dendrobates pumilio* O. Schmidt. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *7*(4), 329–332. https://doi.org/10.1007/BF00300674

Wilczynski, W., Lynch, K. S., & O'Bryant, E. L. (2005). Current research in amphibians: studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Hormones and Behavior*, *48*(4), 440–450. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.06.001

Williams, K. L., Navins, K. C., & Lewis, S. E. (2016). Behavioral responses to predation risk in brooding female amphipods (*Gammarus pseudolimnaeus*). *Journal of Freshwater Ecology*, *31*(4), 571–581. https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1196464

Williamson, I., & Bull, C. M. (1989). Life history variation in a population of the Australian frog *Ranidella signifera*: egg size and early development. *Copeia*, *1989*(2), 356. https://doi.org/10.2307/1445431

Wilson, R. S., James, R. S., & Johnston, I. A. (2000). Thermal acclimation of locomotor performance in tadpoles and adults of the aquatic frog *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, *170*(2), 117–124. https://doi.org/10.1007/s003600050266

Wittenberger, J. F. (1981). *Animal social behavior*. Duxbury Press.

Wright, J., Bolstad, G. H., Araya-Ajoy, Y. G., & Dingemanse, N. J. (2019). Life-history evolution under fluctuating density-dependent selection and the adaptive alignment of pace-of-life syndromes. *Biol. Rev*, *94*, 230–247. https://doi.org/10.1111/brv.12451

Yoon, J., Sofaer, H. R., Sillett, T. S., Morrison, S. A., & Ghalambor, C. K. (2017). The relationship between female brooding and male nestling provisioning: does climate underlie geographic variation in sex roles? *Journal of Avian Biology*, *48*(2), 220–228. https://doi.org/10.1111/jav.00890

Zamorano, J., Bozinovic, F., & Veloso, C. (2017). Colder is better: the differential effects of thermal acclimation on life history parameters in a parasitoid fly. *Journal of Thermal Biology*, *68*(March), 1–4. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.03.011

Zuo, W., Moses, M. E., West, G. B., Hou, C., & Brown, J. H. (2012). A general model for effects of temperature on ectotherm ontogenetic growth and development. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1734), 1840–1846. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2000

ANNEXE 1 : Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties

BRILL

Amphibia-Reptilia (2020) DOI:10.1163/15685381-20201246

brill.com/amre

Short Note
Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties

Léa Lange[1,*], François Brischoux[1], Olivier Lourdais[1,2]

Abstract. Most amphibians use both aquatic and terrestrial habitats. While the aquatic phase attracted considerable interest, terrestrial habitat use is often less investigated. We studied diurnal refuge selection in the Midwife toad in Western central France. We used a factorial design and tested the effect of refuge type (wood *versus* rubber boards) and substrate (wet sawdust *versus* bare soil). Most animals were observed under refuges with sawdust substrate. An interaction between refuge type and temperature was detected with higher presence probability under rubber refuges at low temperature. Conflicting hydric and thermic requirements are likely determinants of the observed pattern.

Keywords: amphibians, artificial refuges, habitat selection, terrestrial.

Amphibians are currently facing a worldwide decline involving a diversity of proximate causes such as habitat loss and fragmentation (Beebee and Griffiths, 2005). Most amphibians have a dual life cycle combining terrestrial and aquatic phases (Cody and Smallwood, 1996). Aquatic sites are required for breeding, egg laying and larval development (Cody and Smallwood, 1996). During the aquatic stages, breeding adults usually gather in large numbers in ponds and are often easily detected (breeding call, conspicuous activity) (Dodd, 2010). Conversely, terrestrial habitat use is much less investigated because individuals are much more secretive (Dodd, 2010). Consequently, a majority of studies have focused on aquatic phases of the life cycle resulting in a large amount of knowledge on reproduction and aquatic stages (breeding, embryonic and tadpole development). In order to understand the threats that currently affect amphibian populations, it is crucial to collect data during terrestrial life stages and understand the microhabitat use during the terrestrial phase.

Because amphibians have a permeable skin, they are particularly sensitive to evaporative water loss (Lillywhite, 2006) and they require hygrometric conditions for activity (Osbourn, Connette and Semlitsch, 2014). Yet, they also need to actively thermoregulate to achieve optimal temperatures and performances (Köhler et al., 2011). A possible conflict can therefore exist between water and thermal needs; which in turn will influence habitat use and specific microclimatic conditions to thermo- and hydroregulate (Heard, Robertson and Scroggie, 2008; Mitchell and Bergmann, 2016). Most amphibians are active at night and frequently shelter in underground refuges during the day (Sutherland, 2006). Such refuges can be critical to avoid extreme temperatures and dehydration notably under hot or arid climate (Seebacher and Alford, 2002). Under temperate (constraining) climates, thermal conditions can be limiting and diurnal thermoregulation can be important to achieve preferred temperature. In this context, diurnal

1 - Centre d'Études Biologiques de Chizé, CNRS et Université de la Rochelle – UMR 7372, 79360 Villiers en Bois, France

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

*Corresponding author; e-mail: lange@cebc.cnrs.fr

© Koninklijke Brill NV, Leiden, 2020.

DOI:10.1163/15685381-20201246

refuge use may primarily be driven by thermoregulatory purposes.

The use of artificial refuges (AR) can provide an effective technique for detecting secretive taxa (Hoare et al., 2009) and have been efficiently used to detect and monitor reptile populations (Milne, Bull and Hutchinson, 2003; Michael, Lunt and Robinson, 2004; Graitson and Naulleau, 2005; Lettink and Cree, 2007; Hoare et al., 2009). Although, some amphibian species use AR (Michael, Lunt and Robinson, 2004; Graitson and Naulleau, 2005), only few studies have specifically used this method (e.g., Wakelin et al., 2003; Hampton, 2007; Latham and Knowles, 2008).

The aim of our study was to experimentally examine the use of diurnal refuges by the midwife toad, *Alytes obstetricans*. We compared two refuge types (wood *versus* rubber boards) and two substrates (sawdust *versus* natural substrate). Because of vulnerability to water loss, we posit that the hydric properties of the substrate beneath refuges will likely influence refuge selection. We tested the following predictions:

1) Because of their hydric requirements, Midwife toads should prefer sawdust substrate that should maintain the highest humidity level.
2) Because dark rubber boards should provide warmer conditions, they should be more attractive when environmental temperatures are low.

The common midwife toad, *Alytes obstetricans*, is a terrestrial species from the Alytidae family, ranging across Western Europe. Midwife toads often shelter under refuges such as rocks and slabs and are frequently encountered in the vicinity of anthropogenic habitats, as stone walls, wood pile or screes. Reproduction is partially independent of the aquatic environment. Oviposition occurs on land and males actively contribute to oviposition in a lumbar amplexus. This species shows male-only parental care with males carrying eggs during early development (2 to 3 weeks). Aquatic bodies such as ponds are required for tadpole deposition.

We studied surface activity in an anthropic habitat (a sawmill), located in Southern France within the Chizé forest (46.146315N; −0.395969W). The site (1 hectare) offers numerous ground shelters including woodpiles, logs, accumulated sawdust and is largely occupied by midwife toads. A small pond close to the site is used for tadpole deposition.

We examined the influence of refuge type by comparing two types of materials: wood *versus* rubber board (conveyor belt). The two refuges were of similar size: 40 × 80 cm. We also tested the influence of the substrate (sawdust *versus* bare soil) placed beneath artificial refuges using a 2 × 2 factorial design.

We positioned 17 groups of artificial refuges on the study sites. Each group was composed of four artificial refuges with four modalities:

1) Wood board and sawdust substrate.
2) Wood board and natural substrate.
3) Rubber board and sawdust substrate.
4) Rubber board and natural substrate.

Within each group the four artificial refuges were placed side by side on a linear transect favouring the access to the different modalities (total $n = 68$ refuges). Refuges were placed in May, two weeks before conducting the survey.

From June to August 2016, we visited the study site on 11 occasions. Each refuge was gently lifted in order to determine the presence of midwife toads. When detected, we counted the number of individuals under the refuge and assessed age class based on body size (adult > 4 cm, juvenile < 4 cm, only three individuals were not attributed to an age-class). When possible, we also assessed the sex and reproductive status of some individuals (i.e., male transporting eggs). Temperatures data were collected from www.meteociel.fr website, recorded in Niort, the closest station from our study site (~19 km straight line). Temperature was recorded every hour. Mean temperature was calculated by averaging the last record before the survey and the first record after the survey.

We used Generalized Linear Mixed-Effects Models to examine the determinants of presence and abundance under artificial refuges. The probability of presence was modelled using a binomial distribution. The abundance (i.e., the number of toads when present) was modelled using a Poisson distribution. The group number (1 to 17) was treated as a random factor and the four different refuges in each group as a random effect nested in the group. The same procedures were used when considering either all individuals or caring males only. Analyses were carried out using R 3.5.0 software (R Development Core Team, 2005), lme4 package (Bates et al., 2015) and MuMIn package (Barton, 2019). The figures were designed using ggplot2 package (Wickham, 2016).

Over the 11 visits, a total of 110 positive refuge controls were obtained (14.7%). Toads were detected in 11 of the 17 groups of artificial refuges. The abundance ranged from 1 to 7 (mean ± SD = 2.2 ± 1.7). The total number of contacts was 238 individuals. The majority of individuals were adults ($n = 223$) and we observed relatively few juveniles ($n = 12$). Among adults, 108 individuals (48%) that were

Table 1. Statistical models used to test for the influence of refuge type and substrate on toad presence and abundance. AR: artificial refuge. Est.: estimate. Juv.: juveniles. R^2m: marginal R square. R^2c: Conditional R square. SE: standard error. Temp.: temperature. Group/AR stands for random intercept varying among group and AR nested within group.

Response variable	GLMER family	Random-effect	Explanatory variables	Est.	SE	Z	r^2m	r^2c	P
All toads presence (juv. included)	Binomial	Group/AR	(Intercept)	−6.553	1.387	−4.725			<0.001
			Material	−3.553	1.482	−2.398	1.500e−4	0.620	<0.05
			Substrate	−4.388	0.928	−4.729	0.206	0.633	<0.001
			Temp.	−0.007	0.038	−0.175	0.006	0.630	0.861
			Material:Substrate	1.246	1.131	1.102	0.222	0.640	0.271
			Material:Temp.	0.124	0.056	2.240	0.013	0.638	<0.05
			Model				0.233	0.656	
Caring males presence	Binomial	Group/AR	(Intercept)	−12.272	3.304	−3.714			<0.001
			Material	0.366	2.507	0.146	1.285e−10	5.475e−6	0.884
			Substrate	5.808	1.878	3.093	6.374e−7	5.223e−6	<0.001
			Temp.	−0.066	0.057	−1.164	8.174e−9	5.582e−6	0.244
			Material:Substrate	−1.575	2.312	−0.681	6.172e−7	5.256e−6	0.496
			Material:Temp.	0.028	0.076	0.374	1.009e−8	5.622e−6	0.708
			Model				6.458e−7	5.413e−6	
All toads abundance (juv. included)	Poisson	Group/AR	(Intercept)	−0.440	0.682	−0.646			0.518
			Material	0.185	0.806	0.230	9.739e−5	0.251	0.818
			Substrate	0.720	0.655	1.098	0.024	0.260	0.272
			Temp.	0.014	0.016	0.908	0.024	0.262	0.364
			Material:Substrate	−0.493	0.759	−0.650	0.031	0.267	0.516
			Material:Temp.	0.016	0.023	0.694	0.026	0.261	0.488
			Model				0.050	0.274	
Caring males abundance	Poisson	Group/AR	(Intercept)	−0.021	1.068	−0.019			0.985
			Material	−0.582	1.305	−0.446	0.122	0.576	0.656
			Substrate	0.641	1.035	0.619	0.027	0.619	0.536
			Temp.	−0.000	0.021	−0.008	0.006	0.592	0.994
			Material:Substrate	−0.410	1.175	−0.349	0.044	0.628	0.727
			Material:Temp.	0.032	0.035	0.892	0.029	0.596	0.372
			Model				0.073	0.194	

found carrying eggs were confidently sexed as males.

The presence of midwife toads was strongly associated to substrate type with more frequent contacts with sawdust substrate (table 1, fig. 1a) and to AR type with more frequent contacts under rubber boards (table 1, fig. 1b). We found an interaction between the AR type and the temperature, showing that rubber boards were more attractive at low temperatures (table 1, fig. 1c). In contrast, the use of wood board refuges was independent of thermal conditions (table 1, fig. 1c). Restricting our analyses to adult individuals yielded similar results. Finally, when focusing on reproductive males (carrying eggs), we found an influence of substrate solely (table 1). When focusing on abundance data, we found no influence of artificial refuge type or substrate (table 1). However, the abundance of toads observed with no substrate was low compared to sawdust ($n = 13$ versus 225) and the proportion of caring males tended to be lower (30.8% versus 44.9%).

We found that sawdust substrate had a major influence on refuge selection. This effect likely reflects the hygrometric properties of this substrate. Indeed, sawdust accumulates large amount of water within wood fibers (Gruda, 2008). This hygroscopic property should provide high humidity and reduce the water vapour deficit. Such benefits are particularly important for amphibians that can face high hydric and thermal needs (Köhler et al., 2011). In addition, sawdust allows burrowing or digging behaviour

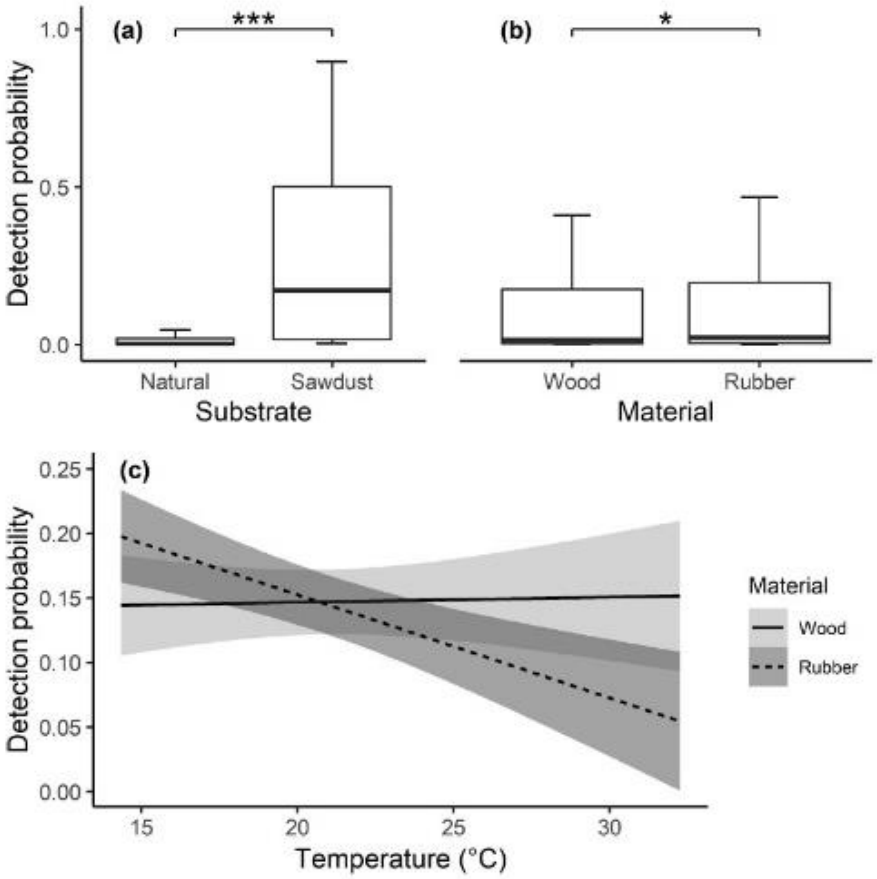


Figure 1. Effect of (a) substrate and (b) refuge type on detection probability. Detection probability was determined from extraction of predicted values of toad presence (binomial glmer, see text for details). The boxes represent the interval between the 25% and 75% quartiles and the whiskers represent the range. The middle horizontal line in the box plot represents the median. ***: $P < 0.001$; *: $P < 0.05$. (c) Influence of temperature and artificial refuge type on detection probability. Detection probability was determined from extraction of predicted values of toad presence (binomial glmer, see text for details). The lines represent the fitted linear regression and the grey areas the 95% confidence intervals.

and small-scale adjustments within this microhabitat. Accordingly, individuals were often observed within circular spaces made by arranging the topsoil. That should provide specific microclimatic conditions. Such advantages are presumably missing with the natural substrate (i.e., bare soil) with more important air exchanges and dehydration risks. High humidity can notably benefit to caring-males to enhance eggs development (Janzen, Ast and Paukstis, 1995) and avoid desiccation (Taigen, Pough and Stewart, 1984). The relatively lower proportion of caring males using bare soil suggests differential substrate selection. In support of these results, previous studies have also demonstrated the role of substrate humidity on refuge use in amphibians (Grant et al., 1992).

We found an interaction between the AR type and the ambient temperature on toads' observations. Specifically, rubber boards were more attractive when environmental temperatures were lower, while toads' presence under wood boards was similar across temperature. Dark rubber covers warm up more and more rapidly than wood boards when exposed to the sun (OL, pers. obs.) and likely provide thermal benefit when environmental temperatures were low. This further indicates that midwife toads thermoregulate during the day in the refuge they choose at night. On the other hand,

when environmental temperature are high, rubber covers can potentially achieve high temperature that may determine toads' presence, while wood refuges appear as attractive, no matter the temperature (Grant et al., 1992). Wood refuges are therefore expected to provide more stable microenvironments when thermal conditions are critical. While reproduction often influence thermoregulation effort and accuracy (Klug and Bonsall, 2014), we did not find an influence of AR type on refuge selection by caring-males. Future studies including more controls across the entire reproductive season will help to test for this hypothesis.

Several studies have demonstrated that AR are effective for amphibians and reptiles detection (Ryan et al., 2002; Scheffers et al., 2009; Michael et al., 2018). Our study provides clear evidence that substrate type and AR type in interaction with temperature can have a major influence on Midwife toads' diurnal refuge selection. Future studies are required to test the influence of refuge type over an entire season and test for a possible differential attractiveness according to ambient conditions for caring-males.

Acknowledgements. The authors thank Mercier G. for fieldwork and the sawmill Marteau-Bois for giving them access to their site. The authors also thank the website www.meteociel.fr for temperature data. Funding support was provided by the CNRS, the Région Nouvelle-Aquitaine (project AQUASTRESS), and La Rochelle Université.

References

Barton, K. (2019): MuMIn: multi-model inference. R package version 1.43.6. https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015): Fitting linear mixed-effect models using lme4. J. Stat. Soft. **67**: 1-48.

