



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 15512

To cite this version :

Labidalle, Chloé. *Impact d'un stress aigu sur la reproduction de la vipère aspic *Vipera aspis**. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 118 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

IMPACT D'UN STRESS AIGU SUR LA REPRODUCTION DE LA VIPERE ASPIC

Vipera aspis

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LABIDALLE Chloé
Née, le 21 février 1990 à Paris (75)

Directeur de thèse : Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD

JURY

PRESIDENT :
M. Gérard CAMPISTRON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD
Mme Véronique GAYRARD

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Xavier BONNET

Directeur de recherche au Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CNRS)

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Gérard CAMPISTRON,

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommage respectueux.

A Madame la Professeure Sylvie CHASTANT-MAILLARD,

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie de la Reproduction,

Pour avoir accepté de m'accompagner dans ce travail,

Pour son enthousiasme et sa disponibilité,

Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur Xavier BONNET,

Directeur de Recherche au Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (Centre National de la Recherche Scientifique),

Pour m'avoir permis de concrétiser mes aspirations herpétologiques,

Pour sa bonne humeur, son aide et ses enseignements,

Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

A Madame la Professeure Véronique GAYRARD-TROY,

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Physiologie de la Reproduction – Endocrinologie,

Qui me fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,

Sincères remerciements.

A Monsieur Bruno GATTOLIN,

Pour m'avoir guidée dans mes premières orientations professionnelles et m'avoir encouragée à ne pas renoncer à l'herpétologie,

Pour avoir posé la première pierre de cette thèse,

Qu'il trouve ici l'expression de mes profonds remerciements.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES TABLEAUX.....	14
LISTE DES ANNEXES	15
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	16
INTRODUCTION.....	17
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I. Présentation générale de la vipère aspic	21
I. 1. Position systématique	21
I. 2. Morphologie et critères d'identification.....	21
I. 3. Répartition géographique – Mode de vie – Alimentation	22
I. 4. Anatomie générale.....	23
I. 5. Anatomie de l'appareil génital	24
I. 5. a. Appareil génital femelle	24
I. 5. b. Appareil génital mâle.....	26
II. Reproduction de la vipère aspic.....	30
II. 1. Physiologie de la reproduction chez la femelle.....	30
II. 1. a. Ovogenèse	30
II. 1. b. Vitellogenèse	31
II. 1. c. Ovulation	33
II. 1. d. Après l'ovulation : le corps jaune.....	33
II. 1. e. Fécondation, placentogenèse et gestation.....	34
II. 1. f. Régulation hormonale : l'axe gonadotrope	36
II. 2. Etude des hormones sexuelles au cours du cycle reproducteur chez la vipère aspic femelle.....	38
II. 2. a. 17 β -œstradiol.....	38
II. 2. b. Progestérone	38
II. 3. Variations biochimiques au cours du cycle reproducteur chez la vipère aspic femelle.....	39
II. 3. a. Calcium et Phosphore.....	39

II. 3. b. Albumine	41
II. 3. c. Protéines totales	42
II. 3. d. Cholestérol.....	42
II. 3. e. Phospholipides.....	43
II. 3. f. Triglycérides.....	44
II. 4. Physiologie de la reproduction chez le mâle	44
II. 4. a. Spermatogenèse	44
II. 4. b. Etudes des hormones sexuelles.....	46
II. 5. Cycle reproducteur	47
II. 5. a. Généralités	47
II. 5. b. Etat corporel et réserves métaboliques : Body Condition Index, « capital-breeding »	49
II. 5. c. Impact du comportement alimentaire	50
II. 5. d. Température et environnement.....	51
III. Le stress chez la vipère aspic.....	53
III. 1. Définitions et généralités.....	53
III. 2. La réponse au stress.....	53
III. 2. a. Le Syndrome Général d'Adaptation.....	53
III. 2. b. Le déroulement physiologique de la réponse au stress.....	54
III. 2. c. Les glucocorticoïdes, marqueurs de stress	55
III. 2. d. Cinétique de la production de corticostérone en réponse à un stress aigu chez la vipère aspic.....	57
III. 3. Stress et reproduction	58
III. 3. a. La corticostérone, une « aide » à la reproduction chez les reptiles ?	58
III. 3. b. Une influence variable : stress aigu vs. stress chronique	59
III. 3. c. Influence de la saison et du cycle reproducteur.....	60
III. 3. d. Impact du stress sur les gonades et sur le déroulement du processus reproducteur.....	61
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE	65
I. Matériel et méthodes.....	67
I. 1. Animaux	67
I. 1. a. Elevage	67
I. 1. b. Conduite de la reproduction	67
I. 1. c. Captures.....	68
I. 2. Choix des marqueurs	69
I. 2. a. Marqueurs de la reproduction.....	69
I. 2. b. Marqueurs de stress : corticostérone et glucose	69
I. 3. Protocole.....	70
I. 3. a. Principe.....	70
I. 3. b. Prises de sang	71