Beebee, T.J.C., Griffiths, R.A. (2005): The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? Biol. Conserv. **125**: 271-285.

Cody, M.L., Smallwood, J.A. (1996): Long-Term Studies of Vertebrate Communities. Academic Press.

Dodd, C.K. (2010): Amphibian Ecology and Conservation: a Handbook of Techniques. Oxford University Press.

Graitson, E., Naulleau, G. (2005): Les abris artificiels: un outil pour les inventaires herpétologiques et le suivi des populations de reptiles. Bull. Soc. Herp. Fr. **115**: 5-22.

Grant, B.W., Tucker, A.D., Lovich, J.E., Mills, A.M., Dixon, P.M., Gibbons, J.W. (1992): The use of coverboads in estimating patterns of reptile and amphibian biodiversity. In: Wildlife 2001: Populations, p. 379-403.

Gruda, N. (2008): The effect of wood fiber mulch on water retention, soil temperature and growth of vegetable plants. J. Sustain. Agric. **32**: 629-643.

Hampton, P. (2007): A comparison of the success of artificial cover types for capturing amphibians and reptiles. Amphibia-Reptilia **28**: 433-437.

Heard, G.W., Robertson, P., Scroggie, M.P. (2008): Microhabitat preferences of the endangered growling grass frog *Litoria raniformis* in southern Victoria. Aust. Zool. **34**: 414-425.

Hoare, J.M., O'Donnell, C.F.J., Westbrooke, I., Hodapp, D., Lettink, M. (2009): Optimising the sampling of skinks using artificial retreats based on weather conditions and time of day. Appl. Herpetol. **6**: 379-390.

Janzen, F.J., Ast, J.C., Paukstis, G.L. (1995): Influence of the hydric environment and clutch on eggs and embryos of two sympatric map turtles. Funct. Ecol. **9**: 913-922.

Klug, H., Bonsall, M.B. (2014): What are the benefits of parental care? The importance of parental effects on developmental rate. Ecol. Evol. **4**: 2330-2351.

Köhler, A., Sadowska, J., Olszewska, J., Trzeciak, P., Berger-Tal, O., Tracy, C.R. (2011): Staying warm or moist? Operative temperature and thermal preferences of common frogs (*Rana temporaria*), and effects on locomotion. Herpetol. J. **21**: 17-26.

Latham, D., Knowles, M. (2008): Assessing the use of artificial hibernacula by great crested newts *Triturus cristatus* and other amphibians for habitat enhancement, Northumberland, England. Conserv. Evid. **5**: 74-79.

Lettink, M., Cree, A. (2007): Relative use of three types of artificial retreats by terrestrial lizards in grazed coastal shrubland, New Zealand. Appl. Herpetol. **4**: 227-243.

Lillywhite, H.B. (2006): Water relations of tetrapod integument. J. Exp. Biol. **209**: 202-226.

Michael, D.R., Blanchard, W., Scheele, B.C., Lindenmayer, D.B. (2018): Comparative use of active searches and artificial refuges to detect amphibians in terrestrial environments. Austral. Ecol.

Michael, D.R., Lunt, I.D., Robinson, W.A. (2004): Enhancing fauna habitat in grazed native grasslands and woodlands: use of artificially placed log refuges by fauna. Wildl. Res. **31**: 65-71.

Milne, T., Bull, M.C., Hutchinson, M.N. (2003): Fitness of the endangered pygmy blue tongue lizard *Tiliqua adelaidensis* in artificial burrows. J. Herpetol. **37**: 762-766.

Mitchell, A., Bergmann, P.J. (2016): Thermal and moisture habitat preferences do not maximize jumping performance in frogs. Funct. Ecol. **30**: 733-742.

Osbourn, M.S., Connette, G.M., Semlitsch, R.D. (2014): Effects of fine-scale forest habitat quality on movement and settling decisions in juvenile pond-breeding salamanders. Ecol. Appl. **24**: 1719-1729.

R Development Core Team (2005): A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: http://www.R-project.org.

Ryan, T.J., Philippi, T., Leiden, Y.A., Dorcas, M.E., Wigley, T.B., Gibbons, J.W. (2002): Monitoring herpetofauna in a managed forest landscape: effects of habitat types and census techniques. For. Ecol. Manage. **167**: 83-90.

Scheffers, B., McDonald, E., Hocking, D.J., Conner, C.A., Semlitsch, R.D. (2009): Comparison of two artificial cover objects for sampling herpetofaunal communities in Missouri. Herpetol. Rev. **40**: 419-421.

Seebacher, F., Alford, R.A. (2002): Shelter microhabitats determine body temperature and dehydration rates of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*). J. Herpetol. **36**: 69-75.

Sutherland, W.J. (2006): Ecological Census Techniques: a Handbook. Cambridge University Press.

Taigen, T.L., Pough, F.H., Stewart, M.M. (1984): Water balance of terrestrial anuran (*Eleutherodactylus coqui*) eggs: importance of parental care. Ecology **65**: 248-255.

Wakelin, M., Smuts-Kennedy, C., Thurley, T., Webster, N. (2003): Artificial cover objects for Leiopelmatid frogs. DOC Sci. Intern. Ser. **120**: 17.

Wickham, H. (2016): Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, New York.

Submitted: April 19, 2019. Final revision received: October 30, 2019. Accepted: January 14, 2020.
Associate Editor: Julian Glos.

ANNEXE 2 : Benefits of paternal thermoregulation: male midwife toads select warmer temperatures to shorten embryonic development

Running head: paternal thermoregulation in toads

Benefits of paternal thermoregulation: male midwife toads select warmer temperatures to shorten embryonic development

Léa Lange [1], François Brischoux[1], Olivier Lourdais [1, 2]

[1] Centre d'Études Biologiques de Chizé, CNRS et Université de la Rochelle – UMR 7372, 79360 Villiers en Bois, France

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

Correspondence:

Léa Lange, CEBC-CNRS UMR 7372

79360 Villiers en Bois, FRANCE

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

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

E-mail: lange@cebc.cnrs.fr

Figures: 5

For consideration in: Physiology and Behaviour

21 **Abstract**

22 Early life stages are particularly sensitive to temperature, and embryonic thermal
23 sensitivity could be a driving force in the evolution of parental care and reproductive
24 modes. Parental thermoregulation can provide an efficient way to control embryonic
25 temperature which can induce both phenological effects, by optimizing developmental
26 durations or timing, and phenotypical effects. To date, most studies on parental thermal
27 effects have focused on maternal influences, notably among ectotherms. However,
28 paternal thermal effects are likely to exist, especially in species with exclusive male
29 parental care. We studied the midwife toad, a small species of terrestrial amphibian in
30 which males carry the eggs until hatching. We examined the variations of body
31 temperature in the field and determined thermal preferences in a thermal gradient. We
32 also have experimentally examined the influence of temperature on embryonic
33 development durations across five thermal treatments (16, 18, 20, 22, 24°C). In support
34 of our prediction, we found that the use of diurnal shelters by carrying males in the field
35 was more marked early in the season when thermal conditions were more constraining.
36 Under laboratory conditions, we also detected a shift in thermal preferences with
37 reproduction, with carrying males preferring higher temperatures than non-carrying
38 ones. Finally, we detected a marked thermal dependence of embryonic development,
39 suggesting a significant phenological benefit of paternal thermoregulation in this
40 species.

41 **Keywords:** thermal effect, paternal care, thermoregulation, embryo, development

Introduction

Variations in thermal conditions can have major consequences on organismal physiology, performances, and ultimately, fitness (Angilletta 2009). These influences are particularly relevant for ectotherms because their body temperature directly depends on the thermal environment (Rubalcaba, Gouveia, Olalla-Tárraga 2019). Behavioural thermoregulation provides a robust way of reaching and maintaining optimal body temperatures in thermal environments that can vary through space and time (Blouin-Demers, Weatherhead, McCracken 2003; Rozen-Rechels et al. 2019). Early life stages are particularly sensitive to temperature (Farmer 2000; Gillooly et al. 2002; Angilletta et al. 2010) and thermal effects can have long lasting consequences on individual trajectories (Singh, Das, Rhen 2020). Accordingly, parental thermoregulation has been highlighted as a key mechanism to control temperature effects on developing embryo (Shine 1995; Farmer 2000; Delia, Ramirez-Bautista, Summers 2013; Lorioux et al. 2013). Importantly, parental thermal influences can involve phenological effects by optimizing developmental durations or timing, but also phenotypical effects, such as modifications of offspring traits (Anduaga, Huerta 2001; Reed et al. 2009; Telemeco et al. 2010; Lorioux et al. 2012, 2013).

The thermal sensitivity of embryonic development could be a driving force in the evolution of parental care and reproductive modes (Farmer 2000; Angilletta, Sears 2003). The relationship between embryonic development and temperature has been a focus of research for decades (*e.g.*, reviewed inWebb 1987; Singh, Das, Rhen 2020) and several competing hypotheses have emerged (Zamorano, Bozinovic, Veloso 2017). For instance, the "warmer is better" hypothesis posits that higher temperature are beneficial by enhancing physiological rates, and thus reducing development time (Treasure,

67 Chown 2019). Alternatively, the "colder is better" hypothesis suggests that individuals
68 developing at a lower temperature will reach larger body size (*i.e.*, temperature size
69 rule, see (Zuo et al. 2012). Finally, the "optimal developmental temperature" hypothesis
70 states that accessing an optimal, intermediate temperature during embryonic life is
71 critical to optimize adults performances in diverse thermal environments (Huey et al.
72 1999). Importantly, all of these conflicting hypotheses have received substantial support
73 from empirical studies suggesting that various strategies of thermal parental care may
74 improve offspring traits (reviewed in Kingsolver, Huey 2008).

75

76 Yet, most studies on thermal effects have focused on maternal influences (Du, Lu, Shen
77 2005; da Silva et al. 2012; Lorioux et al. 2013; Foucart, Heulin, Lourdais 2018; Li et al.
78 2018; So, Schwanz 2018). It is partly due to the predominant role of females for
79 parental care in most systems (Royle, Smiseth, Kölliker 2012). In ectotherms, the
80 maternal shift in thermoregulation during reproduction has sparked debates as to
81 whether this corresponds to a maternal effort to optimize the fitness of her offspring (*i.e.*
82 the maternal manipulation hypothesis), or her own (Shine 1995, 2006, 2012; DeNardo,
83 Lourdais, Stahlschmidt 2012; Schwarzkopf, Andrews 2012). However, male parental
84 care (MPC) has been described in multiple taxa and male can regulate multiple facets of
85 the abiotic environment. For instance, among nest-guarding fishes, males will attend the
86 nest and actively ventilate the eggs to avoid hypoxia (Lissåker, Kvarnemo 2006).
87 Pouch-breeding species can also manipulate salinity to optimize development for the
88 embryos (Monteiro, Almada, Vieira 2005). Similarly, in many amphibians, MPC will
89 be involved in the regulation of the hydric environment to avoid egg desiccation
90 (Townsend, Stewart, Pough 1984; Chen, Yu, Kam 2007; Poo, Bickford 2013; Gururaja
91 et al. 2014; Lehtinen, Green, Pringle 2014; Vargas-Salinas et al. 2014; Consolmagno et

92 al. 2016; Chuang et al. 2017). Paternal thermal cares to the eggs are well known among
93 birds during incubation and this trait likely emerged through sexual selection (Hanley
94 2013). Yet, male thermal care and thermal effects remain virtually unstudied among
95 terrestrial ectotherms (but see Cook, Ferguson, Telford 2001).

96

97 In many amphibians, males are actively involved in the regulation of incubation
98 conditions (Eens, Pinxten 2000; Royle, Smiseth, Kölliker 2012). MPC is often
99 exclusive, which permits to study paternal effect on development in a simplified context
100 (low or absent prezygotic costs, see (Hayward, Gillooly 2011)). Thermal constraints on
101 embryonic development are particularly relevant under thermally constraining
102 environments, such as the temperate climate (Le Henanff, Meylan, Lourdais 2013). In
103 this context, the Alytidae family is composed of five species living in the Western
104 Palearctic region and characterized by terrestrial incubation and exclusive MPC. In
105 these species, males carry the clutch attached to their hind legs during the whole
106 embryonic development and recent evidences suggest that males carrying eggs select
107 their microhabitat to buffer thermal conditions (Lange, Brischoux, Lourdais 2020).

108

109 Herein we studied the midwife toad, *Alytes obstetricans,* which is the northernmost
110 species of the genus and which has an extended reproductive period lasting from early
111 spring to late summer (Márquez 1992). The hatching date can induce drastic changes in
112 ontogenetic trajectories and early hatching has been shown to positively influence the
113 fitness (Rodríguez-Díaz et al. 2010; Le Henanff, Meylan, Lourdais 2013; Lorioux et al.
114 2013). Conversely, late hatching can induce overwintering in a larval stage in this
115 species and thus significantly lengthens larval development duration (Wells et al. 2015).
116 Due to the high levels of predation risks and competition in breeding ponds (Pearman

1995), this is likely to influence larval survival. Therefore, male midwife toads are expected to optimize the thermal conditions in order to hasten embryonic development and generate early hatching. We tested the following predictions:

(1) Field body temperature (T_{body}) should vary over the reproductive season and be lower when conditions are constraining in early spring.

(2) Carrying males should have higher preferred temperature (T_{pref}) than non-carrying ones.

(3) A small increase in egg temperature should be sufficient to shorten incubation duration.

Material and methods

Study species

The common midwife toad (*Alytes obstetricans*) is a small (4-5 cm) species ranging across Western Europe (Bosch, Márquez 1996). These toads often ground refuges such as under rocks and slabs and they can frequently be found in anthropic habitats (Pellet, Schmidt 2005; Lange, Brischoux, Lourdais 2020). Because sexual dimorphism is poorly marked in this species (Bosch, Márquez 1996), we relied on an indirect method for sexing adult individuals. If toads were carrying eggs on their back, they were confidently sexed as males, because during mating, males collect the fertilized eggs and attach the string of eggs around their hind legs. Otherwise, individuals were sexed as non-determined until further recaptures. Toads measuring less than 2cm were classified as juveniles. Eggs are carried for up to 32 days in the wild (Wells et al. 2015). Once embryos have completed their development, the male reaches small water bodies

140 (ponds) to deposit the hatching tadpoles (Márquez 1992). In *Alytes obstetricans,* clutch
141 sizes range from 32 to 171 eggs (Wells et al. 2015).

142

143 *Study site and captures*

144 The study site is situated in Western France (Chizé forest, 46.145993 N, -0.394980 W)
145 in a sawmill where a large population is established and currently monitored. To detect
146 toads, we used different artificial refuges: rubber cover, tarpaulin cover and wood cover.
147 All artificial refuges had a sawdust substrate underneath the cover since it increases
148 detection (Lange, Brischoux, Lourdais 2020). We placed eight line transects of the three
149 types of artificial refuges, for a total of 24 artificial refuges. Each artificial refuge was
150 then gently lifted to capture the individuals. All toads captured and brought to the lab
151 were individually marked with a RFID nanotag (Trovan), placed in the dorsal lymphatic
152 sac, just before the release.

153

154 *Variables measured*

155 *1) Temperature measurements in the field*

156 Temperature measurements (°C) were collected through 35 field sessions between April
157 25, 2018 and August 22, 2018. For each toad, the dorsal temperature was measured
158 before any handling using a Raytek Raynger MX2 infrared thermometer. In small
159 ectothermic organisms, such as the midwife toads, the dorsal temperature is highly
160 similar to the internal body temperature (T_{body}). A total of 586 temperature
161 measurements were obtained, with 342 on carrying males, 21 on non-carrying males,
162 123 undetermined adults (unsexed). Substrate temperature was measured on three
163 different points with the IR thermometer. Mean of those three measurements was used
164 for analyses.

2) Thermal preferences in laboratory conditions

We used a thermal gradient ranging from 15°C to 45°C to assess individual thermal preferences (T_{pref}). The experimental unit consisted on a PVC box (102 cm l x 72 cm L x 25.5 cm h). The warm side was heated by a heating cord set on 45°C, the middle by a heating cord set on 30°C and the other side was cooled by copper pipes, traversed by a stream of water and antifreeze solution, cooled by a cold unit, set on 5°C. Six compartments (68 cm l x 16 cm L) in aluminium (chosen for its thermic conductance) were placed above the temperature gradient. Compartments were filled with a mixture of 100 g of vermiculite and 250 g of water and one long shelter (half PVC tubes of 66 cm l x 11 cm L x 4.5 cm h) covered the entire length of the compartment.

A total of 92 adult toads were collected during the reproductive season between April and July 2018. Among these individuals 62 were identified as males because they were carrying a clutch at the time of capture or later during the year. A total of 7 seven reproductive females were identified with growing ova visible through the belly. For 23 individuals it was not possible to assign a sex because they were not found or recaptured with eggs. Finally, 17 males were captured twice with different statuses: 8 were firstly captured as non-carrying and then as carrying eggs and 9 were initially captured as carrying and then as non-carrying eggs. After capture, individuals were brought to the lab and placed in the thermal gradient. Individual temperature was taken every hour from 9:00am to 6:00pm using an infrared thermometer (Raytek Raynger MX2 Infrared Thermometer). The skin surface temperature was collected in the dorsal area without handling taken to minimize perturbations. For 8 males captured with eggs a clutch desertion occurred and they were discarded from the analysis. The 7 reproductive females were also excluded. We analysed variations in T_{pref} comparing the three statuses (carrying males, non-carrying males and unsexed adults). We also analysed T_{pref} on the

220

190 subset of 17 males sequentially found either carrying or non-carrying eggs. Individuals
191 were measured for Snout-Vent Length (SVL, mm) and weighed (mg) before being
192 released at the exact capture site. A minimum period of 2 weeks was respected before
193 any recapture and repetition of the experiment.

194

195 *3) Thermal dependence of embryonic development*

196 In spring 2018 and 2019, we captured 45 males carrying eggs, which had been recently
197 laid (e.g., eggs characterised by a bright yellow colour). Toads were measured in SVL,
198 weighted, and then distributed in five thermal treatments (16, 18, 20, 22 & 24°C) using
199 climatic chamber (Vötsch Industrietechnik, VP 600, Balingen, Germany). Three thermal
200 treatments were used per year, 18, 20 & 22°C in 2018 and 16, 20 & 24°C in 2019. Each
201 year, males were randomly distributed in the three thermal treatments to avoid
202 differences in capture date between groups. Toads were individually housed in plastic
203 boxes (32 cm l x 18.5 cm w x 10.5 cm h) with the same quantity of moistened
204 vermiculite. Two shelters (half PVC tubes) and a water bowl (⌀ 14 cm) were placed
205 inside each maintenance box. Eggs are transparent, which allowed to assess the stages
206 of embryonic development (Cambar, Martin 1959). We therefore recorded the date of
207 formation of the optic vesicle to account for possible differences due to development
208 duration in the field before the capture. Tadpoles of six (out of 47) males hatched
209 outside of the water, while still being transported by their father, and data from these
210 individuals were discarded from our analyses. Cumulating both years, development
211 duration were obtained for 9, 6, 12, 6 & 6 males respectively for 16, 18, 20, 22 & 24°C
212 thermal treatments, Date of birth (hatching) was recorded and the development duration
213 was estimated from treatment duration (date of capture – date of birth).

214 ***Statistics***

215 All statistical analyses were carried on R (version 3.5.0 ; R Development Team 2005)
216 and R studio (version 1.2.5001) ; (using packages lme4, lmerTest, car & multcomp).
217 The relation between mean daily air temperature and the number carrying males and
218 adults observations was tested using a GLM model with a Poisson distribution. Mean
219 daily air temperature was calculated from hourly air temperatures data inventoried on
220 the website www.meteociel.fr, recorded in Niort, the closest station from our study site
221 (~19 km straight line). The relation between substrate temperature and males T_{body} was
222 tested with a regression model with segmented relationship (broken-stick model) from
223 the R package "segmented". The significance of this model was tested using a Davies
224 test on the linear model of the relation between males T_{body} and substrate temperature
225 (Davies test, $p < 0.0001$). The analysis of deviation from the regression line was tested
226 by running a Wilcox test on the residuals extracted from the broken-stick model.

227 We analysed T_{pref} in the gradient testing the influence of the reproductive status, the
228 SVL, and the time of day using a mixed model (lme) with individual identity sets as a
229 random factor (type II Anova test, wald F test). We first conducted this analysis on the
230 entire data set and then to the subset of 17 males that were measured under the two
231 statuses.

232 We examined development durations between thermal treatments with a linear model
233 and using type I Anova tests. Values are presented as means ± standard error (SE).

234

222

Results

1) Phenology of carrying male observations

The number of carrying males found per session was negatively correlated to the mean daily air temperature (Anova test, $\chi^2 = 125.69$, df = 1, $p < 0.001$, Figure 1). The maximum number of observations was reached during the first half of May occurs at a period when T_{pref} and mean T_{body} in the field were comparatively similar (Figure 1; Figure 2). The number of adults (irrespective their sex or reproductive status) was also correlated to the mean daily air temperature (Anova test, $\chi^2 = 28.62$, Df = 1, $p < 0.001$), but did not decrease during the second part of the season (July-August) as the number of carrying males did (Figure 1).

2) Variations in body temperatures

Determinant of field body temperatures

In the field, mean T_{body} of carrying males was highly correlated to the substrate temperature (Figure 3). The broken stick model identified a threshold temperature of 21.9°C. Below this threshold, males' T_{body} were positively correlated with substrate temperature with a slope of 0.8 (Figure 3; Anova test, $F_{(1,331)} = 203.65$, $p < 0.001$). Above this threshold, T_{body} were more weakly correlated to substrate temperature, with a slope of 0.2 (Figure 3; Anova test, $F_{(1,331)} = 114.67$, $p < 0.001$). Interestingly, the deviation from the regression line (assessed as the residuals from the regression) was significantly higher above the threshold of 21.9°C than below (Figure 3; Wilcoxon rank sum test, W = 8519, $p < 0.001$). It is noteworthy that the threshold temperature is equal to the temperature of the 75% quartile of the preferred temperatures of the carrying males and the non-carrying males measured in controlled conditions (Figure 4, 21.9°C Vs 22.1°C).

Thermal preference of carrying and non-carrying males

When considering the entire data set (76 individuals) we found that T_{pref} was influenced by status ($F_{(2,843)} = 11.08$, $p = 0.006$, Figure 4). The mean T_{pref} of carrying males (20.8 ± 0.31 °C) was higher when compared to non-carrying ones (19.4 ± 0.51 °C, Tukey post hoc test $p = 0.001$) and unsexed adults (17.6 ± 0.67°C; Tukey post-hoc test, $p < 0.001$)). The time of day had no influence on T_{pref} ($F_{(9,843)} = 0.77$, $p = 0.64$) nor the SVL ($F_{(1,74)} = 0.06$, $p = 0.94$). Similar results were found when restricting the analysis to the subset of 17 males measured two times, carrying eggs or not. We found a significant effect of status ($F_{(1,313)} = 7.18$, $p = 0.007$) with males showed higher T_{pref} when they were carrying eggs (20.0 ± 0.3 °C) than when they were not (19.3 ± 0.3°C). The size of the males did not influence T_{pref} ($F_{(1,15)} = 0.40$, $p = 0.53$), nor the time of day ($F_{(9,313)} = 0.81$, $p = 0.6$).

3) Influence of temperature on development duration

The duration of the embryonic development was significantly different between thermal treatments (Figure 5; Anova test, $F_{(4,34)} = 38.66$, $p < 0.001$). The duration was longer (40.67 ± 1.9 days) for eggs from the 16°C treatment than for those from the 18°C treatment (30.83 ± 1.5 days; Tukey test, $p < 0.001$), than for those from the 20°C treatment (24.92 ± 1.1 days; Tukey test, $p < 0.001$) and, than for those from the 22°C treatment (18.3 ± 1.0 days; Tukey test, $p < 0.001$). Embryonic development duration of eggs from the 24°C (20.83 ± 1.1 days) was similar of those from both 20°C and 24°C treatments (Tukey tests, $p > 0.27$).

224

Discussion

Despite its evolutionary and ecological relevance, paternal thermoregulation in species with exclusive male parental care (MPC) has received only limited scientific interest (but see Cook, Ferguson, Telford 2001). In this study, we hypothesized that midwife toad males, and the embryo they carry, are exposed to thermal constraints and that males actively thermoregulate to accelerate development. We examined shifts in thermal constraints in the field, thermal preferences during reproduction, and thermal phenological effects on development. In support with our predictions, we found that the use of shelter by carrying males was more marked early in the season. We also detected a shift in thermal preferences with reproduction, with egg carrying males selecting higher temperature. Finally, we detected a strong thermal dependence of embryonic development which suggests significant phenological benefit of paternal thermoregulation. Our findings are discussed in details bellow.

Using a thermal gradient, we found that males carrying eggs displayed higher $T_{pref.}$ This result was found considering all individuals or restricting the analysis to the 17 males with sequential measures with the two statuses. Shift in thermal preferences during reproduction are widespread in ectotherms, where it has been largely described in females, of either oviparous or viviparous species. Females select either higher or lower temperatures but more importantly provide a more stable thermal environment during reproduction (Lourdais, Heulin, Denardo 2008; DeNardo, Lourdais, Stahlschmidt 2012). Parental thermal influences on development include both phenological and phenotypical effects (Lorioux et al. 2013). Birth phenology can be a key driver in reproductive success (Dickerson et al. 2005) and under temperate climates, early hatching is often associated with a better fitness for the juveniles (Warner, Shine 2007;

308 Le Henanff, Meylan, Lourdais 2013). Parental manipulation of embryonic temperature
309 can be adaptive (Abbey-Lee, Dingemanse 2019) by shortening development time and
310 possibly provide significant advantage at birth (Anduaga, Huerta 2001; Reed et al.
311 2009; Telemeco et al. 2010; Lorioux et al. 2012, 2013). Thermal influence has attracted
312 less attention in amphibians and even less in species with MPC and our study clearly
313 points out that egg carrying is associated with a thermal shift in males midwife toads.
314
315 The maximum number of carrying males was found under the diurnal refuges in early
316 spring, when air temperatures were lower. Midwife toads select their diurnal refuges
317 partly on thermal and hydric properties (Lange, Brischoux, Lourdais 2020). These
318 refuges provide significant thermal benefits for carrying males when thermal conditions
319 are constraining. We showed that T_{body} of carrying males was closely dependent of
320 environmental conditions and notably the temperature of the substrate. Importantly, this
321 relation was not linear. Under a temperature threshold (*ca.* 22°C), carrying males appear
322 to thermoconform with the substrate, while above the threshold temperature, active
323 thermoregulation occurred. According to the thermoregulation model of Huey, Slatkin
324 1976, an organism should thermoconform as long as the net benefit of
325 thermoconformation outweighs the net benefit of thermoregulation (Basson et al. 2017).
326 Carrying males could therefore actively avoid effects of higher temperature under the
327 refuges when their T_{body} exceed 22°C. This result dovetails relatively well with
328 additional evidences showing that carrying males likely shift their position under the
329 refuge and exploit the vertical gradient of the substrate to thermoregulate, as
330 demonstrated in invertebrates (Penick, Tschinkel 2008). The reproductive phenology of
331 the species is variable in space and time (Márquez 1992) but often spans across spring
332 and summer. Relatively lower thermal requirements during hot conditions may explain

226

333 the desertion of diurnal refuges during summer to avoid heat and water stress for both
334 carrying males and their embryos.
335
336 Using an experimental manipulation, we showed that a small change in temperature had
337 a strong effect on the duration of embryonic development. That is, the development
338 time was 26.4% shorter at 22°C compared to 20°C, 19.2% shorter at 20°C compared to
339 18°C and 24.2% shorter at 18°C compared to 16°C. However, the development time at
340 24°C was not different of the ones at both 22°C and 20°C. Similar results had been
341 obtained in other ectotherms (Smith et al. 2015; Foucart, Heulin, Lourdais 2018) with a
342 small change in temperature considerably shortening development and influencing
343 hatching phenology. This strong thermal dependence may explain the shift of
344 thermoregulation behavior of carrying males and may be an important selective force in
345 the emergence of parental care (Farmer 2000). Parental thermal manipulations have
346 already been documented in amphibians, with an example of thermal selection of
347 oviposition sites (Dvořák, Gvoždík 2009) and another of thermal control of bodies of
348 water (Cook, Ferguson, Telford 2001). However, data are missing for active
349 thermoregulation of carried developing embryos. To our knowledge, our study would be
350 the first to document this type of behavior. In the midwife toad, early birth may
351 minimize subsequent predation or competitions levels for offspring in breeding ponds
352 (Abbey-Lee, Dingemanse 2019), (Pearman 1995).
353
354 Thermal effects may also benefit male through sexual selection (Royle, Smiseth,
355 Kölliker 2012). In some birds, males build incubation mounds to thermoregulate the
356 eggs of several females at the same time, thereby increasing their mating opportunities
357 (Birks 1997). In our context, a shorter duration will increase the opportunities of

358 obtaining additional mating opportunities, since male midwife toads can sequentially
359 carry multiple clutches throughout the breeding season. Finally parental care are
360 associated with significant costs (Alonso-Alvarez, Velando 2012). Energy demand will
361 increase with temperature (de Cian, Lanzi, Roson 2013) and thermoregulation may
362 impose water-based constraints. Loss of moisture from eggs deposited in terrestrial
363 environments is an important selection pressure (Taigen, Pough, Stewart 1984).
364 Accessing warm temperature, in a wet environment, is therefore essential to avoid
365 dehydration and promote embryonic development. The concept thermo-hydroregulation
366 strategies have recently been described for ectotherms (Rozen-Rechels et al. 2019) and
367 the water based tradeoffs likely apply to amphibians species with terrestrial egg
368 transport.
369

370 **Conclusion**

371 To our knowledge, we present here the results of the first study on the benefits of
372 thermoregulation for an amphibian species with egg transport. The paternal effect on
373 development duration could provide an effective way of improving reproductive
374 success. The emergence of MPC often leads to a trade-off between parental and
375 offspring requirements (Kurdíková, Smolinský, Gvoždík 2011) but see (Stiver, Alonzo
376 2009). Future studies are needed to assess the benefits of parental thermoregulation
377 during terrestrial embryonic development in amphibians.
378

379 **Acknowledgment**

380 We are very grateful to Dr Olivier Marquis (Zoo de Paris) for precious advices on the
381 species maintenance and ecology. The authors thank Alexandre Boissinot for finding
382 the study site and Lauriane Bégué, Lisa Poncet, Juliette Scheuer, Juliane Demellier and

383 Marlène Lecaer for participation in data collection. We warmly thank the sawmill
384 company "Marteau-Bois" for allowing access to their site.

385

386 **Funding**

387 This study received the financial and technical support from the Centre National de la
388 Recherche Scientifique (CNRS), and was funded by University of La Rochelle (PhD
389 grant to LL) and by the Region Nouvelle Aquitaine under the 'Aquastress' project
390 (2018-1R20214 to OL).

391

392 **Ethics**

393 This study was performed in accordance with laws relative to capture, transport and
394 experiments on *Alytes obstetricans* (DREAL permit #XXX) and further approved by an
395 independent ethical committee (Apafis #14193-2018032114365130 v3).

396 **References**

397 Abbey-Lee, R.N., Dingemanse, N.J. (2019): Adaptive individual variation in
398 phenological responses to perceived predation levels. Nat. Commun. **10**: 1–8.

399 Alonso-Alvarez, C., Velando, A. (2012): Benefits and costs of parental care. In: The
400 Evolution of Parental Care, p. 40–61. Royle, N.J., Smiseth, P.T., Kölliker, M., Eds.
401 Oxford, Oxford University Press,.

402 Anderson, R.C.O., Andrade, D. V. (2017): Trading heat and hops for water:
403 Dehydration effects on locomotor performance, thermal limits, and thermoregulatory
404 behavior of a terrestrial toad. Ecol. Evol. 7: 9066–9075.

405 Anduaga, S., Huerta, C. (2001): Effect of Parental Care on the Duration of Larval
406 Development and Offspring Survival in Nicrophorus mexicanus Matthews (Coleoptera:
407 Silphidae) . Coleopt. Bull. **55**: 264–270.

408 Angilletta, M.J., Cooper, B.S., Schuler, M.S., Boyles, J.G. (2010): The evolution of
409 thermal physiology in endotherms. Front. Biosci. - Elit. **2**: 861–881.

410 Angilletta, M.J., Sears, M.W. (2003): Is parental care the key to understanding
411 endothermy in birds and mammals? Am. Nat. **162**: 821–825.

412 Angilletta, M.J.J. (2009): Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis.
413 Oxford University Press.

414 Basson, C.H., Levy, O., Angilletta, M.J., Clusella-Trullas, S. (2017): Lizards paid a
415 greater opportunity cost to thermoregulate in a less heterogeneous environment. Funct.
416 Ecol. **31**: 856–865.

417 Birks, S.M. (1997): Paternity in the Australian brush-turkey, *Alectura lathami*, a

megapode bird with uniparental male care. Behav. Ecol. **8**: 560–568.

Blouin-Demers, G., Weatherhead, P.J., McCracken, H.A. (2003): A test of the thermal coadaptation hypothesis with black rat snakes (*Elaphe obsoleta*) and northern water snakes (*Nerodia sipedon*). J. Therm. Biol. **28**: 331–340.

Bosch, J., Márquez, R. (1996): Discriminant functions for sex identification in two midwife toads (*Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*). Herpetol. J. **6**: 105–110.

Cambar, R., Martin, S. (1959): Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du crapaud accoucheur (*Alytes obstetricans*). Société Linnéenne de Bordeaux **98**: 3–91.

Chen, Y.-H., Yu, H.-T., Kam, Y.-C. (2007): The ecology of male egg attendance in an arboreal breeding frog, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae), from Taiwan. Zoolog. Sci. **24**: 434–440.

Chuang, M.-F., Lee, W.-H., Sun, J.-S., You, C.-H., Kam, Y.-C., Poo, S. (2017): Predation risk and breeding site value determine male behavior and indirectly affect survivorship of their offspring. Behav. Ecol. Sociobiol. **71**: 122.

Cian, E. de, Lanzi, E., Roson, R. (2013): Seasonal temperature variations and energy demand: A panel cointegration analysis for climate change impact assessment. Clim. Change **116**: 805–825.

Consolmagno, R.C., Requena, G.S., Machado, G., Brasileiro, C.A. (2016): Costs and benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. Behav. Ecol. Sociobiol. **70**: 785–795.

Cook, C.L., Ferguson, J.W.H., Telford, S.R. (2001): Adaptive male parental care in the

giant bullfrog, *Pyxicephalus adspersus*. J. Herpetol. **35**: 310–315.

Delia, J.R.J., Ramirez-Bautista, A., Summers, K. (2013): Parents adjust care in response to weather conditions and egg dehydration in a Neotropical glassfrog. Behav. Ecol. Sociobiol. **67**: 557–569.

DeNardo, D.F., Lourdais, O., Stahlschmidt, Z.R. (2012): Are Females Maternal Manipulators, Selfish Mothers, Or Both? Insight from Pythons. Herpetologica **68**: 299–307.

Dickerson, B.R., Brinck, K.W., Willson, M.F., Bentzen, P., Quinn, T.P. (2005): Relative importance of salmon body size and arrival time at breeding grounds to reproductive success. Ecology **86**: 347–352.

Du, W.G., Lu, Y.W., Shen, J.Y. (2005): The influence of maternal thermal environments on reproductive traits and hatchling traits in a Lacertid lizard, Takydromus septentrionalis. J. Therm. Biol. **30**: 153–161.

Dvořák, J., Gvoždík, L. (2009): Oviposition preferences in newts: Does temperature matter? Ethology **115**: 533–539.

Eens, M., Pinxten, R. (2000): Sex-role reversal in vertebrates: behavioural and endocrinological accounts. Behav. Processes **51**: 135–147.

Farmer, C.G. (2000): Parental Care: The Key to Understanding Endothermy and Other Convergent Features in Birds and Mammals. Am. Nat. **155**: 326–334.

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.

462 Gillooly, J.F., Charnov, E.L., West, G.B., Savage, V.M., Brown, J.H. (2002): Effects of
463 size and temperature on developmental time. Nature **417**: 70–73.

464 Gururaja, K.V., Dinesh, K.P., Priti, H., Ravikanth, G. (2014): Mud-packing frog: A
465 novel breeding behaviour and parental care in a stream dwelling new species of
466 Nyctibatrachus (Amphibia, Anura, Nyctibatrachidae). Zootaxa **3796**: 33–61.

467 Hanley, D. (2013): Eggshell conspicuousness is related to paternal brood patch
468 vascularisation in the American thrashers. Avian Biol. Res. **6**: 163–177.

469 Hayward, A., Gillooly, J.F. (2011): The cost of sex: Quantifying energetic investment in
470 gamete production by males and females. PLoS One **6**:.

471 Henanff, M. Le, Meylan, S., Lourdais, O. (2013): The sooner the better: reproductive
472 phenology drives ontogenetic trajectories in a temperate squamate (*Podarcis muralis*).
473 Biol. J. Linn. Soc. **108**: 384–395.