I. 4.	Mesures biochimiques et hormonales	72
I. 4. a.	Dosage du glucose par coulométrie.....	72
I. 4. b.	Dosage des hormones stéroïdiennes par radio-immunologie (corticostérone, testostérone et progestérone)	73
I. 4. c.	Dosage des métabolites plasmatiques par spectrophotométrie (glucose, protéines totales, calcium, cholestérol et triglycérides).....	77
I. 5.	Etudes statistiques	79
II.	Résultats et discussion	80
II. 1.	Comparaison des mesures de glucose (spectrophotomètre vs. glucomètre)	80
II. 2.	Le glucose, marqueur de stress comparable à la corticostérone ?.....	81
II. 2. a.	Relation entre les taux de glucose et de corticostérone	81
II. 2. b.	Evolution de la corticostérone après exposition à un stress	82
II. 2. c.	Evolution du glucose après exposition à un stress	84
II. 3.	Influence du sexe sur la réponse au stress	85
II. 3. a.	Influence du sexe sur le taux de corticostérone	85
II. 3. b.	Influence du stress sur le taux de glucose.....	86
II. 3. c.	Comparaison de l'amplitude de la réponse au stress.....	87
II. 4.	Impact du stress sur les taux des métabolites marqueurs de la gestation	89
II. 5.	Impact du stress sur les taux circulants des hormones sexuelles	89
II. 5. a.	En fonction du statut chez la femelle.....	89
II. 5. b.	Chez les mâles	91
	CONCLUSION.....	93
	BIBLIOGRAPHIE	95
	ANNEXES	107
	Annexe 1 : Body Condition Index pour les vipères de l'élevage, à la mise à la reproduction (mai 2015)	109
	Annexe 2 : Résultats bruts des mesures de glycémie (en g/L, résultats obtenus par coulométrie au glucomètre)	110
	Annexe 3 : Résultats bruts des mesures de glycémie (en g/L, résultats obtenus par spectrophotométrie)	111
	Annexe 4 : Résultats bruts des mesures de corticostéronémie (en ng/mL, résultats obtenus par RIA).....	112
	Annexe 5 : Résultats bruts des mesures de protidémie totale (en g/L, résultats obtenus par spectrophotométrie)	113
	Annexe 6 : Résultats bruts des mesures de calcémie (en $\mu\text{mol/L}$, résultats obtenus par spectrophotométrie)	114
	Annexe 7 : Résultats bruts des mesures de cholestérolémie (en mmol/L, résultats obtenus par spectrophotométrie).....	115

Annexe 8 : Résultats bruts des mesures de triglycéridémie (en mmol/L, résultats obtenus par spectrophotométrie)	116
Annexe 9 : Résultats bruts des mesures de testostéronémie (en ng/mL, résultats obtenus par RIA)	117
Annexe 10 : Résultats bruts des mesures de progestéronémie (en ng/mL, résultats obtenus par RIA).....	118

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Vipère aspic femelle	22
Figure 2 : Schéma de l'anatomie générale du serpent.....	23
Figure 3 : Schéma d'un ovaire de reptile	24
Figure 4 : Schéma d'un oviducte de Vipéridé (<i>Agkistrodon piscivorus</i>)	25
Figure 5 : Dissection de l'appareil urogénital d'un Vipéridé (<i>Agkistrodon piscivorus</i>)	26
Figure 6 : Coupe sagittale du testicule (T) d'un serpent (<i>Carphophis vermis</i>).....	27
Figure 7 : Vue microscopique des tubes séminifères (ST) du testicule d'un serpent (<i>Carphophis vermis</i>).....	27
Figure 8 : Schéma de l'appareil génital mâle des reptiles.....	27
Figure 9 : Schéma présentant la jonction canal déférent et uretère chez les Vipéridés	28
Figure 10 : Vue macroscopique du système urogénital d'un Vipéridé mâle (<i>Agkistrodon piscivorus</i>)	29
Figure 11 : Développement folliculaire et embryonnaire chez un Vipéridé femelle (<i>Agkistrodon piscivorus</i>)	30
Figure 12 : Ovaires et ovocytes d'une vipère aspic (fin de vitellogénèse, ovulation)	32
Figure 13 : Follicule post-ovulatoire (lézard <i>Hemidactylus flaviviridis</i>)	33
Figure 14 : Corps jaune (lézard <i>Niveoscincus metallicus</i>)	34
Figure 15 : Premiers stades du développement chez les serpents vivipares	35
Figure 16 : Organisation finale de l'embryon et des membranes associées chez les serpents vivipares	36
Figure 17 : Schéma de l'axe gonadotrope chez les serpents	37
Figure 18 : Suivi du 17β -œstradiol (ng/mL) au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)	38
Figure 19 : Suivi de la progestéronémie au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)..	39
Figure 20 : Suivi de la calcémie au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)	40
Figure 21 : Suivi de la phosphatémie au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs).....	40