474 Huey, R.B., Berrigan, D., Gilchrist, G.W., Herron, J.C. (1999): Testing the Adaptive
475 Significance of Acclimation: A Strong Inference Approach. Am. Zool. **39**: 323–336.

476 Huey, R.B., Slatkin, M. (1976): Cost and benefits of lizard thermoregulation. Q. Rev.
477 Biol. **51**: 363–384.

478 Jones, S.C., Munn, A. (2015): Long-term changes in food availability mediate the
479 effects of temperature on growth, development and survival in striped marsh frog
480 larvae: implications for captive. Academic.Oup.Com.

481 Kingsolver, J., Huey, R.B. (2008): Size, temperature, and fitness: three rules. Evol.
482 Ecol. Res. **10**: 251–268.

483 Kurdíková, V., Smolinský, R., Gvoždík, L. (2011): Mothers matter too: Benefits of
484 temperature oviposition preferences in newts. PLoS One **6**:.

485 Lange, L., Brischoux, F., Lourdais, O. (2020): Midwife toads (*Alytes obstetricans*)
486 select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties. Amphibia-Reptilia.

487 Lehtinen, R.M., Green, S.E., Pringle, J.L. (2014): Impacts of Paternal Care and
488 Seasonal Change on Offspring Survival: A Multiseason Experimental Study of a
489 Caribbean Frog. Ethology **120**: 400–409.

490 Li, M.A., Zhihua, L.I.N., Jianfang, G.A.O., Hong, L.I., Xiang, J.I., Hongliang, L.U.
491 (2018): Maternal thermal effects on female reproduction and hatchling phenotype in the
492 chinese skink (Plestiodon chinensis). Asian Herpetol. Res. **9**: 250–257.

493 Lissåker, M., Kvarnemo, C. (2006): Ventilation or nest defense - Parental care trade-
494 offs in a fish with male care. Behav. Ecol. Sociobiol. **60**: 864–873.

495 Lorioux, S., DeNardo, D.F., Gorelick, R., Lourdais, O. (2012): Maternal influences on
496 early development: preferred temperature prior to oviposition hastens embryogenesis
497 and enhances offspring traits in the Children's python, Antaresia childreni. J. Exp. Biol.
498 **215**: 1346–53.

499 Lorioux, S., Vaugoyeau, M., DeNardo, D.F., Clobert, J., Guillon, M., Lourdais, O.
500 (2013): Stage Dependence of Phenotypical and Phenological Maternal Effects: Insight
501 into Squamate Reptile Reproductive Strategies. Am. Nat. **182**: 223–233.

502 Lourdais, O., Heulin, B., Denardo, D.F. (2008): Thermoregulation during gravidity in
503 the children's python (Antaresia childreni): a test of the preadaptation hypothesis for
504 maternal thermophily in snakes. Biol. J. Linn. Soc. **93**: 499–508.

505 Marian, M.P., Pandian, T.J. (1985): Effect of temperature on development, growth and
506 bioenergetics of the bullfrog tadpole Rana tigrina. J. Therm. Biol. **10**: 157–161.

507 Márquez, R. (1992): Terrestrial paternal care and short breeding seasons: reproductive
508 phenology of the midwife toads *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*. Ecography
509 (Cop.). **15**: 279–288.

510 Monteiro, N.M., Almada, V.C., Vieira, M.N. (2005): Implications of different brood
511 pouch structures in syngnathid reproduction. J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom **85**:
512 1235–1241.

513 Pearman, P.B. (1995): Effects of pond size and consequent predator density on two
514 species of tadpoles. Oecologia **102**: 1–8.

515 Pellet, J., Schmidt, B.R. (2005): Monitoring distributions using call surveys: estimating
516 site occupancy, detection probabilities and inferring absence. Biol. Conserv. **123**: 27–
517 35.

518 Penick, C.A., Tschinkel, W.R. (2008): Thermoregulatory brood transport in the fire ant,
519 Solenopsis invicta. Insectes Soc. **55**: 176–182.

520 Poo, S., Bickford, D.P. (2013): The adaptive significance of egg attendance in a south-
521 east Asian tree frog. Ethology **119**: 671–679.

522 Reed, T.E., Warzybok, P., Wilson, A.J., Bradley, R.W., Wanless, S., Sydeman, W.J.
523 (2009): Timing is everything: flexible phenology and shifting selection in a colonial
524 seabird. J. Anim. Ecol. **78**: 376–387.

525 Rodríguez-Díaz, T., González, F., Ji, X., Braña, F. (2010): Effects of incubation
526 temperature on hatchling phenotypes in an oviparous lizard with prolonged egg

527 retention: are the two main hypotheses on the evolution of viviparity compatible?
528 Zoology **113**: 33–38.

529 Royle, N.J., Smiseth, P.T., Kölliker, M. (2012): The evolution of parental care. Oxford,
530 Oxford University Press.

531 Rozen-Rechels, D., Dupoué, A., Lourdais, O., Chamaillé-Jammes, S., Meylan, S.,
532 Clobert, J., Galliard, J.F. Le (2019): When water interacts with temperature: Ecological
533 and evolutionary implications of thermo-hydroregulation in terrestrial ectotherms. Ecol.
534 Evol. **9**: 10029–10043.

535 Rubalcaba, J.G., Gouveia, S.F., Olalla-Tárraga, M.A. (2019): Upscaling Microclimatic
536 Conditions into Body Temperature Distributions of Ectotherms. Am. Nat. **193**: 677–
537 687.

538 Schwarzkopf, L., Andrews, R.M. (2012): Are Moms Manipulative Or Just Selfish?
539 Evaluating the "Maternal Manipulation Hypothesis" and Implications For Life-History
540 Studies of Reptiles. Herpetologica **68**: 147–159.

541 Seebacher, F., Alford, R.A. (2002): Shelter microhabitats determine body temperature
542 and dehydration rates of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*). J. Herpetol. **36**: 69–75.

543 Shine, R. (1995): A New Hypothesis for the Evolution of Viviparity in Reptiles. Am.
544 Nat. **145**: 809–823.

545 Shine, R. (2006): Is increased maternal basking an adaptation or a pre-adaptation to
546 viviparity in lizards ? J. Exp. Zool. **305**: 524–535.

547 Shine, R. (2012): Manipulative Mothers and Selective Forces: The Effects of
548 Reproduction On Thermoregulation In Reptiles. Herpetologica **68**: 289–298.

549 Silva, F.R. da, Almeida-Neto, M., Prado, V.H.M. do, Haddad, C.F.B., Cerquira Rossa-
550 Feres, D. de (2012): Humidity levels drive reproductive modes and phylogenetic
551 diversity of amphibians in the Brazilian Atlantic Forest. J. Biogeogr. **39**: 1720–1732.

552 Singh, S.K., Das, D., Rhen, T. (2020): Embryonic Temperature Programs Phenotype in
553 Reptiles. Front. Physiol. **11**: 35.

554 Smith, G.D., Hopkins, G.R., Mohammadi, S., M. Skinner, H., Hansen, T., Brodie, E.D.,
555 French, S.S. (2015): Effects of temperature on embryonic and early larval growth and
556 development in the rough-skinned newt (Taricha granulosa). J. Therm. Biol. **51**: 89–95.

557 So, C.K.J., Schwanz, L.E. (2018): Thermal plasticity due to parental and early-life
558 environments in the jacky dragon (Amphibolurus muricatus). J. Exp. Zool. Part A Ecol.
559 Integr. Physiol. **329**: 308–316.

560 Stiver, K.A., Alonzo, S.H. (2009): Parental and mating effort: Is there necessarily a
561 trade-off? Ethology **115**: 1101–1126.

562 Taigen, T.L., Pough, F.H., Stewart, M.M. (1984): Water balance of terrestrial anuran
563 (*Eleutherodactylus coqui*) eggs: importance of parental care. Ecology **65**: 248–255.

564 Team, R.D. (2005): A language and environment for statistical computing.

565 Telemeco, R.S., Radder, R.S., Baird, T.A., Shine, R. (2010): Thermal effects on reptile
566 reproduction: adaptation and phenotypic plasticity in a montane lizard. Biol. J. Linn.
567 Soc. **100**: 642–655.

568 Townsend, D.S., Stewart, M.M., Pough, F.H. (1984): Male parental care and its
569 adaptive significance in a neotropical frog. Anim. Behav. **32**: 421–431.

570 Treasure, A.M., Chown, S.L. (2019): Phenotypic plasticity in locomotor performance of
571 a monophyletic group of weevils accords with the 'warmer is better' hypothesis. J. Exp.
572 Biol. **222**: 1–9.

573 Vargas-Salinas, F., Quintero-Ángel, A., Osorio-Domínguez, D., Rojas-Morales, J.A.,
574 Escobar-Lasso, S., David, P., Gutiérrez-Cárdenas, A., Rivera-Correa, M., Amézquita,
575 A. (2014): Breeding and parental behaviour in the glass frog Centrolene savagei (Anura:
576 Centrolenidae). J. Nat. Hist. **48**: 1689–1705.

577 Walters, R.J., Hassall, M. (2006): The temperature-size rule in ectotherms: may a
578 general explanation exist after all? Am. Nat. **167**: 510–23.

579 Warner, D.A., Shine, R. (2007): Fitness of juvenile lizards depends on seasonal timing
580 of hatching, not offspring body size. Oecologia **154**: 65–73.

581 Webb, D.R. (1987): Thermal Tolerance of Avian Embryos: A Review. Condor **89**: 874.

582 Wells, E., Garcia-Alonso, D., Rosa, G.M., Tapley, B. (2015): Husbandry Guidelines for
583 *Alytes*.

584 Zamorano, J., Bozinovic, F., Veloso, C. (2017): Colder is better: The differential effects
585 of thermal acclimation on life history parameters in a parasitoid fly. J. Therm. Biol. **68**:
586 1–4.

587 Zuo, W., Moses, M.E., West, G.B., Hou, C., Brown, J.H. (2012): A general model for
588 effects of temperature on ectotherm ontogenetic growth and development. Proc. R. Soc.
589 B Biol. Sci. **279**: 1840–1846.

590

591 **Captions of figures**

592 **Figure 1.** Variations in the mean number of observations of carrying males and total
593 number of adults per two weeks periods over the field season. Mean daily air
594 temperature during the day (00:00-23:00) of the field sessions per period is presented.
595 The whiskers represent the standard errors.

596

597 **Figure 2.** Variations in mean T_{body} (°C) of carrying males and mean air temperatures
598 during the field season. The whiskers represent the standard errors. The horizontal band
599 (light orange) represents the range of preferred body temperatures in a laboratory
600 thermal gradient (lower and upper quartile) and grey line represents the median of
601 preferred body temperatures in a laboratory thermal gradient.

602

603 **Figure 3.** Relation between T_{body} (°C) of carrying males and $T_{subtrate}$ in the field. The
604 black lines represent the regressions of the segmented relationship. The vertical dashed
605 line (blue) represents the estimated break-point of the segmented relationship.

606

607 **Figure 4**. Thermal preferences ($T_{pref,}$ °C) measured in carrying males, non-carrying
608 males and unsexed adults. The boxes represent the lower and upper quartiles and the
609 whiskers represent the range. The middle horizontal line in the box plot represents the
610 median. Different letters mean a significant difference between groups with a p-value <
611 0.05.

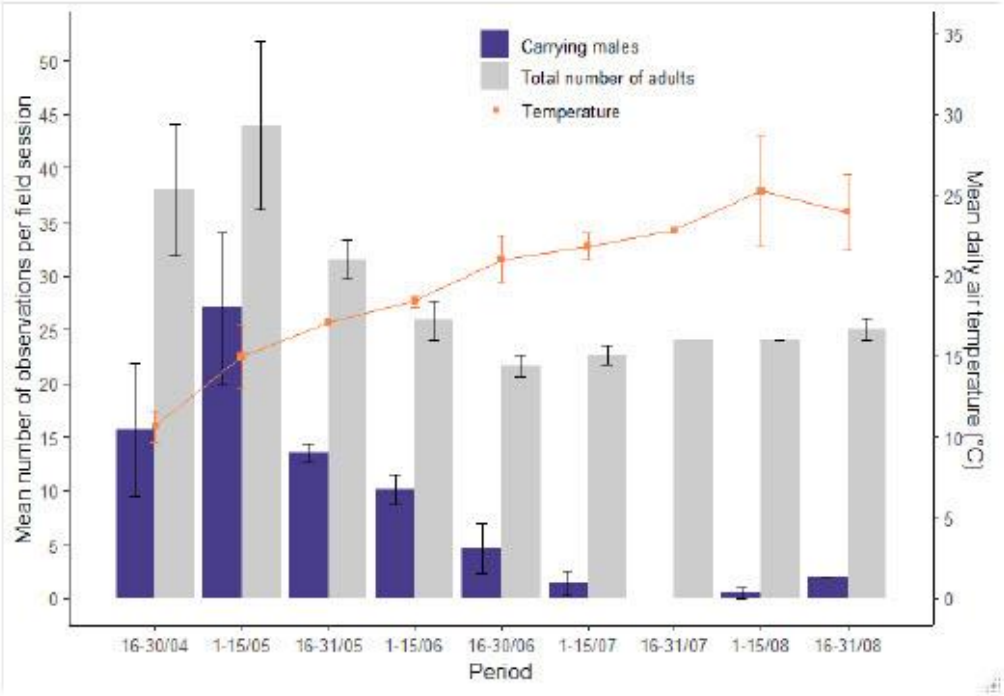
612

613

614 **Figure 5.** Embryonic development duration in days in function of the thermal treatment.
615 The black line represents the fit of a degree 2 polynomial regression, and the grey
616 surface the standard error. Different letters mean a significant difference between
617 groups with a p-value < 0.05.
618