Figure 22 : Suivi de l'albumine plasmatique au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)	41
Figure 23 : Suivi des protéines totales au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)..	42
Figure 24 : Suivi de la cholestérolémie au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)..	43
Figure 25 : Suivi des phospholipides au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs).....	43
Figure 26 : Suivi des triglycérides au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs).....	44
Figure 27 : Coupe sagittale et schéma de la tête d'un spermatozoïde de serpent (<i>Liodytes pygaea</i>).....	45
Figure 28 : Coupe sagittale et schéma de la pièce intermédiaire d'un spermatozoïde de serpent (<i>Liodytes pygaea</i>)	45
Figure 29 : Coupe sagittale du flagelle d'un spermatozoïde de serpent (<i>Liodytes pygaea</i>).....	46
Figure 30 : Suivi de la testostéronémie et de la thyroxynémie au cours du cycle reproducteur annuel du mâle de la vipère aspic.....	47
Figure 31 : Cycle sexuel annuel de la femelle vipère aspic	48
Figure 32 : Cycle sexuel annuel du mâle vipère aspic	48
Figure 33 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez les serpents	54
Figure 34 : Formule développée de la corticostérone	56
Figure 35 : Suivi de la corticostéronémie au cours du temps, après exposition à un stress, chez la vipère aspic.....	58
Figure 36 : Suivi de la corticostéronémie et de la testostéronémie au cours de l'année chez le serpent-jarrettière mâle <i>Thamnophis sirtalis</i>	59
Figure 37 : Prélèvement de sang par cardiocentèse	71
Figure 38 : Piqûres superficielles le long de la colonne vertébrale.....	72
Figure 39 : Principe de la réaction Ag-Ac en RIA.....	74
Figure 40 : Principe de la séparation des fractions libre et liée en RIA.....	75
Figure 41 : Corrélation entre le taux de glucose mesuré au glucomètre (GluG) et le taux mesuré au spectrophotomètre (GluS).....	81
Figure 42 : Corrélation entre le taux de corticostérone (CORT) et le taux de glucose mesuré au spectrophotomètre (GluS)	82
Figure 43 : Evolution du taux de corticostérone circulant après un stress.....	83
Figure 44 : Représentation des valeurs de corticostérone avant et après un stress (N = 78) ...	83

Figure 45 : Evolution de la glycémie après un stress.....	84
Figure 46 : Représentation des valeurs de glycémie avant et après un stress	85
Figure 47 : Valeurs de corticostérone avant et après un stress, durant les périodes de vitellogenèse, ovulation et gestation (N = 15).....	86
Figure 48 : Valeurs de glycémie avant et après un stress, durant les périodes de vitellogenèse, ovulation et gestation (N = 15).....	86
Figure 49 : Représentation de l'intervalle de valeurs prises par la glycémie en fonction du sexe.....	87
Figure 50 : Amplitude de la variation de la corticostéronémie sur une période de 30 minutes en réponse à un stress aigu, en fonction des périodes du cycle reproducteur	88
Figure 51 : Amplitude de la variation de la glycémie sur une période de 30 minutes en réponse à un stress aigu, en fonction des périodes du cycle reproducteur	88
Figure 52 : Variation de la progestéronémie en réponse à un stress aigu, en fonction des périodes du cycle reproducteur	90
Figure 53 : Variation de la testostéronémie en réponse à un stress aigu, en fonction des périodes du cycle reproducteur	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Etapes de l'extraction d'hormones stéroïdiennes plasmatiques	73
Tableau 2 : Etapes pour la deuxième partie du dosage par RIA	76

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Body Condition Index pour les vipères de l'élevage, à la mise à la reproduction (mai 2015).....	109
Annexe 2 : Résultats bruts des mesures de glycémie (en g/L, résultats obtenus par coulométrie au glucomètre).....	110
Annexe 3 : Résultats bruts des mesures de glycémie (en g/L, résultats obtenus par spectrophotométrie).....	111
Annexe 4 : Résultats bruts des mesures de corticostéronémie (en ng/mL, résultats obtenus par RIA).....	112
Annexe 5 : Résultats bruts des mesures de protidémie totale (en g/L, résultats obtenus par spectrophotométrie).....	113
Annexe 6 : Résultats bruts des mesures de calcémie (en $\mu\text{mol/L}$, résultats obtenus par spectrophotométrie).....	114
Annexe 7 : Résultats bruts des mesures de cholestérolémie (en mmol/L, résultats obtenus par spectrophotométrie).....	115
Annexe 8 : Résultats bruts des mesures de triglycéridémie (en mmol/L, résultats obtenus par spectrophotométrie).....	116
Annexe 9 : Résultats bruts des mesures de testostéronémie (en ng/mL, résultats obtenus par RIA).....	117
Annexe 10 : Résultats bruts des mesures de progestéronémie (en ng/mL, résultats obtenus par RIA).....	118

LISTE DES ABBREVIATIONS

Ac : Anticorps

ACTH : AdrenoCorticoTrophic Hormone, adénocorticotrophine, hormone corticotrope

Ag : Antigène

BCI : Index d'Etat Corporel

CEBC : Centre d'Etudes Biologique de Chizé

CMR : Capture Marquage Recapture

CORT : Corticostérone

CRH : Corticotropin-Releasing Hormone, corticolibérine

eCG : Equine Chorionic Gonadotropin, gonadotrophine chorionique équine

FAD / FADH₂ : Couple d'oxydoréduction Flavine-Adénine-Dinucléotide

FSH : Follicle-Stimulating Hormone, hormone folliculo-stimulante

GAS : Syndrome Général d'Adaptation au Stress

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone, hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

GTH : Gonadotropine

HPA : Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis, axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HPG : Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis, axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

LH : Luteinizing Hormone, hormone lutéinisante

PBS : tampon phosphate salin

RIA : RadioImmuno Assay, Radio-immunologie

INTRODUCTION

Les reptiles non-aviens sont les derniers amniotes ectothermes actuellement survivants, et sont souvent considérés comme « primitifs » par rapport aux Vertébrés endothermes. Ils font cependant face à des problèmes comparables avec succès, mettent en place des réponses adaptées, occupent une très grande variété de niches écologiques et présentent un plus grand nombre d'espèces que les mammifères par exemple. Toutefois, les vertébrés ectothermes sont beaucoup moins étudiés que les endothermes. La multiplication des études éco-physiologiques, intégrant réponses comportementales et physiologiques connues dans un contexte environnemental, ont permis d'étoffer les données disponibles concernant les ophidiens.

De par leur discrétion (rendant les études de terrain difficiles), leur faible intérêt commercial et la mauvaise réputation dont ils sont victimes, l'intérêt général et scientifique pour les serpents est relativement limité. Leur biologie est ainsi longtemps restée méconnue. Mais des études de plus en plus nombreuses voient le jour et permettent de mieux connaître leur physiologie, écologie et comportement.

Toutefois, les connaissances sur leur reproduction sont encore éparées. Certaines espèces modèles sont mieux connues que d'autres, comme par exemple le serpent-jarretière *Thamnophis spp.*, mais la généralisation des données connues à l'ensemble des serpents est délicate. Il reste de nombreuses espèces dont les caractéristiques sont inconnues.

La vipère aspic en particulier, ici le sujet de notre étude, est longtemps restée victime de son statut d'animal venimeux. Cette espèce est protégée en France, mais pâtit des pratiques agricoles (remembrement, traitements phytosanitaires, monocultures) : une chute de la plupart des populations est observée.

Les données disponibles quant à sa reproduction sont principalement l'œuvre d'Hubert Saint Girons, de Guy Naulleau et de Xavier Bonnet. Néanmoins, le stress et *a fortiori* l'impact du stress sur celle-ci a été très peu étudié. L'état de stress ayant chez les vertébrés une influence sur la physiologie des animaux, et par extension pouvant modifier les dynamiques des populations, il paraît donc nécessaire de développer les connaissances à ce sujet, dans le but de pouvoir un jour aider à maintenir les populations résiduelles.

Nous allons donc, dans une première partie, essayer de réaliser une synthèse des connaissances existantes concernant la reproduction chez la vipère aspic, en mettant entre autres en avant les modifications hormonales et métaboliques connues. Nous allons également présenter la réponse au stress, telle qu'elle est connue chez les lézards et serpents, et dresser un bilan de son impact sur la reproduction.

Dans une seconde partie, nous allons nous pencher exclusivement sur la vipère aspic, posant des questions aussi bien méthodologiques que physiologiques. Dans un premier temps, nous allons évaluer deux méthodes de mesure de la glycémie : par spectrophotométrie d'une part, et par coulométrie via un glucomètre portatif d'autre part. Puis, nous comparerons les variations de la corticostérone et du glucose en cas de stress, afin de déterminer si celui-ci

peut servir de marqueur de stress chez la vipère aspic. Enfin, nous évaluerons si le stress a un impact sur les valeurs circulantes des hormones sexuelles et sur les autres métabolites marqueurs du statut reproducteur.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation générale de la vipère aspic

I. 1. Position systématique (Bonnet 1996)

La classification des serpents est un sujet qui prête encore à discussion. En effet, il est traditionnellement reconnu que les serpents (ou ophidiens) constituent un ordre au sein de la classe extrêmement variée et polyphylétique des reptiles. Celle-ci comprend les autres ordres suivants : les tortues, les crocodiles, les rhynchocéphales, les lézards et les amphibènes.

Cependant, cette classification classique a été remise en question par l'ensemble des études récentes, et cette dernière est désormais considérée comme obsolète. Par exemple, il a été montré que les crocodiles sont en réalité plus proches des oiseaux que des lézards (Gauthier et al. 1988 ; Lance et al. 1995) et que les serpents représentent un groupe particulier de lézards.

Il a donc été admis que les reptiles ne sont pas un groupe monophylétique, mais un regroupement paraphylétique d'ordres de rangs diversifiés : Crocodiliens, Rhynchocéphales, Squamates et Testudines.

Ainsi, parmi les vertébrés, les serpents et les autres lézards forment l'ordre des Squamates. Leur séparation à partir d'un « ancêtre commun » aurait eu lieu au Trias ou au Jurassique (Rage 1987), laissant le sous-ordre des Serpentes évoluer séparément pendant plus de 150 millions d'années.