240

619 **Figure 1**

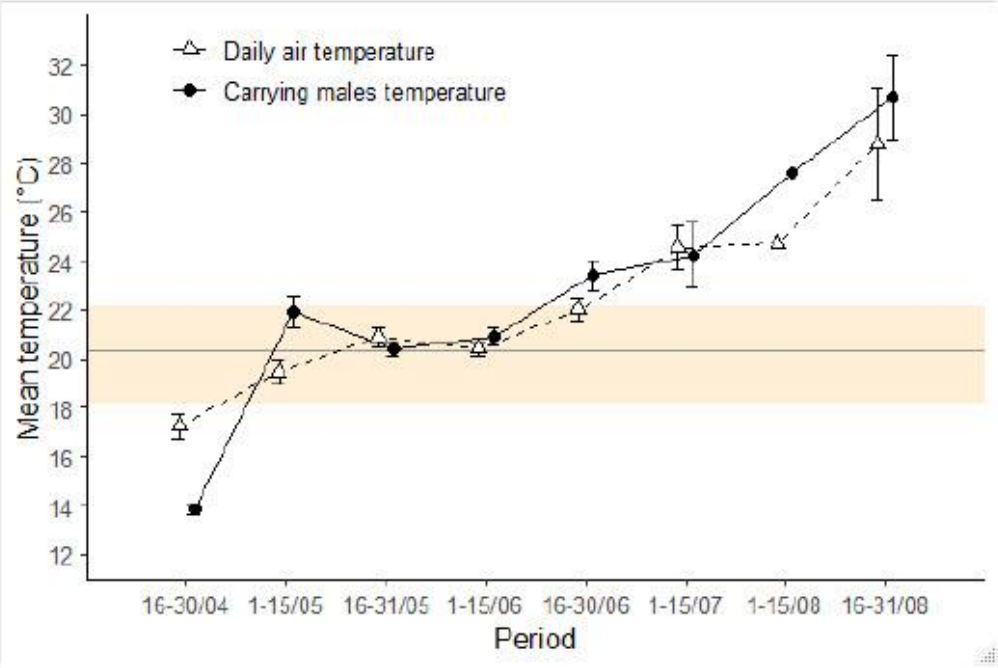


620

621

622 **Figure 2**

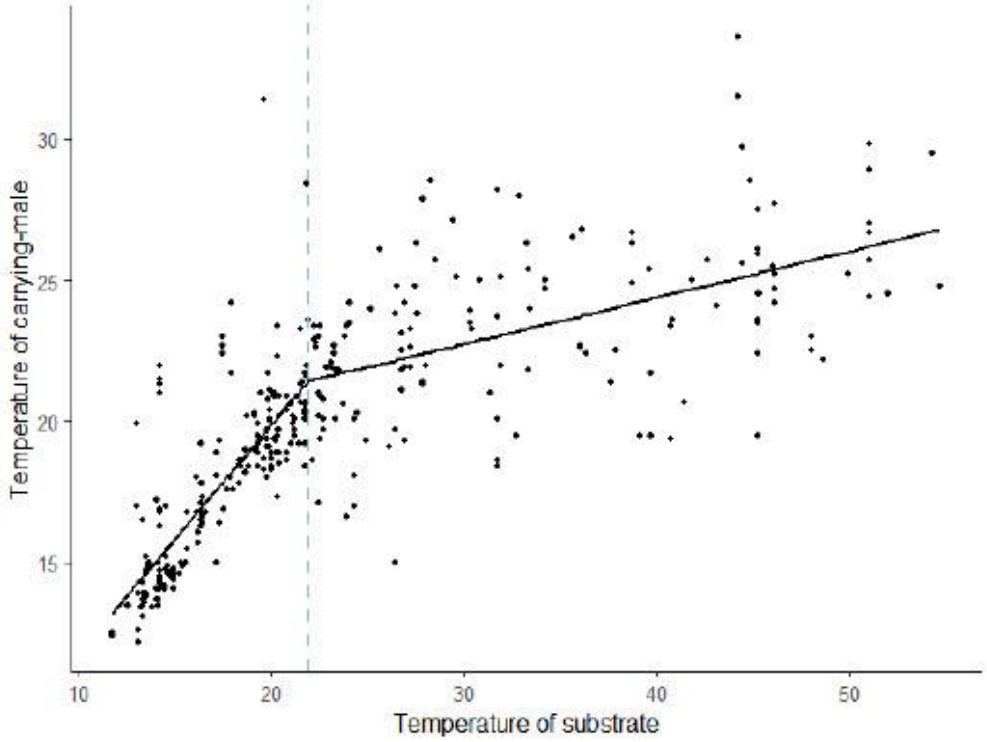
623



624

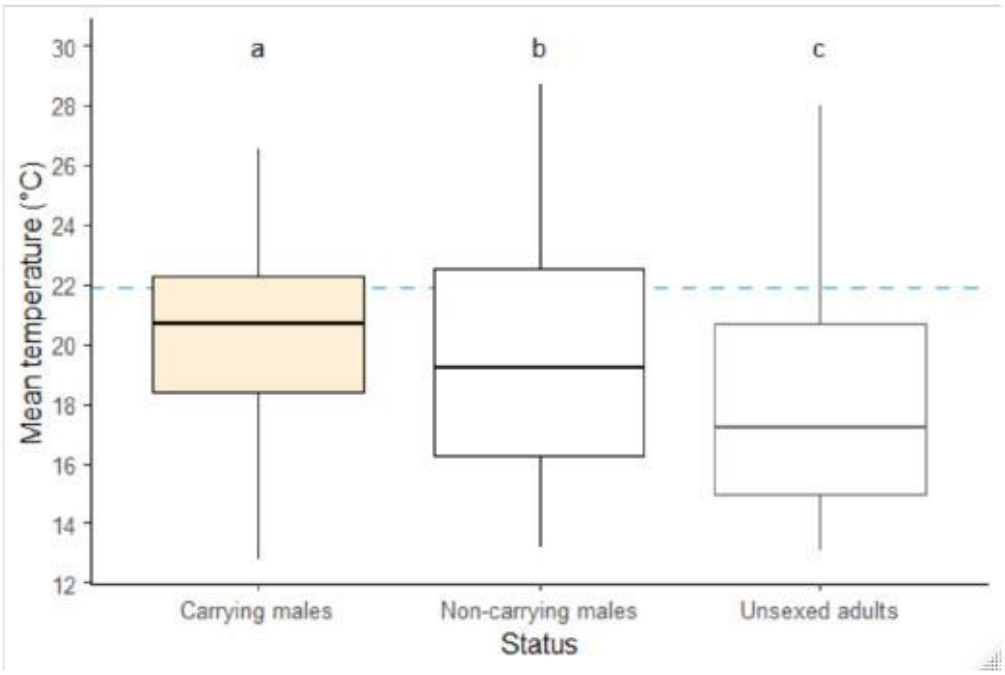
242

625 **Figure 3**



626
627

628 **Figure 4**

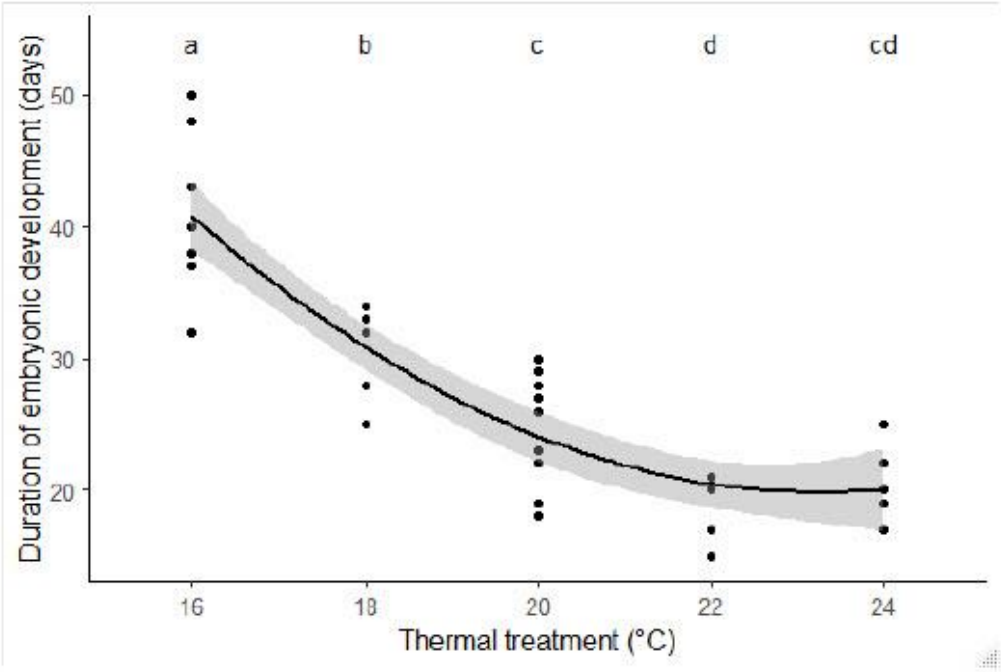


629

244

630 **Figure 5**

631



632

ANNEXE 3 : The costs of being a good dad: egg-carrying and clutch size impair locomotor performances in males Midwife toad, *Alytes obstetricans*

The costs of being a good dad: egg-carrying and clutch size impair locomotor performances in males midwife toad, Alytes obstetricans

Journal:	*Biological Journal of the Linnean Society*
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	LANGE, Léa; CEBC, CNRS - UMR7372 - La Rochelle Université Bégué, Lauriane; CEBC, CNRS - UMR7372 - La Rochelle Université Brischoux, François; CEBC, CNRS - UMR7372 - La Rochelle Université Lourdais, Olivier; CEBC, CNRS - UMR7372 - La Rochelle Université; Arizona State University, School of Life Sciences
Keywords:	male parental care, egg transport, sex role reversal, fecundity trade-offs

SCHOLARONE™
Manuscripts

Running head: costs of male parental care

The costs of being a good dad: egg-carrying and clutch size impair locomotor performances in males midwife toad, *Alytes obstetricans*

Léa Lange [1], Lauriane Bégué [1], François Brischoux[1], Olivier Lourdais [1, 2]

[1] Centre d'Études Biologiques de Chizé, CNRS et Université de la Rochelle – UMR 7372, 79360 Villiers en Bois, France

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

Correspondence:

Léa Lange, CEBC-CNRS UMR 7372

79360 Villiers en Bois, FRANCE

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

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

E-mail: lange@cebc.cnrs.fr

Tables: 2

Figures: 6

For consideration in: Biological Journal of the Linnean Society

For Peer Review

Abstract

Parental care is widespread across the animal kingdom. Parental behaviours are beneficial by increasing offspring survival but induce significant costs to the parents. Because parental care is much more represented in females, associated reproductive costs have been largely studied in this sex. While male parental care is likely to involve significant costs, it has been markedly less investigated. We studied the costs of egg carrying on locomotor performances in an amphibian species (*Alytes obstetricans)* with male parental care. We examined complementary parameters including hopping performance, righting-response, muscular response to egg burden, and voluntary locomotion in males carrying eggs or not. We found that carrying males had altered locomotor performances for most traits. In addition, alteration of performances was closely related to relative clutch size. Clutch desertion occurred in smaller individuals carrying larger relative clutch mass, and the performances after desertion were similar to that of non-reproductive ones. Overall, our study demonstrates that carrying eggs significantly alters male mobility and that performance-clutch size trade-offs are relevant to understand the evolution of paternal care.

Keywords: male parental care, egg transport, sex role reversal, fecundity trade-offs

For Peer Review

Introduction

Parental care (PC) refers to all post-zygotic investments and understanding the diversity of PC is a central focus in evolutionary biology (Clutton-Brock, 1991; Royle, Smiseth, & Kölliker, 2012). Among animals, PC is predominantly delivered by females, sometimes by both parents and less frequently by males only (Clutton-Brock, 1991; Dulac, O'Connell, & Wu, 2014; Gilbert & Manica, 2015; Furness & Capellini, 2019). This asymmetry reflects sex-differences in prezygotic allocations (anisogamy) and sex-specific fitness benefits from PC (Trivers, 1972; Westneat & Fox, 2010; Hayward & Gillooly, 2011). Notably, female reproductive success is maximized by increasing allocation of energy and resources into the progeny, while males benefit from increasing mating opportunities (Trivers, 1972). Anisogamy alone is not sufficient to explain sex differences in parental effort (Kokko & Jennions, 2008) as a diversity of traits can influence the sex of the parent involved in care. (Royle *et al.*, 2012). For example, mode of fertilization can influence which parent provides PC, male parental care (MPC) being more common in species with external fertilization (Dawkins & Carlisle, 1976; Gross & Shine, 1981; Beck, 1998; Vági *et al.*, 2019) or with securing paternity (Kvarnemo, 2006; Kahn, Schwanz, & Kokko, 2013). Overall PC requires substantial time and energy investments which can compromise parental energy balance, increase risk exposures or induce parental-offspring conflict (Crespi & Semeniuk, 2004; Royle, Alonzo, & Moore, 2016). The magnitude of these costs is often related to the number of offspring but may vary among males and females, influencing level of parental commitment (Alissa, Muniz, & Machado, 2017).

Although exclusive MPC is relatively rare, it has been documented in both invertebrates and vertebrates (Ridley, 1978; Kahn *et al.*, 2013; Dulac *et al.*, 2014; Bleu, Gamelon, &

Sæther, 2016; Bukhari *et al.*, 2019; Quesada-Hidalgo *et al.*, 2019). MPC can include internal or external brooding, but also feeding, guarding, and carrying the progeny (Ridley, 1978). Current concepts posit that exclusive MPC has emerged from a situation of no care (ancestral state ; Gilbert & Manica, 2015) either by natural selection (*e.g.*, "territoriality hypothesis") or by female choice (*e.g.*, "sexual selection hypothesis" ; Nazareth & Machado, 2010). Multiple benefits of MPC have been highlighted either for male, female or both and include: i) enhanced parental fitness, ii) increased male attractivity, iii) secured paternity, and iv) reduced physiological costs for the mother (Kvarnemo, 2006). Despite these benefits, it is essential to clarify the costs of MPC to better understand their evolutionary history. Similarly to female parental care, MPC can induce increased predation risks and energy use, which in turn can lead to a decreased reproductive success or survival (Alonso-Alvarez & Velando, 2012). Yet only few studies explicitly estimated these costs (but see Townsend, 1986; Svensson, 1988; Ahnesjo, 1995). Important flexibility in the expression of MPC has been described in several taxa and clutch abandonment can be observed in response to environmental constraints (Kight, Batino, & Zhang, 2006). Examining species with exclusive MPC represents a powerful opportunity to assess post-zygotic costs of reproduction and to address the evolutionary context leading to MPC.

Anuran amphibians display the largest diversity of reproductive and parental strategies among vertebrates (Duellman & Trueb, 1994; Crump, 2015). Multiple forms of PC exist in this group: egg attendance, egg transport, tadpole attendance, tadpole transport, tadpole feeding, and internal gestation whether in the oviduct, the stomach or a dorsal pouch (reviewed in (Crump, 1996; Furness & Capellini, 2019)). PC is found in 17 of the 27 extant anuran families. Among them, 47% of species with uniparental care

demonstrate MPC (Crump, 1996; Dulac *et al.*, 2014). Male attendance has been widely described in different species especially under the tropics (Townsend, Stewart, & Pough, 1984; Downie *et al.*, 2005; Royan, Muir, & Downie, 2010; Delia, Ramirez-Bautista, & Summers, 2013; Chuang *et al.*, 2017). The benefits of MPC involve the regulation of developmental conditions (protection against desiccation) or reduced predation risks for the offspring. Progeny attendance or transport can influence locomotor performances and therefore predation risks for the parent (*e.g.*, Reguera & Gomendio, 1999) as well as food intake (Dugas *et al.*, 2016). Interestingly, clutch desertion in species with uniparental care has been documented in different contexts suggesting high levels of flexibility in parental commitment (Ringler *et al.*, 2015). Clutch desertion can be related to increased costs (predation risks, mating opportunities) or reduced benefits of care (when the number of offspring is low ; Delia *et al.*, 2013; Chuang *et al.*, 2017).

The evolution of reproductive modes in amphibians is closely linked to climatic conditions and PC are particularly diversified under warm climates (da Silva *et al.*, 2012; Crump, 2015; Lion *et al.*, 2019). Species showing PC and MPC can also be found under more constraining climates and deserve specific attention notably to study terrestrial reproduction (Crump, 1996; Úbeda & Nuñez, 2006; Vági *et al.*, 2019). In the Western Palearctic region, the genus *Alytes* comprises five species that all display terrestrial incubation and exclusive MPC (Verrell & Brown, 1993). Males carry the eggs during the whole embryonic development that lasts three to six weeks (Wells *et al.*, 2015). This genus provides an opportunity to explore possible costs of paternal care. We investigated the influence of egg carrying on locomotor performances and the possible interactions with clutch size in the common midwife toad (*Alytes obstetricans*).

For Peer Review

We considered locomotor traits that are ecologically relevant for a male midwife toad while carrying eggs. These traits included hopping performances, righting-responses, muscular responses to egg burden, and voluntary locomotion by comparing carrying and non-carrying males.

Specifically, we tested the following predictions:

1) Egg carrying should influence male mobility. We predict that reproductive males will exhibit lower performances when compared to non-carrying ones.

2) Clutch size should influence performances in carrying male. We expect a negatively influence of egg burden (relative clutch size) on male locomotion.

3) Clutch desertion should occur in response to disturbance notably among males with lower reproductive effort.

Material and methods

1) Study species

The common midwife toad (*Alytes obstetricans*) is a small (4-5 cm) species from the Alytidae family, ranging across Western Europe (Bosch & Márquez, 1996). *Alytes* have a unique type of reproduction with terrestrial egg development. During mating, the male collects the fertilized eggs and attaches them in strings around its hind legs. Eggs are carried until the end of embryonic development which lasts up to 32 days in the wild (Wells *et al.*, 2015). Once embryos have completed their development, the male reaches small water bodies (ponds, puddles, ditches) to deposit the tadpoles (Márquez, 1992). In *Alytes obstetricans,* clutch size ranges from 32 to 171 eggs (Wells *et al.*, 2015). Males can carry simultaneously several clutches from different females (Márquez, 1992; Pinya & Pérez-Mellado, 2014).

2) Capture, housing and sex identification

The study site is located in western France (Chizé forest, 46.145°, -0.394°) and harbours a relatively large population. Adult toads were collected during the reproductive season (April to July 2018) (Márquez, 1990). Every week, up to 10 individuals were captured by hand and brought to the laboratory where they were measured (snout-vent length, SVL, mm) and weighed (mg). They were individually housed in plastic boxes (32 cm l x 18.5 cm w x 10.5 cm h) with the same quantity of moistened vermiculite and allocated in a controlled temperature room (20°C). Two shelters (halved PVC tubes) and a small bowl of water were placed inside each box. Individuals were kept in the lab for three days before being released at the exact capture site. For further re-capturing purposes, animals were individually marked with a RFID nanotag (Trovan, United Kingdom), placed in the dorsal lymphatic sac just before being released.

The midwife toads show limited sexual dimorphism (Bosch & Márquez, 1996). Each individual was inspected to identify its sex combining different methods. Individuals found carrying a clutch were straightforwardly sexed as males. Individuals found with visible eggs in their body cavity were identified as females. Otherwise the sex was set as undetermined unless the individuals were subsequently recaptured either carrying eggs or with eggs in the body cavity. We captured a total of 91 different males. Among them, 63 were found carrying eggs. Among these 63 individuals, 14 deserted their clutch during the captivity period.

3) Clutch size of carrying males

For Peer Review

We estimated clutch size using top-side photographs to count the number of eggs of each carrying male with the multi-point tool of ImageJ (Rasband & S., 2012). We validated this method with a subset of 11 individuals for which we compared estimated clutch size and actual clutch size (lm, $F_{(1,9)} = 20.6$, $R^2 = 0.70$, p-value = 0.001). A positive relationship between SVL and estimated clutch size was found (Figure 1).

4) Locomotor performances

We used an integrative approach to describe locomotor performances and address potential costs of egg carrying. Locomotor performances were measured after one day of acclimation to lab conditions. We focused on four parameters described below. All individuals were used only once.

Hopping performance

The hopping capacities in anurans are essential locomotor performances that can reflect either predator avoidance or mobility. Hopping performances were measured in the afternoon of day 2. We used an anti-sliding support made of synthetic turf in a room set at 20°C. During the trial, toads were stimulated by gently touching the end of the urostyle to induce a hop. Toads were stimulated until no reaction appeared after 15 touches in a row. Each trial was video-recorded, so that we could measure hopping distances using ImageJ software (Rasband & S., 2012). We measured hopping performances of 16 non-carrying males, 38 carrying males and 8 deserting males (that had previously abandoned their clutch).

Righting-response

For Peer Review

This parameter provides a defence response in front of a potential predator. Righting-response was measured on a horizontal surface (plastic) in a room set to 20°C. A trial consisted on turning the toads upside down and measuring the duration needed for each toad to turn back aside. If handling induced catalepsy, data were discarded. Each trial was video-recorded, so that we could measure the number of images, convert it in seconds using the frame rate setting of our camera, and therefore determine the duration of each righting-response. We measured righting-responses of 12 non-carrying males, 41 carrying-males and 6 deserting males.

Muscular response to egg burden

We designed a simple test to address the response to gravity, *i.e.*, the burden of clutch mass on muscular performances. The individual was handled and kept vertically, and we assessed if the animal was able to maintain its hind legs close to the body (typical response). Muscular response to egg burden was measured in a room set at 20°C. Each toad was measured on ten successive occasions. Each trial lasted for 1 minute after which a new trial was started if the toad did not completely drop both hind legs indicating inability to maintain muscular contraction. If handling induced struggling, toads were immediately released, before starting again few seconds later and this procedure was repeated until ten trials were completed. We determined for each trial if the individual failed (1) or not (0) to maintain its hind legs folded over 1 minute. We also collected the time at which the toad completely dropped both legs. We estimated the muscular response to egg burden of 15 non-carrying males, 37 carrying males and 8 deserting males.

Voluntary activity

We designed a simple homing test to examine voluntary activity. We tested individuals in a room set to 20°C with toads placed in a plastic corridor (73 cm L x 11 cm W x 17 cm H) the bottom of which was covered with seven synthetic turf squares (10 cm L x 10 cm W), each representing one compartment of the corridor. A refuge, similar to the ones of the housing environment, was positioned at one extremity and a trial started with the introduction of the toad at the other extremity. Each trial lasted for 10 minutes and was video recorded. We compared the homing times and locomotion modes (number of hops vs. walking). We looked at voluntary locomotion of 16 non-carrying males, 35 carrying males, and 8 deserting males.

5) Statistics

All the statistical analyses were run on R (version 3.5.0 ; R Development Team, 2005) and R studio (version 1.2.5001). Values presented in the results are means ± standard deviation (SD). We examined SVL differences between carrying and non-carrying males using an ANOVA.

We investigated effect of reproductive status (carrying/non-carrying) and SVL on hopping response and on number of hops using glm with respectively binomial and Poisson distribution. We used mixed model (lmer with gaussian distribution) to evaluate effect of reproductive status and SVL on hop distances and reproductive status, trials and SVL on righting-response. Individual identity was sets as a random factor. Similarly, we used glmer with individual identity sets as a random factor to test the effect of reproductive status, SVL and trial on muscular response (binomial function) and muscular response time (logarithm distribution). The interactions between reproductive status and trial were never significant and thus they were discarded from our final models. Finally, we used a linear model and a glm (Poisson distribution) to

explore effect of reproductive status and SVL on homing time and number of hops in voluntary locomotion (see Table 1 for summary).