La classification présentée ici est issue de celle proposée par McDowell en 1987. La vipère aspic *Vipera aspis*, ordre des *Squamates*, sous-ordre des *Serpentes*, est placée dans l'infra-ordre des *Alethinophides*, la superfamille des *Colubroides*, la famille des *Vipéridés* et la sous-famille des *Vipérinés*.

I. 2. Morphologie et critères d'identification (Bonnet 1996 ; Pottier 2003)

La vipère aspic est un serpent venimeux plutôt petit et relativement trapu. Même si la longueur peut exceptionnellement atteindre 85 cm pour quelques rares femelles, la vipère mesure généralement une cinquantaine de centimètres (longueur moyenne de 56 cm). La queue est plutôt courte, soit environ 10% de la longueur totale. Comme chez la majorité des Vipéridés, les femelles sont plus grandes que les mâles (on observe une tendance inverse chez les crotales).

La coloration de fond est très variable d'un individu à l'autre, mais l'ornementation dorsale est un peu plus constante. On peut observer un axe vertébral plus ou moins visible auquel s'accrochent des taches sombres : le dessin obtenu est généralement en zigzags. Il y a souvent une série de taches pleines sur les flancs. Les femelles ont généralement des dessins moins contrastés et des couleurs plus ternes que les mâles (Figure 1). Des individus sans

marque (concolor), mélaniques, avec des bandes longitudinales, etc., sont régulièrement observés.



Figure 1 : Vipère aspic femelle

Crédit photo : Chebrou 2015

D'autres caractéristiques permettent une identification fiable de la vipère aspic :

- Tout d'abord, la pupille est fendue verticalement, alors qu'elle est ronde chez les couleuvres françaises (en métropole).
- Les écailles sont également remarquables : carénées (d'aspect mat), elles sont petites. En particulier, on peut noter un ou deux rangs entre l'œil et les écailles labiales supérieures. Le dessus de la tête est en général recouvert d'un ensemble de petites écailles indifférenciées (plaques supra-oculaires exceptées).
- Le museau apparaît retroussé avec une légère saillie de l'écaille rostrale, caractère assez typique.

Des variations individuelles peuvent cependant exister. Naulleau (1984) propose ainsi des études morphologiques plus complètes.

I. 3. Répartition géographique – Mode de vie – Alimentation (Bonnet 1996)

La vipère aspic est une espèce d'Europe occidentale, dont l'aire de répartition n'est pas très étendue. On peut la rencontrer au Nord-est de l'Espagne, dans une grande partie du territoire français (on ne la trouve pas au-dessus de la ligne Loire-Atlantique/Moselle, ni sur la Côte d'Azur), en Suisse et en Italie (Pottier 2003).

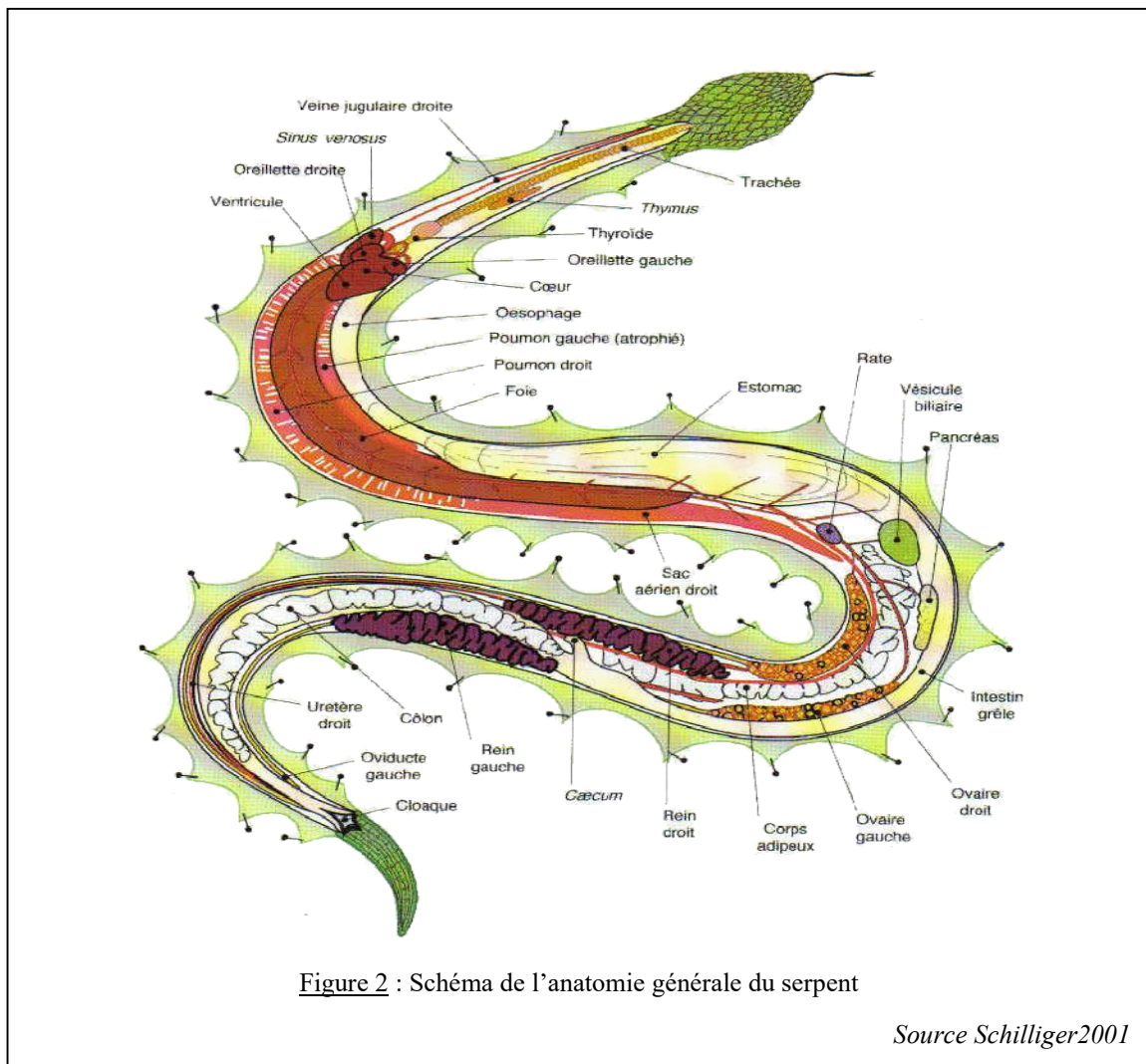
C'est une espèce majoritairement de bocages, mais qui peut coloniser des milieux très variés : marais, landes, lisières de forêts. Les milieux ouverts, avec des réseaux de haies, sont préférés et abritent parfois de fortes populations.

Son régime alimentaire se compose essentiellement de micromammifères (souris, taupes...) mais inclut également des lézards, surtout chez les jeunes (Naulleau 1965 ; Saint

Girons 1979, 1980). Plus rarement, des oiseaux posés au sol peuvent être des proies, ainsi que des amphibiens.

I. 4. Anatomie générale

L'anatomie de la vipère est comparable à celle de la grande majorité des serpents (Figure 2).



Tous les organes sont disposés en long. Le cœur ne présente qu'un unique ventricule pour deux oreillettes, ainsi qu'un poumon gauche atrophié. Le poumon droit peut être gonflé à volonté, augmentant le volume corporel afin d'intimider un prédateur potentiel.

Chez la vipère aspic, les corps gras inférieurs (situés dans le dernier tiers du corps) sont bien individualisés et peuvent être de taille importante. Ils font partie des témoins de l'état corporel (cf. infra).

I. 5. Anatomie de l'appareil génital

Les serpents sont des Vertébrés. La quasi-totalité des espèces se reproduisent par voie sexuée classique avec rencontre des gamètes de chaque sexe ; quelques espèces sont parthénogénétiques. Les organes génitaux ou gonades sont les ovaires (femelle) et les testicules (mâle).

Les gonades dérivent du même tissu embryonnaire, la crête génitale, initialement situé entre les reins. Les organes génitaux, d'abord indifférenciés, sont formés d'un épithélium germinatif dans lequel sont dispersés des cellules germinales primordiales. Celles-ci migrent ensuite crânialement aux reins et le tissu environnant se réorganise en un cortex et une médulla (Zug et al. 2001).

I. 5. a. Appareil génital femelle

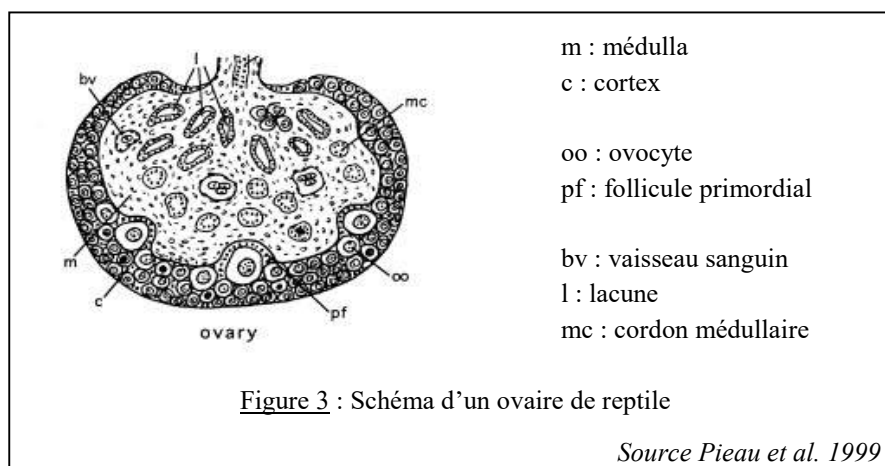
- Ovaires (Guraya 1989 ; Zug et al. 2001)

Les Squamates comptent deux ovaires qui se situent en avant des reins, l'ovaire droit étant plus crânial que l'ovaire gauche.