Among carrying males, the relative clutch size (size adjusted) was obtained by extracting the residuals of the linear relation between estimated clutch size and male SVL (Figure 1). We tested the effects of relative clutch size (RCS) and SVL on hop success and number of hops using glm model with respectively binomial and Poisson distribution. The effects of RCS and SVL on hop distances and righting responses, were analysed using lmer with gaussian distribution with individual identity sets as a random factor. We used lmer with logarithm distribution to investigate effect of RCS, SVL and trial on muscular response time with individual identity sets as a random factor (see Table 2 for summary).

Finally, we used binomial logistic regressions to test the influence of SVL and relative clutch size on desertion probability. We examined the influence of desertion on locomotor performances in a separate set of analysis considering only response variables that were influenced by egg carrying. We applied the same models (type and family) described above to compare carrying and non-carrying males, with the third reproductive status "deserting male" and with reproductive status as the only variable tested (*i.e.*, without SVL or trial effects). Tukey tests were then used as post-hoc analysis.

Results

1) Male morphology and clutch size

SVL was on average 35.01 ± 2.74 mm, and both carrying and non-carrying males had similar body size (ANOVA, $F_{(1,89)}$ = 0.33, p-value = 0.57). For carrying males, estimated clutch size ranged from 12 to 72 eggs (32.43 ± 12.66), and estimated clutch

size was significantly related to SVL (Figure 1, lm, $F_{(1,54)} = 18.97$, $R^2 = 0.25$, p-value < 0.0001).

2) Influence of reproductive status on performances

Hopping performance

Carrying males hopped more frequently than non-carrying ones (62.5%; n=10/16 vs 23.68%; n = 9/38; Table 1). Restricting the analysis to individuals that responded at least once, we found that the total number of hops recorded was lower in carrying-males in comparison with the non-carrying ones (10.83 ± 9.13 vs 12.67 ± 20.23; Table 1). Body size positively influenced the total number of hops independently of status (Table 1). Hopping distance was shorter for carrying males than non-carrying ones (12.53cm ± 5.16 cm vs 20.67 ± 6.68 cm; Figure 2; Table 1) but was not related to SVL (Table 1). Within carrying males, relative clutch size had a negative influence on hopping distance (Figure 3; Table 2), but not on responsiveness to stimulations or the number of hops (Table 2).

Righting-response

Righting-response was significantly influenced by reproductive status (Table 1). Carrying males required more time to flip back than non-carrying ones (0.83 ± 0.32 s vs 0.64 ± 0.23 s; Figure 4; Table 1). Righting-response was not influenced by SVL but was longer across trials (Table1), without interaction with the status. Within reproductive males, relative clutch size positively influenced righting-responses duration (Figure 5; Table 2).

Muscular response to egg burden

For Peer Review

Trial number did not influence the ability to maintain hind legs folded. However, body size had a significant influence with smaller individual being more prone to keep their legs folded (Table 1). Carrying males were less able to retain their legs (0.27%) than non-carrying ones (50.67%; Figure 6; Table 1). We found no influence of reproductive status, SVL, and relative clutch size on leg dropping time (Table 1 and 2) but males dropped faster as trials progressed (Table 1).

Voluntary locomotion

When placed in the arena, all individuals reach the refuge in an average time of 219.61 ± 129.50 seconds. We found no effect of status or SVL on homing time (Table 1). However, carrying males used less hops to reach the refuge than non-carrying ones (1.06 ± 2.63 vs 2.40 ± 3.36; Table 1). Finally, larger individuals hopped less and relied more on walking to reach the refuge (Table 1).

3) Clutch desertion

Determinant of desertion

Fourteen individuals (12.77 %) abandoned their clutch during our study. Deserting males were significantly smaller than non-deserting ones (33.64 ± 3.27 mm vs 35.54 ± 2.54 mm; binomial logistic regression, $\chi_1^2 = 5.21$, N = 63, p = 0.02). Estimated clutch size was not significantly different (deserting males: 37.36 ± 17.28 vs non-deserting males: 31.22 ± 11.18; binomial logistic regression, $\chi_1^2 = 2.01$, N = 56, p = 0.16). However, relative clutch size was significantly higher in deserting than non-deserting ones (7.20 ± 13.99 vs -1.76 ± 9.37; binomial logistic regression, $\chi_1^2 = 6.03$, N = 56, p = 0.01).

Influence on performances

Hopping probability of deserting males did not differ significantly from carrying or non-carrying males (33.33%; n=2/8; all Tukey's tests > 0.21). Deserting males performed a lower number of hops than carrying ones and non-carrying ones (5.33 ± 3.08 cm; Tukey's tests, carrying males – deserting males: $p < 0.001$, non-carrying males – deserting males: $p < 0.001$). Their hopping distance did not differ from non-carrying males (Tukey's test, $p = 0.99$) and was therefore higher than carrying males' hopping distances (20.71 ± 5.21 cm; Figure 2; Tukey's test, $p < 0.001$). Righting-responses times of deserting males were similar to that of both non-carrying males (0.70 ± 0.31 s; Figure 4; Tukey's test, $p = 0.77$) and carrying ones (Tukey's test, $p = 0.10$). Deserting males did not differ from non-carrying males in their ability to maintain hind legs folded (Tukey's test, $p = 0.61$) and were therefore more efficient than carrying ones (36.25%; Figure 6; Tukey's test, $p < 0.001$). Finally, deserting males used as much hops to reach the refuge (4.29 ± 4.35) as non-carrying males (Tukey's test, $p = 0.049$) and therefore more than carrying ones (Tukey's test, $p < 0.001$).

Discussion

Costs of PC have been widely studied but remain largely overlooked in species with reversed sex roles (Eens & Pinxten, 2000). We examined the influence of egg carrying on locomotion and behaviour in an anuran with exclusive MPC. In support to our predictions, we found that carrying males exhibited altered locomotor performances and that these comparatively poor performances were linked to their reproductive burden (relative clutch size). We also addressed the determinant of clutch desertion. We discuss our results below.

For Peer Review

Locomotor costs of egg carrying

Reproductive status had a major impact on locomotor performances. We found that carrying males hopped less, had shorter hopping distance, needed more time for righting-responses, and were unable to maintain hind leg muscular contraction. Carrying males walked instead of hopped when voluntary moving and were more responsive to stimulations across trials. Overall, all the locomotor traits we studied were negatively influenced by relative clutch size. Locomotor performances directly influence crucial ecological traits, such as foraging efficiency and anti-predation behaviour (Webb, 1986). For instance, it has been shown in arthropods that egg carrying decreases mobility, decreases food intake, and increases predator attacks (Burris, 2011; Ruhland, Chiara, & Trabalon, 2016). Therefore altered locomotor performances, as reported in this study, may well have significant fitness implications (Webb, 1986; Burris, 2011; Munguía-Steyer *et al.*, 2019). Our findings are similar to locomotor costs demonstrated in females in numerous other taxa (Ruhland *et al.*, 2016). Therefore, despite reduced prezygotic investment, MPC is likely to induce constraints similar to those typically observed in females (Ruhland *et al.*, 2016; Williams, Navins, & Lewis, 2016; Sawecki *et al.*, 2019).

The contrasted response to stimulations between carrying and non-carrying males (*e.g.*, hopping vs immobility) could also indicate a shift in anti-predation strategies (van Bergen & Beldade, 2019). Indeed, carrying males may be more susceptible to predation than non-carrying ones for two complementary reasons. First, as highlighted above, the locomotor performances of carrying males were strongly hindered by egg presence. Carrying males may benefit from early flight response to enhance their survival (Domínguez-López, Kacoliris, & Simoy, 2018). In addition, the presence of large egg

masses visible from above is likely to make carrying males more conspicuous to an approaching predator. As a consequence, carrying males are expected to rely less on cryptism (as observed in non-carrying males ; Polo-Cavia *et al.*, 2016). Such shift in anti-predation strategy would underline trade-offs between egg carrying and survival costs. As a consequence, these modified behavioural responses in carrying males may alleviate potential risks and limit survival costs linked to MPC and associated reproductive burden (Requena *et al.*, 2012).

Clutch size-dependence of locomotor costs

According to the life history theory, clutch size is a central parameter to consider when addressing potential costs of reproduction (Stearns, 1992). Such costs can be clutch size-independent or on the contrary tightly related to the reproductive effort (Ladyman *et al.*, 2003; Foucart, Heulin, & Lourdais, 2018). Addressing clutch size-dependence is essential because the proximate nature of the relation should drive evolutionary trade-offs and adaptations (Ratikainen, Haaland, & Wright, 2018). We found that larger males tended to carry larger clutches, reflecting assortative mating and/or female choice (Böll & Linsenmair, 1998). When factoring out this allometric relationship and considering relative clutch size, we found that reproductive burden negatively influenced hopping distance and righting-response time. While males may derive direct fitness benefits from carrying larger clutches relative to their size (*e.g.*, producing comparatively more offspring), potential impacts on locomotion may influence their reproductive decision and mate selection. Interestingly, other parameters such as response to stimulations and number of hops were more tightly related to reproductive status than clutch size. Therefore, egg carrying may induce both clutch size dependent and independent constraints.

Determinant of clutch desertion

Parental desertion is frequently observed in species with MPC, often reflecting a trade-off between current and future reproductive effort (Delia *et al.*, 2013; Delia, Ramírez-Bautista, & Summers, 2014; Consolmagno *et al.*, 2016; Chuang *et al.*, 2017). We found that deserting males were both smaller and carrying relatively larger clutch size. Previous studies in nest guarding amphibians have demonstrated that clutch abandon is more likely when environmental constraints are high (Consolmagno *et al.*, 2016) and reproductive benefits (number of eggs) are low (Chuang *et al.*, 2017). However, egg attendance is a flexible behaviour and clutch desertion is often temporary (Chen, Yu, & Kam, 2007; Delia *et al.*, 2013; Consolmagno *et al.*, 2016). Herein, the type of care (egg carrying) impose very different proximate constraints for the male and the clutch abandon is permanent resulting in entire clutch mortality. This relation between desertion risk and reproductive burden suggest a causal link with locomotor impairment. Importantly, clutch desertion occurs in the wild (*e.g.*, four abandoned clutches were found on the study site during the study period). Desertion may relate to inexperienced (*i.e.*, smaller, as age and body size are generally positively correlated in amphibians ; Halliday & Verrell, 1988) or exhausted individuals (*i.e.*, carrying a heavy clutch). Deserting toads had similar performances than non-carrying males for the hopping-distance, the righting-response duration, the muscular response to egg burden, and the voluntary locomotion. Therefore, the costs we detected here are more likely due to physical restriction of the legs by the clutch mass (*e.g.*, hindering effect) than physiological costs of MPC.

Ecological and evolutionary implications

PC often induces significant energy constraints by limiting movements or because reproductive activities conflict with feeding (Lourdais, Bonnet, & Doughty, 2002). However, in many taxa, foraging activities are critical for survival and must been maintained during reproduction (Marconato, Bisazza, & Fabris, 1993). This is the case in the common midwife toad that continues feeding while carrying eggs (authors' personal observations). Egg carrying likely induces additional costs of transport in relation with feeding activities. Potential costs will also depend on the quality of microhabitat and climatic conditions. Indeed, beside food intake, males may also provide direct hydric care to their eggs by immersion in water during drier nights (Boulenger, 1897). Such active PC likely increases mobility (if the water body is relatively far from the diurnal refuge) and could add significant energy and/or survival costs. Further studies are required to address the potential costs of feeding and hydric care during reproduction in this species.

The evolution of PC is based on proximate trade-offs between possible energy/survival costs and significant fitness benefits. Sex role reversal has also major implications to address this relation and test evolutionary hypothesis. MPC can be beneficial for females, which are thus freed from egg care and have more opportunities to accumulate reserves to fuel future reproductive episodes (Westneat & Fox, 2010). This is typically the case for midwife toads, for which the reproductive season is protracted (broadly from late March to late September) and includes multiple reproductive episodes for both females and males. Such a situation likely offers the opportunity for females to lay more than one clutch during a breeding season (Tallamy & Brown, 1999). In addition, males can both carry several different clutches at the same time (Márquez, 1993) and multiple sequential clutches across the breeding season. Contrarily to many other temperate amphibian species that mate communally in aquatic environments during a restricted

time period (Wells, 1977; Heyer *et al.*, 2014), mating probabilities of midwife toads are linked to spatial and temporal variations of mate availability in the terrestrial microhabitats selected by individuals (Márquez, 1992). In this context, MPC may secure mating opportunities if female presence and reproductive status is hard to predict. As a consequence, the ability for a male to sustain repeated period of MPC during the protracted reproductive season is likely to be strongly linked to its physical condition.

Conclusion

Terrestrial reproduction in amphibians is a highly discussed topic (Lion *et al.*, 2019; Vági *et al.*, 2019) and the midwife toad constitutes a valuable model for studying the determinants of exclusive MPC in this context. We highlighted clear proximate trade-offs between locomotor performances and relative clutch size, underlining that egg carrying alters male performances. Such costs are likely to shape i) the level of male commitment and ii) female mate choice depending on individual quality. This reproductive strategy (egg carrying) is unique in the Palearctic region and observed in all members of the *Alytes* genus covering rather constraining climates (dry and warm to cold) from Western Europe to North Africa. Important evolutionary benefits are likely to exist to overcome potential costs. For instance, male midwife toads actively collect the eggs from the female and fertilize them on land, which provides a robust way to secure paternity for the males (Westneat & Fox, 2010). Predation risks and competition are major drivers reproductive strategies in amphibians and MPC might have emerged to improve the survival of offspring by extracting the eggs from the breeding ponds (Pearman, 1995). Recent work suggests that males actively select their microhabitats based on their thermal and hydric properties (Lange, Brischoux, & Lourdais, 2020).

Further studies are now required to explore the fitness benefits of exclusive MPC and to better understand the determinant of male egg-carrying in this group.

Acknowledgment

The authors thank Alexandre Boissinot for finding the study site and Lisa Poncet for participation in data collection. We warmly thank the sawmill company "Marteau-Bois" for allowing to access to their site. We also thank Jean-Pierre Vacher for his constructive comments that have considerably improved the manuscript.

Funding

This study received the financial and technical support from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and was funded by La Rochelle Université (PhD grant to LL) and by the Region Nouvelle-Aquitaine under the 'Aquastress' project (2018-1R20214 to OL).

Ethics

This study was performed in accordance with laws relative to capture, transport, and experiments on *Alytes obstetricans* (DREAL permit #04022016) and all procedures were approved by an independent ethical committee (Apafis #14193-2018032114365130 v3)

Authors' contributions

LL carried out the field work and lab experiments, carried out the statistical analyses, participated in the design of the study and drafted the manuscript ; LB helped with the field work and lab experiments, participated in the design of the study and help draft the

For Peer Review

manuscript ; OL & FB conceived and coordinated the study, participated in data analysis, and critically revised the manuscript. All authors gave final approval for publication and agree to be held accountable for the work performed therein.

References

Ahnesjo I. 1995. Temperature affects male and female potential reproductive rates differently in the sex-role reversed pipefish, *Syngnathus typhle*. *Behavioral Ecology* **6**: 229–233.

Alissa LM, Muniz DG & Machado G. 2017. Devoted fathers or selfish lovers ? Conflict between mating effort and parental care in a harem-defending arachnid. *Journal of Evolutionary Biology* **30**: 191–201.

Alonso-Alvarez C & Velando A. 2012. Benefits and costs of parental care. In: Royle NJ, Smiseth PT, Kölliker M, eds. *The evolution of parental care*. Oxford: Oxford University Press, 40–61.

Beck CW. 1998. Mode of fertilization and parental care in anurans. *Animal Behaviour* **55**: 439–449.

van Bergen E & Beldade P. 2019. Seasonal plasticity in anti-predatory strategies: Matching of color and color preference for effective crypsis. *Evolution Letters* **3**: 313–320.

Bleu J, Gamelon M & Sæther BE. 2016. Reproductive costs in terrestrial male vertebrates: Insights from bird studies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**: 20152600.

Böll S & Linsenmair K. 1998. Size-dependent male reproductive success and size-assortative mating in the midwife toad *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia* **19**: 75–

89.

Bosch J & Márquez R. 1996. Discriminant functions for sex identification in two midwife toads (*Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*). *Herpetological Journal* **6**: 105–110.

Boulenger G. 1897. *The tailless batrachians of Europe*. London: Printed for the Ray Society.

Bukhari SA, Saul MC, James N, Bensky MK, Stein LR, Trapp R & Bell AM. 2019. Neurogenomic insights into paternal care and its relation to territorial aggression. *Nature Communications* **10**: 4437.

Burris ZP. 2011. Costs of exclusive male parental care in the sea spider *Achelia simplissima* (Arthropoda: Pycnogonida). *Marine Biology* **158**: 381–390.

Chen YH, Yu HT & Kam YC. 2007. The ecology of male egg attendance in an arboreal breeding frog, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae), from Taiwan. *Zoological Science* **24**: 434–440.

Chuang MF, Lee WH, Sun JS, You CH, Kam YC & Poo S. 2017. Predation risk and breeding site value determine male behavior and indirectly affect survivorship of their offspring. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **71**: 122.

Clutton-Brock TH. 1991. *The evolution of parental care*. Princeton, New-Jersey: Princeton University Press.

Consolmagno RC, Requena GS, Machado G & Brasileiro CA. 2016. Costs and benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **70**: 785–795.

534 **Crespi B & Semeniuk C. 2004**. Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate
535 reproductive mode. *American Naturalist* **163**: 635–653.

536 **Crump ML. 1996**. Parental care among the amphibia. *Advances in the Study of*
537 *Behavior* **25**: 109–144.

538 **Crump ML. 2015**. Anuran reproductive modes : evolving perspectives. *Journal of*
539 *Herpetology* **49**: 1–16.

540 **Dawkins R & Carlisle TR. 1976**. Parental investment, mate desertion and a fallacy.
541 *Nature* **262**: 131–133.

542 **Delia JRJ, Ramirez-Bautista A & Summers K. 2013**. Parents adjust care in response
543 to weather conditions and egg dehydration in a Neotropical glassfrog. *Behavioral*
544 *Ecology and Sociobiology* **67**: 557–569.

545 **Delia JRJ, Ramírez-Bautista A & Summers K. 2014**. Glassfrog embryos hatch early
546 after parental desertion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**:
547 20133237.

548 **Domínguez-López ME, Kacoliris FP & Simoy MV. 2018**. Escape behavior in gravid
549 and non-gravid females of gonatodes albogularis (Squamata: Sphaerodactylidae).
550 *Phyllomedusa* **17**: 73–81.

551 **Downie JR, Robinson E, Linklater-McLennan RJ, Somerville E & Kamenos N.**
552 **2005**. Are there costs to extended larval transport in the Trinidadian stream frog,
553 *Mannophryne trinitatis* (Dendrobatidae)? *Journal of Natural History* **39**: 2023–2034.

554 **Duellman WE & Trueb L. 1994**. *Biology of amphibians*. Baltimore, Maryland: Johns
555 Hopkins University press.

For Peer Review

556 **Dugas MB, Wamelink CN, Killius AM & Richards-Zawacki CL. 2016**. Parental
557 care is beneficial for offspring, costly for mothers, and limited by family size in an egg-
558 feeding frog. *Behavioral Ecology* **27**: 476–483.

559 **Dulac C, O'Connell LA & Wu Z. 2014**. Neural control of maternal and paternal
560 behaviors. *Science* **345**: 765–770.

561 **Eens M & Pinxten R. 2000**. Sex-role reversal in vertebrates: behavioural and
562 endocrinological accounts. *Behavioural Processes* **51**: 135–147.

563 **Foucart T, Heulin B & Lourdais O. 2018**. Small changes, big benefits: testing the
564 significance of maternal thermoregulation in a lizard with extended egg retention.
565 *Biological Journal of the Linnean Society* **125**: 280–291.

566 **Furness AI & Capellini I. 2019**. The evolution of parental care diversity in
567 amphibians. *Nature Communications* **10**: 4709.

568 **Gilbert JDJ & Manica A. 2015**. The evolution of parental care in insects: A test of
569 current hypotheses. *Evolution* **69**: 1255–1270.

570 **Gross MR & Shine R. 1981**. Parental care and mode of fertilization in ectothermic
571 vertebrates. *Evolution* **35**: 775.

572 **Halliday TR & Verrell PA. 1988**. Body Size and Age in Amphibians and Reptiles.
573 *Journal of Herpetology* **22**: 253.

574 **Hayward A & Gillooly JF. 2011**. The cost of sex: Quantifying energetic investment in
575 gamete production by males and females. *PLoS ONE* **6**.

576 **Heyer R, Donnelly MA, Foster M & Mcdiarmid R. 2014**. *Measuring and monitoring*

biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonia Institution.

Kahn AT, Schwanz LE & Kokko H. 2013. Paternity protection can provide a kick-start for the evolution of male-only parental care. *Evolution* **67**: 2207–2217.

Kight SL, Batino M & Zhang Z. 2006. Temperature-dependent parental investment in the giant waterbug *Belostoma flumineum* (Heteroptera: Belostomatidae). *Annals of the Entomological Society of America* **93**: 340–342.

Kokko H & Jennions MD. 2008. Parental investment, sexual selection and sex ratios. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 919–948.

Kvarnemo C. 2006. Evolution and maintenance of male care: is increased paternity a neglected benefit of care? *Behavioral Ecology* **17**: 144–148.

Ladyman M, Bonnet X, Lourdais O, Bradshaw D & Naulleau G. 2003. Gestation, thermoregulation, and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: evidence for fecundity-independent costs. *Physiological and Biochemical Zoology* **76**: 497–510.

Lange L, Brischoux F & Lourdais O. 2020. Midwife toads (*Alytes obstetricans*) select their diurnal refuges based on hydric and thermal properties. *Amphibia-Reptilia*. In press.

Lion MB, Mazzochini GG, Garda AA, Lee TM, Bickford D, Costa GC & Fonseca CR. 2019. Global patterns of terrestriality in amphibian reproduction. *Global Ecology and Biogeography*: 1–13.

Lourdais O, Bonnet X & Doughty P. 2002. Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal of Experimental Zoology* **292**: 487–493.

Marconato A, Bisazza A & Fabris M. 1993. The cost of parental care and egg cannibalism in the river bullhead, *Cottus gobio L.* (Pisces, Cottidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **32**: 229–237.

Márquez R. 1990. Male parental care, sexual selection and the mating system of the midwife toads *Alytes obstetricans* and *Alytes cisternasii*.

Márquez R. 1992. Terrestrial paternal care and short breeding seasons: reproductive phenology of the midwife toads *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*. *Ecography* **15**: 279–288.

Márquez R. 1993. Male reproductive success in two midwife toads, *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **32**: 283–291.

Munguía-Steyer R, González-García E, Castaños CE & Córdoba-Aguilar A. 2019. Costly parenting: physiological condition over time and season in males of the giant waterbug *Abedus dilatatus*. *Physiological Entomology* **44**: 236–244.

Nazareth TM & Machado G. 2010. Mating system and exclusive postzygotic paternal care in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones). *Animal Behaviour* **79**: 547–554.

Pearman PB. 1995. Effects of pond size and consequent predator density on two species of tadpoles. *Oecologia* **102**: 1–8.

Pinya S & Pérez-Mellado V. 2014. Clutch size in wild populations of *Alytes muletensis*. *Acta Herpetologica* **9**: 115–117.

Polo-Cavia N, Oliveira JM, Redondo Villa AJ & Márquez R. 2016. Background colour matching in a wild population of *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia* **37**: 1–8.

Quesada-Hidalgo R, Solano-Brenes D, Requena GS & Machado G. 2019. The good fathers: efficiency of male care and the protective role of foster parents in a Neotropical arachnid. *Animal Behaviour* **150**: 147–155.

Rasband WS & S. W. 2012. ImageJ: Image processing and analysis in Java. *Astrophysics Source Code Library, record ascl:1206.013*.

Ratikainen II, Haaland TR & Wright J. 2018. Differential allocation of parental investment and the trade-off between size and number of offspring. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285**: 20181074.

Reguera P & Gomendio M. 1999. Predation costs associated with parental care in the golden egg bug *Phyllomorpha laciniata* (Heteroptera: Coreidae). *Behavioral Ecology* **10**: 541–544.

Requena GS, Buzatto BA, Martins EG & Machado G. 2012. Paternal care decreases foraging activity and body condition, but does not impose survival costs to caring males in a neotropical arachnid (SA Rands, Ed.). *PLoS ONE* 7: e46701.

Ridley M. 1978. Paternal care. *Animal Behaviour* **26**: 904–932.

Ringler E, Pašukonis A, Fitch WT, Huber L, Hödl W & Ringler M. 2015. Flexible compensation of uniparental care: Female poison frogs take over when males disappear. *Behavioral Ecology* **26**: 1219–1225.

Royan A, Muir AP & Downie JR. 2010. Variability in escape trajectory in the Trinidadian stream frog and two treefrogs at different life-history stages. *Canadian Journal of Zoology* **88**: 922–934.

Royle NJ, Alonzo SH & Moore AJ. 2016. Co-evolution, conflict and complexity: what

have we learned about the evolution of parental care behaviours? *Current Opinion in Behavioral Sciences* **12**: 30–36.

Royle NJ, Smiseth PT & Kölliker M. 2012. *The evolution of parental care*. Oxford: Oxford University Press.

Ruhland F, Chiara V & Trabalon M. 2016. Age and egg-sac loss determine maternal behaviour and locomotor activity of wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Behavioural Processes* **132**: 57–65.

Sawecki J, Miros E, Border SE & Dijkstra PD. 2019. Reproduction and maternal care increase oxidative stress in a mouthbrooding cichlid fish (M Taborsky, Ed.). *Behavioral Ecology* **30**: 1662–1671.

da Silva FR, Almeida-Neto M, do Prado VHM, Haddad CFB & de Cerquira Rossa-Feres D. 2012. Humidity levels drive reproductive modes and phylogenetic diversity of amphibians in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* **39**: 1720–1732.

Stearns SC. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford: Oxford University Press.

Svensson I. 1988. Reproductive costs in two sex-role reversed Pipefish species (Syngnathidae). *Journal of Animal Ecology1* **57**: 929–942.

Tallamy D & Brown W. 1999. Semelparity and the evolution of maternal care in insects. *Animal Behaviour* **57**: 727–730.

Team RD. 2005. A language and environment for statistical computing.

Townsend DS. 1986. The costs of male parental care and its evolution in a neotropical

663 frog. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **19**: 187–195.

664 **Townsend DS, Stewart MM & Pough FH. 1984**. Male parental care and its adaptive
665 significance in a neotropical frog. *Animal Behaviour* **32**: 421–431.

666 **Trivers RL. 1972**. *Parental investment and sexual selection*. Chicago, Illinois: Aldine
667 Publishing Company.

668 **Úbeda CA & Nuñez J. 2006**. New parental care behaviours in two telmatobiine genera
669 from temperate Patagonian forests: *Batrachyla* and *Eupsophus* (Anura:
670 Leptodactylidae). *Amphibia Reptilia* **27**: 441–444.

671 **Vági B, Végvári Z, Liker A, Frckleton RP & Székely T. 2019**. Parental care and the
672 evolution of terrestriality in frogs. *Proceedings of the Royal Society B* **286**: 20182737.

673 **Verrell PA & Brown LE. 1993**. Competition among females for mates in a species
674 with male parental care, the midwife toad *Alytes obstetricans*. *Ethology* **93**: 247–257.

675 **Webb PW. 1986**. Locomotion and predator-prey relationships. In: Feder ME, Lauder G
676 V., eds. *Predator-prey relationships*. Chicago, Illinois: University of Chicago Press,
677 24–41.

678 **Wells KD. 1977**. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* **25**:
679 666–693.

680 **Wells E, Garcia-Alonso D, Rosa GM & Tapley B. 2015**. Husbandry Guidelines for
681 *Alytes*.

682 **Westneat DF & Fox CW. 2010**. *Evolutionary behavioral ecology* (DF Westneat and
683 CW Fox, Eds.). Oxford: Oxford University Press.

For Peer Review

684 **Williams KL, Navins KC & Lewis SE. 2016**. Behavioral responses to predation risk in
685 brooding female amphipods (*Gammarus pseudolimnaeus*). *Journal of Freshwater*
686 *Ecology* **31**: 571–581.

687

For Peer Review

688 **Table captions**

689 **Table 1**. Statistical output of the models used to test for the influence of reproductive
690 status (deserting males not included), SVL, and trial on midwife toad locomotor
691 performances. Loc.: locomotion. SE: standard error. SVL: snout to vent length.

692

693 **Table 2**. Statistical output of the models used to test for the influence of relative clutch
694 size (RCS), SVL, and trial on locomotor performances in carrying males. SE: standard
695 error. SVL: snout to vent length.

For Peer Review

Figure captions

Figure 1. Relation between estimated clutch size and snout-vent length (SVL). The line represents the fitted linear regression and the grey area the 95% confidence interval.

Figure 2. Effect of reproductive status on hopping distance. Boxes represent the intervals between the 25% and 75% quartiles and the whiskers represent the ranges. The middle horizontal lines in the box plots represent the medians. Different letters indicate significant differences between groups.

Figure 3. Influence of relative clutch size on hop distance. Relative clutch size was determined from the residuals of the linear regression between estimated clutch size against SVL (see text for details). The line represents the fitted linear regression and the grey area the 95% confidence interval. Closed circles represent mean individual values and the whiskers the standard deviations.

Figure 4. Effect of reproductive status on righting-response. Boxes represent the intervals between the 25% and 75% quartiles and the whiskers represent the ranges. The middle horizontal lines in the box plots represent the medians. Different letters indicate significant differences between groups.

Figure 5. Influence of relative clutch size on righting-response. The line represents the fitted linear regression and the grey area the 95% confidence interval. Closed circles represent mean individual values and the whiskers the standard deviations.

For Peer Review

720 **Figure 6.** Effect of reproductive status on proportions of leg dropping. The bars
721 represent the proportions for each category. Different letters indicate significant
722 differences between groups.

For Peer Review

Table 1.

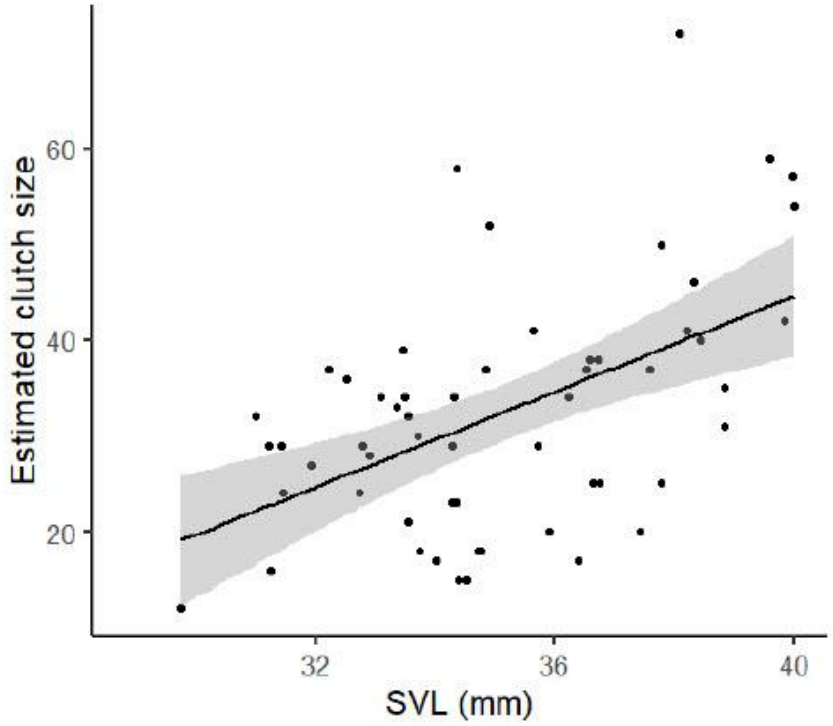
Response variable	LM type - Family	Random effect	Explanatory variables	Estimate	SE	z/t value	*p-value*
Hop response (0/1)	Glm - Binomial	None	(Intercept)	-0.32	4.22	-0.08	0.94
			Status	1.68	0.64	2.61	**0.009**
			SVL	-5.37e-3	0.12	-0.05	0.96
Number of hops	Glm - Poisson	None	(Intercept)	-3.34	0.79	-4.23	**<0.0001**
			Status	-0.37	0.13	-2.83	**0.005**
			SVL	0.17	0.02	7.59	**<0.0001**
Hop distances	Lmer - Gaussian	(1|Individual)	(Intercept)	16.78	14.99	1.12	0.27
			Status	-8.74	2.72	-3.22	**0.003**
			SVL	0.12	0.43	0.27	0.79
Righting-response (time)	Lmer - Gaussian	(1|Individual)	(Intercept)	0.18	0.29	0.63	0.53
			Status	0.19	0.05	3.92	**<0.001**
			Trial	0.02	4.19e-03	5.50	**<0.0001**
			SVL	9.47e-03	7.88e-03	1.20	0.24
Muscular response (0/1)	Glmer - Binomial	(1|Individual)	(Intercept)	-20.76	5.89	-3.53	**<0.001**
			Status	7.44	1.38	5.41	**<0.0001**
			SVL	0.59	0.17	3.52	**<0.001**
			Trial	0.03	0.08	0.34	0.73
Muscular response (time)	Lmer - Logarithm	(1|Individual)	(Intercept)	2.30	2.64	0.87	0.39
			Status	-0.07	0.45	-0.15	0.88
			SVL	-0.05	0.07	-0.73	0.47
			Trial	-0.18	0.04	-4.91	**<0.0001**
Homing time	Lm - Gaussian	None	(Intercept)	114.18	268.90	0.42	0.67
			Status	-1.84	41.42	-0.04	0.97
			SVL	3.05	7.67	0.40	0.69
Number of hops (Voluntary loc.)	Glm - Poisson	None	(Intercept)	11.85	1.85	6.40	**<0.0001**
			Status	-0.62	0.24	-2.54	**0.01**
			SVL	-0.33	0.06	-5.77	**<0.0001**

For Peer Review

Table 2.