L'ovaire est un « sac », formé d'une tunique conjonctive élastique et de cellules épithéliales gainant des nerfs et des vaisseaux sanguins (Figure 3).

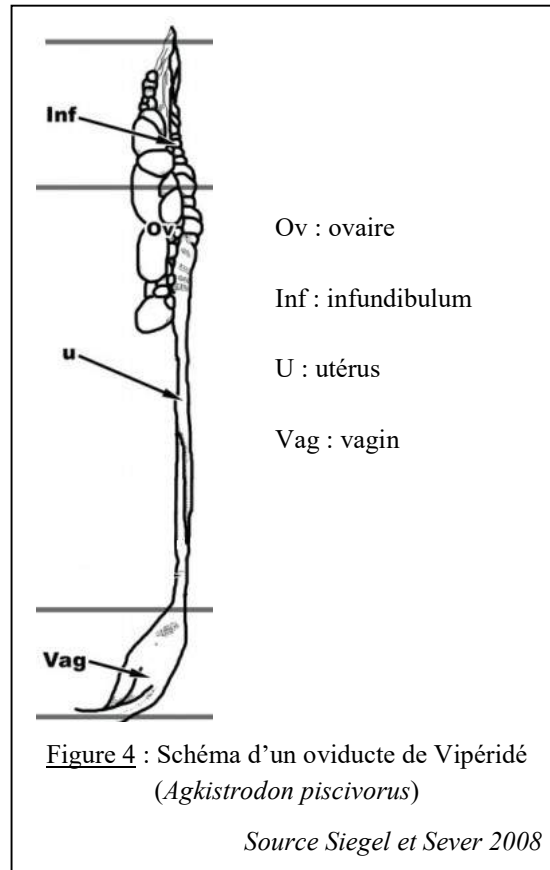
Le cortex est très développé. Les cellules germinales y sont piégées, formant des amas à la surface de l'ovaire. Ces cellules se multiplient et se divisent pour donner les ovocytes. Une couche de cellules folliculaires épithéliales entoure chacun des ovocytes, fournissant support et nutrition. Cet ensemble, cellules épithéliales et ovocytes, compose le follicule primitif. Il passe ensuite dans la médulla, et continue son développement dans le stroma ovarien.

Par conséquent, l'aspect et la taille des ovaires varient en fonction du statut reproducteur, donc du nombre et de la taille des follicules. Ils sont plus ou moins allongés et bosselés.



- Oviductes (Blackburn 1998 ; Gist 2010)

Les oviductes ne sont pas anatomiquement liés aux ovaires (Figure 4). Ils sont de tailles différentes, le droit étant plus long que le gauche (chez les Vipéridés, ils mesurent autour de 5 cm et le ratio droit/gauche est d'environ 0,8).



Ils peuvent être divisés en trois régions fonctionnelles : le pavillon ou infundibulum, l'utérus et le vagin.

Le pavillon (infundibulum) de l'oviducte s'ouvre devant le pôle crânial de l'ovaire, et s'élargit au moment de l'ovulation. Sa longueur représente environ 12% de la longueur totale de l'oviducte.

L'utérus représente la portion de l'oviducte qui abrite les œufs ou embryons le cas échéant. Il mesure environ 60% de la longueur de celui-ci. Il possède une structure plissée en période de repos, et peut se distendre de manière très importante au fur et à mesure de la gestation (généralement, l'utérus droit contient plus d'œufs que l'utérus gauche).

La portion la plus distale, le vagin, s'abouche dans l'*urodeum* du cloaque, par une papille génitale, près des uretères.

Dans le cas de la vipère aspic, des spécificités anatomiques sont à observer, qui sont directement liées à la capacité des femelles à stocker le sperme pendant une durée pouvant atteindre six mois (Saint Girons 1957 ; Thibault et Levasseur 1973).