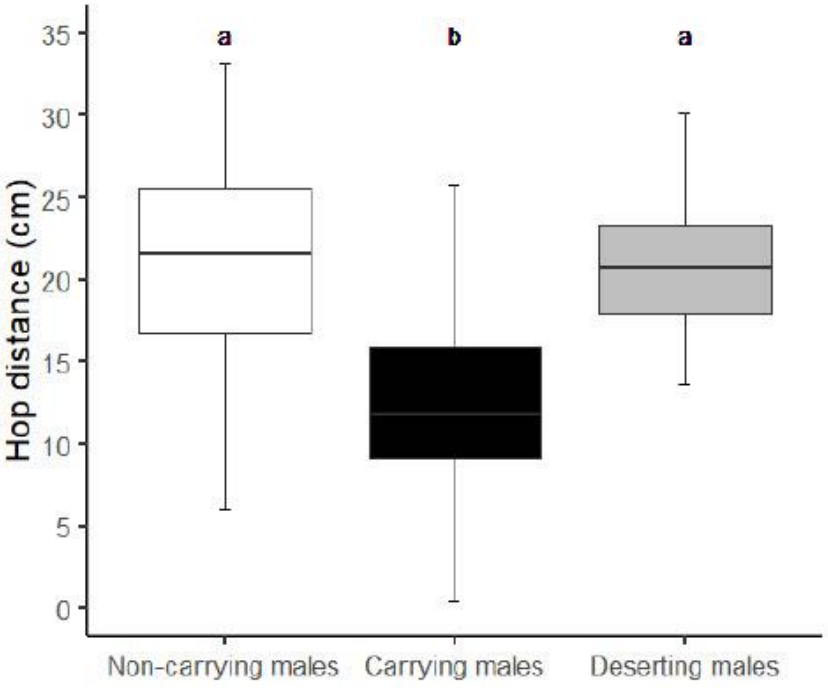
Response variable	LM type - Family	Random effect	Explanatory variables	Estimate	SE	z/t value	*p-value*
Hop response (0/1)	Glm - Binomial	None	(Intercept)	-2.01	5.77	-0.35	0.73
			RCS	0.02	0.04	0.46	0.65
			SVL	0.09	0.16	0.55	0.58
Number of hops	Glm - Poisson	None	(Intercept)	-2.24	0.86	-2.61	**0.009**
			RCS	0.01	0.01	1.38	0.17
			SVL	0.13	0.02	5.45	**<0.0001**
Hop distances	Lmer - Gaussian	(1|Individual)	(Intercept)	13.99	11.90	1.18	0.25
			RCS	-0.26	0.08	-3.27	**0.003**
			SVL	-0.05	0.33	-0.14	0.89
Righting-response (time)	Lmer - Gaussian	(1|Individual)	(Intercept)	0.34	0.33	1.05	0.30
			RCS	7.21e-3	2.56e-3	2.82	**0.008**
			SVL	0.01	9.28e-3	1.15	0.26
			Trial	0.02	5.03e-3	4.46	**<0.0001**
Muscular response (time)	Lmer - Logarithm	(1|Individual)	(Intercept)	2.01	2.37	0.85	0.40
			RCS	0.03	0.02	1.53	0.14
			SVL	-0.04	0.07	-0.63	0.53
			Trial	-0.19	0.04	-5.05	**<0.0001**

For Peer Review

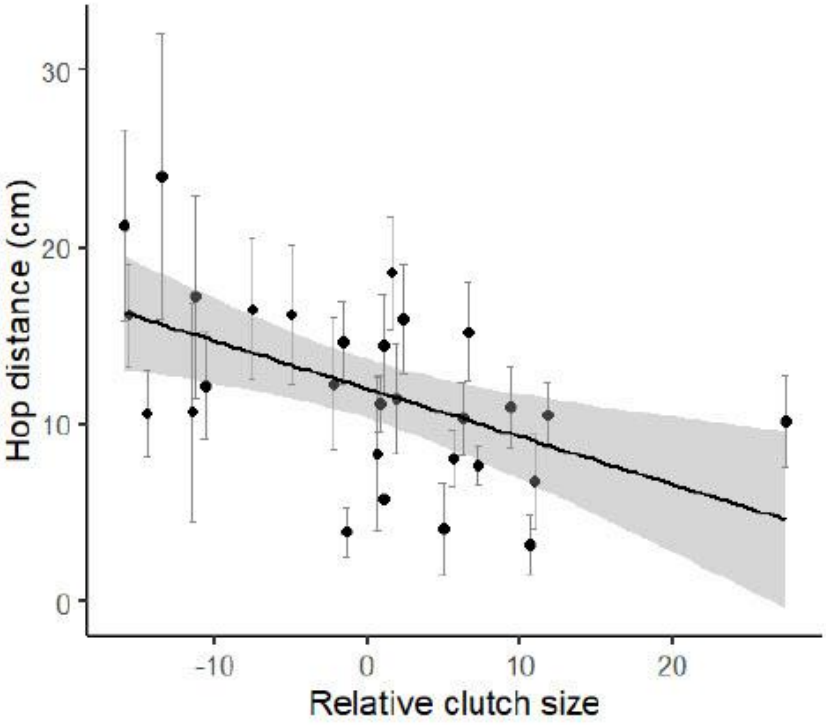


139x121mm (96 x 96 DPI)

282

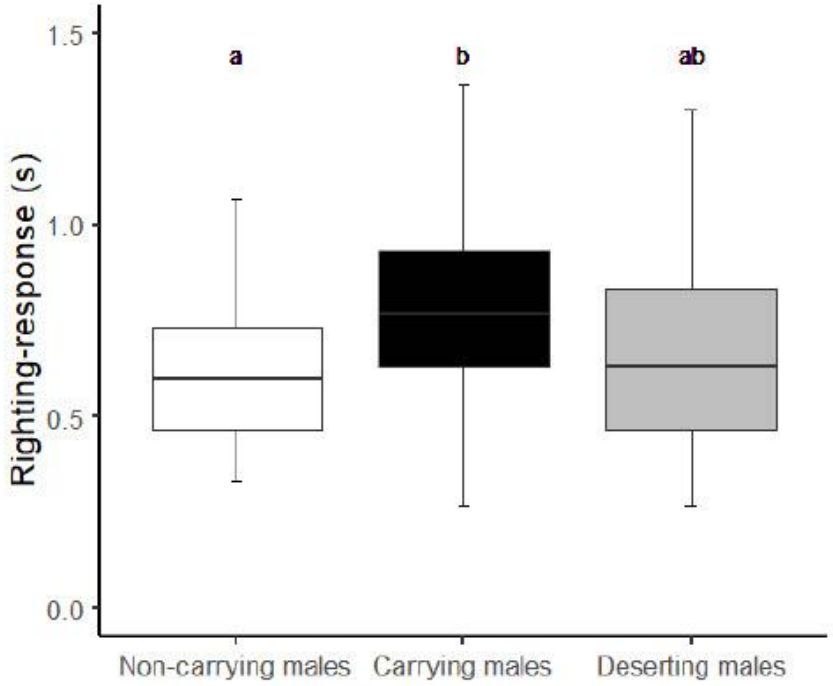


139x121mm (96 x 96 DPI)

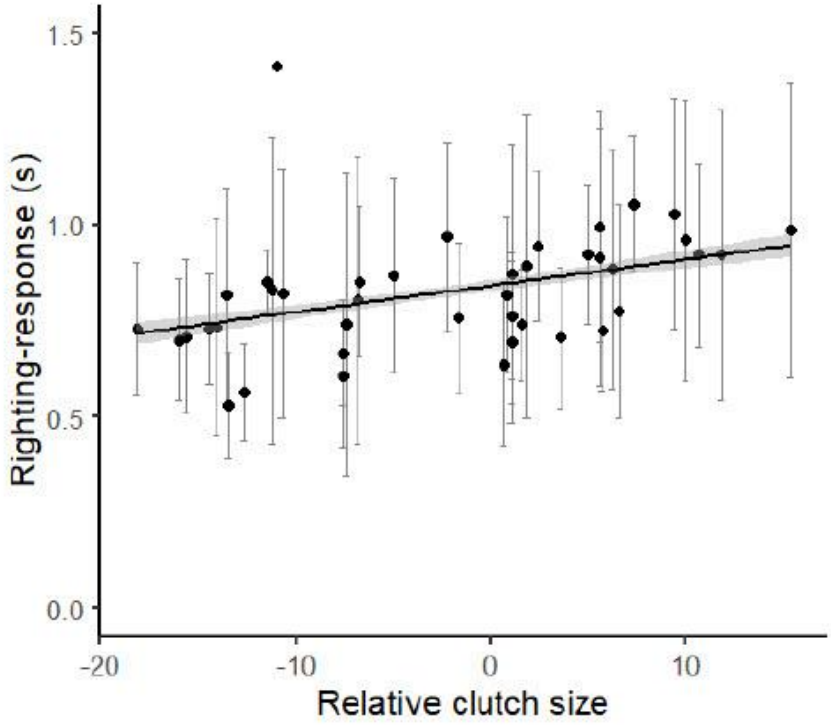


139x121mm (96 x 96 DPI)

284

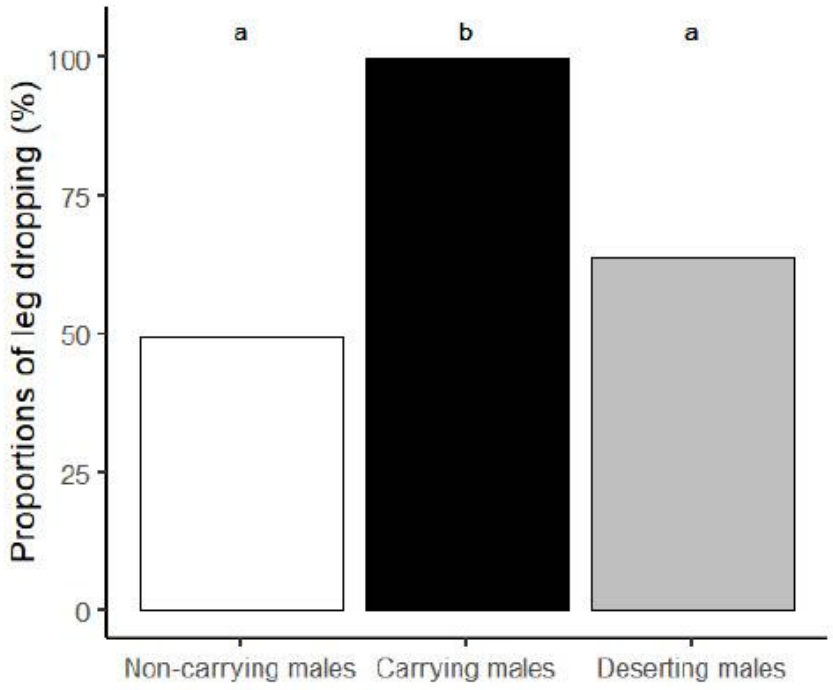


139x121mm (96 x 96 DPI)



139x121mm (96 x 96 DPI)

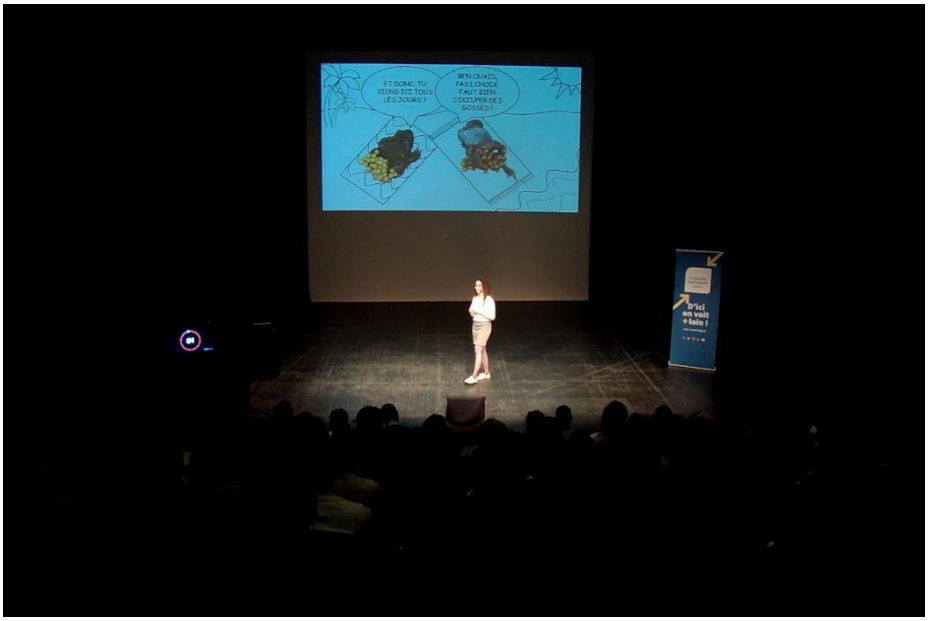
286



139x121mm (96 x 96 DPI)

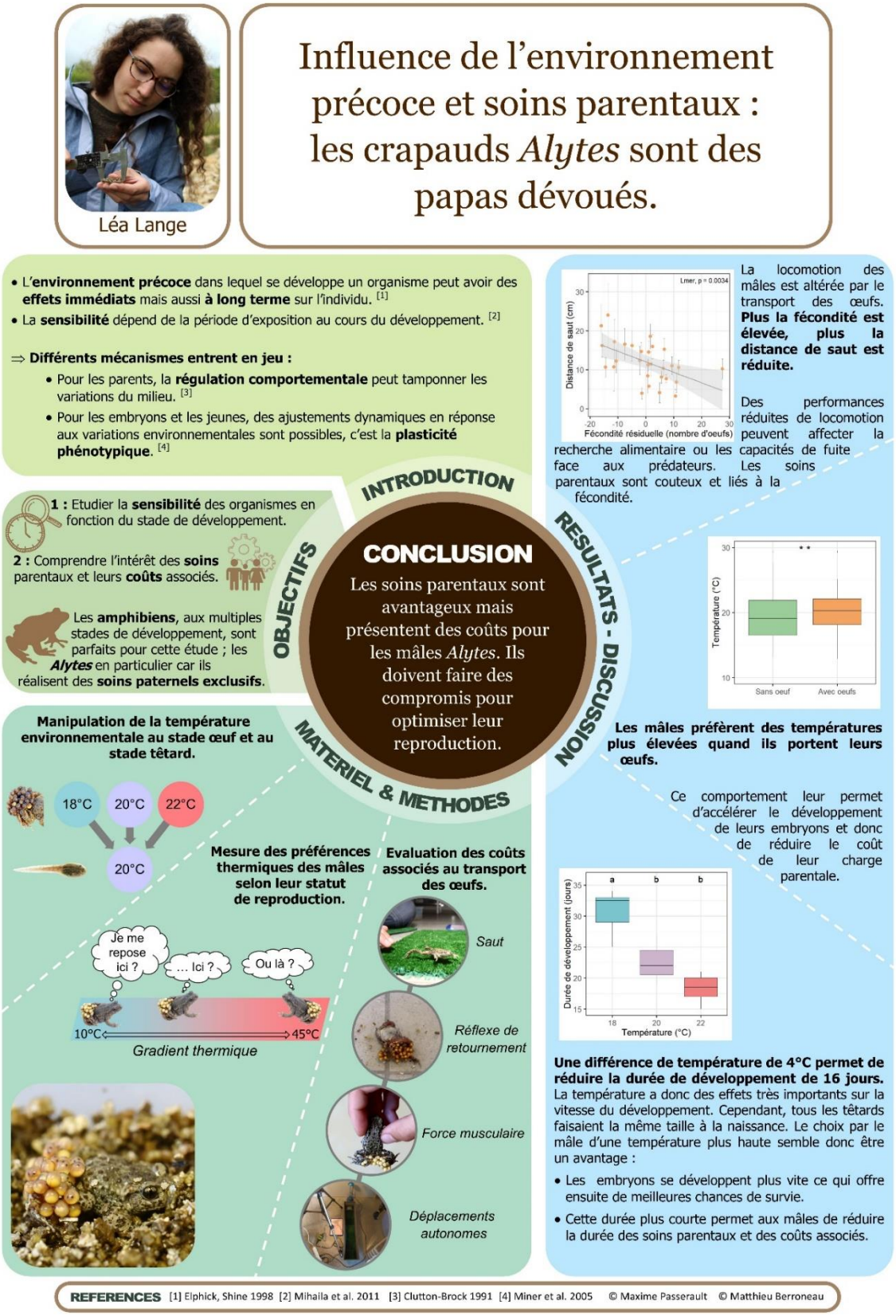
ANNEXE 4 : Visuels créés pour l'animation d'un atelier dans le cadre de la fête de la science

ANNEXE 5 : Participation au concours MT180s (capture d'écran, lien et visuel)



https://www.youtube.com/watch?v=pVQNGV3YJio

ANNEXE 6 : Poster réalisé pour le colloque de vulgarisation scientifique des doctorants de 2ème année de l'école doctorale Euclide – Prix du meilleur poster



Influences environnementales précoces et plasticité phénotypique : étude d'un modèle amphibien avec soins parentaux prénataux, l'Alyte accoucheur

Résumé : L'Alyte accoucheur (*Alytes obstetricans*) est une espèce d'amphibien où les soins parentaux sont réalisés par le mâle exclusivement. En effet, après l'accouplement, durant lequel le mâle participe activement à l'émission des œufs, il attache sa ponte autour des articulations de ses membres postérieurs et la porte ainsi pendant tout le développement embryonnaire. Les amphibiens sont très sensibles à l'environnement abiotique, notamment aux conditions hydriques et thermiques. Pour éviter les températures extrêmes, ils peuvent thermoréguler comportementalement, par exemple en sélectionnant des refuges aux conditions microclimatiques favorables. Les Alytes accoucheurs ont montré une sélection de leurs refuges sur la base de leurs propriétés hydriques et thermiques. Les stades de développement précoces sont particulièrement sensibles à la température. Les parents peuvent alors réaliser des comportements parentaux pour en limiter les effets. Un effet phénologique paternel a été observé chez les Alytes accoucheurs, dont les mâles favorisent des températures plus élevées lorsqu'ils portent des œufs. Les comportements parentaux sont cependant coûteux pour les adultes. Les Alytes accoucheurs ont présenté des performances de locomotion diminuées pendant le port des œufs, ce qui pourrait induire une diminution de l'aptitude. De plus, les comportements parentaux influencent fortement le développement des jeunes. L'environnement thermique rencontré pendant le stade embryonnaire, et donc pendant la période de soins parentaux chez l'Alyte accoucheur, a eu des effets à court terme et des effets persistants sur la phénologie. L'environnement thermique rencontré pendant le stade larvaire peut également être déterminant. Chez l'Alyte accoucheur, l'environnement thermique postnatal a induit un basculement vers un développement pluriannuel lors d'un développement à 16°C, avec un hivernage au stade têtard, alors qu'il a été annuel lors d'un développement à 20°C et 24°C. L'environnement thermique postnatal a également impliqué des modifications morphologiques, physiologiques et comportementales. Enfin, une implication de la physiologie, et notamment de la fréquence cardiaque, a été observée tout au long du développement embryonnaire et larvaire des jeunes.

Mots-clés : soins parentaux mâles, port des œufs, coûts associés aux soins parentaux, thermorégulation, hydrorégulation, stades précoces, développement embryonnaire, développement larvaire, phénologie, phénotype, performances, aptitude

Early environmental influences and phenotypic plasticity: study of an amphibian model with prenatal parental care, the common Midwife toad

Summary: The common Midwife toad (*Alytes obstetricans*) is a species of amphibian in which parental care is performed exclusively by the male. Indeed, after mating, during which the male actively helps the female for the emission of the eggs, he attaches the clutch around the joints of his hind limbs and thus carries it throughout embryonic development. Amphibians are very sensitive to the abiotic environment, especially to hydric and thermal conditions. To avoid extreme temperatures, they can behaviourally thermoregulate, for example by selecting refuges with favourable microclimatic conditions. The common Midwife toad has shown a selection of their refuges based on their hydric and thermal properties. The early stages of development are particularly sensitive to temperature. Parents can then carry out parental care to limit the effects. A paternal phenological effect has been observed in common Midwife toad, whose males favour higher temperatures when they carry eggs. Parental care is costly for adults, however. The common Midwife toad exhibited decreased locomotion performances during egg carrying, which could lead to decreased fitness. In addition, parental care strongly influences the development of young. The thermal environment encountered during the embryonic stage, and therefore during the period of parental care in the common Midwife toad, had both short-term and persistent effects on the phenology. The thermal environment encountered during the larval stage can also be decisive. In the common Midwife toad, the postnatal thermal environment induced a switch to multi-year development during development at 16 ° C, with overwintering at the tadpole stage, whereas it was annual during development at 20 ° C and 24 ° C. The postnatal thermal environment has also involved morphological, physiological, and behavioural changes. Finally, an involvement of physiology, and in particular heart rate, has been observed throughout the embryonic and larval development of the young.

Keywords: male parental care, eggs carrying, parental care associated costs, thermoregulation, hydroregulation, early stages, embryonic development, larval development, phenology, phenotype, performances, fitness

CEBC (Centre d'Etudes Biologiques de Chizé)

405, route de Prissé-la-Charrière

79 360 Villiers-en-Bois