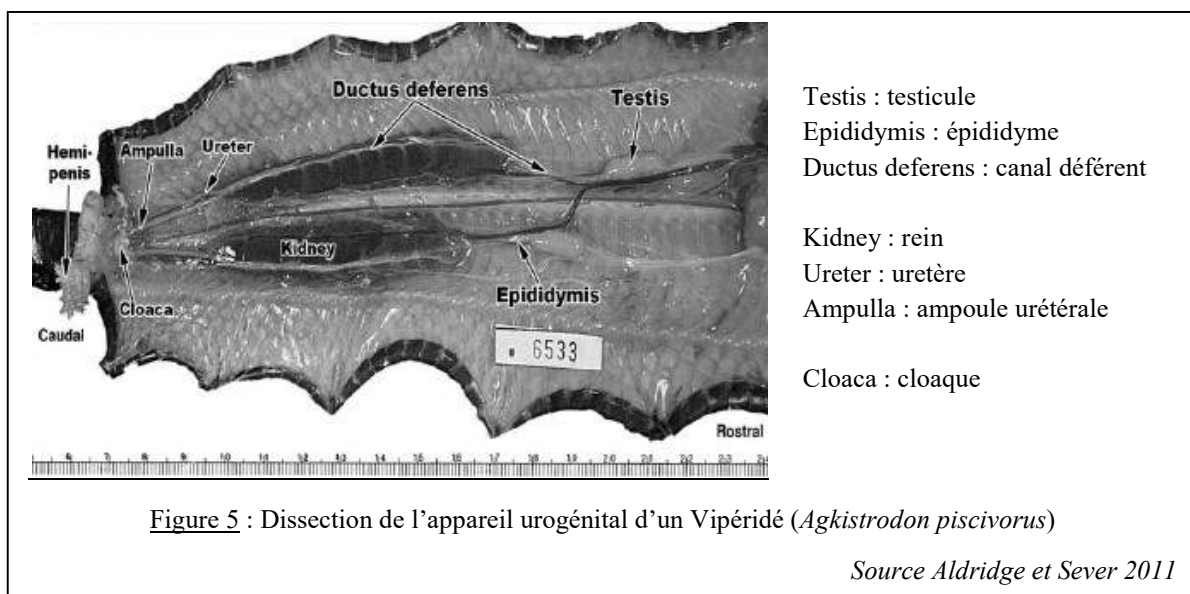
En effet, le stockage a lieu dans deux régions spécifiques. En premier lieu, il se fait dans des chambres, qui sont des replis se situant au niveau du vagin. Les spermatozoïdes peuvent y

survivre pendant des mois. Ensuite, quelques semaines avant l'ovulation, les spermatozoïdes remontent le long de l'oviducte, et se retrouvent dans des glandes alvéolaires spécialisées, à activité sécrétrice hormono-dépendante, qui sont situées en arrière de l'infundibulum. Ils y restent avant d'être libérés lors de l'ovulation.

I. 5. b. Appareil génital mâle (Bauchot et al. 2005 ; Gist 2010 ; Aldridge et Sever 2011)

- Voies d'écoulement du sperme

Les testicules sont également situés en avant des reins (Figure 5) ; le testicule droit est généralement plus long et plus crânial que le testicule gauche.



Ils sont en général de forme allongée et plus ou moins cylindrique. Leur taille peut varier en fonction de l'activité saisonnière, et la production de spermatozoïdes est directement liée à celle-ci, pouvant être plus ou moins importante (Aldridge et Sever 2011).

Le testicule est un ensemble de tubes séminifères circonvolutionnés (Figure 6 et Figure 7), maintenus par un tissu conjonctif interstitiel qui comble les espaces. Ce tissu est formé d'une matrice extracellulaire composée de fibres de collagène, entourant des cellules interstitielles (cellules de Leydig), des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des myofibroblastes (Aldridge et Sever 2011).

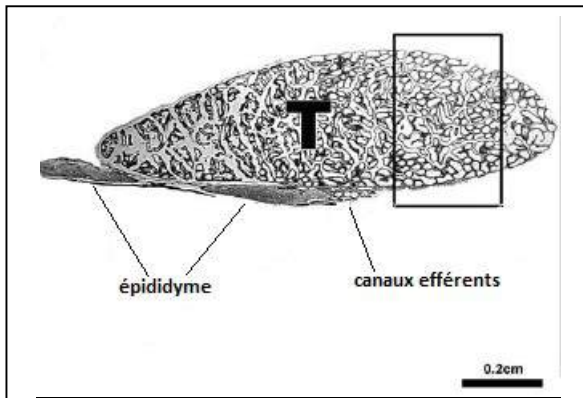


Figure 6 : Coupe sagittale du testicule (T) d'un serpent (*Carphophis vermis*)

Source Aldridge et Sever 2011

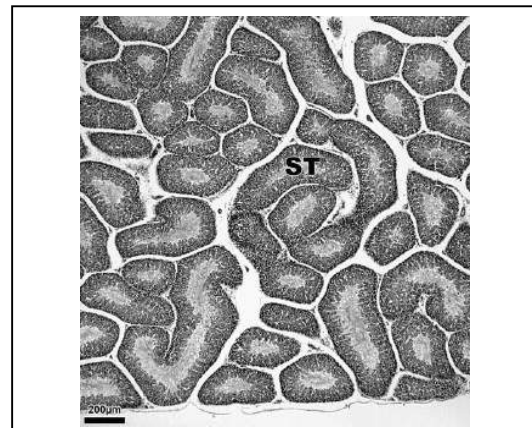


Figure 7 : Vue microscopique des tubes séminifères (ST) du testicule d'un serpent (*Carphophis vermis*)

Source Aldridge et Sever 2011

Les spermatozoïdes sont libérés dans les tubes séminifères, qui se rejoignent au niveau du *rete testis* (Figure 8), qui se situe le long du testicule (Gist 2010 ; Aldridge et Sever 2011). Le sperme passe ensuite dans les canaux efférents et l'épididyme, qui semblent comparables aux structures observées chez les autres amniotes et sont les structures sécrétrices où se forme le sperme. Puis celui-ci passe dans le canal déférent, qui est reconnu comme étant le lieu de stockage de sperme. Ce stockage peut durer plusieurs mois.

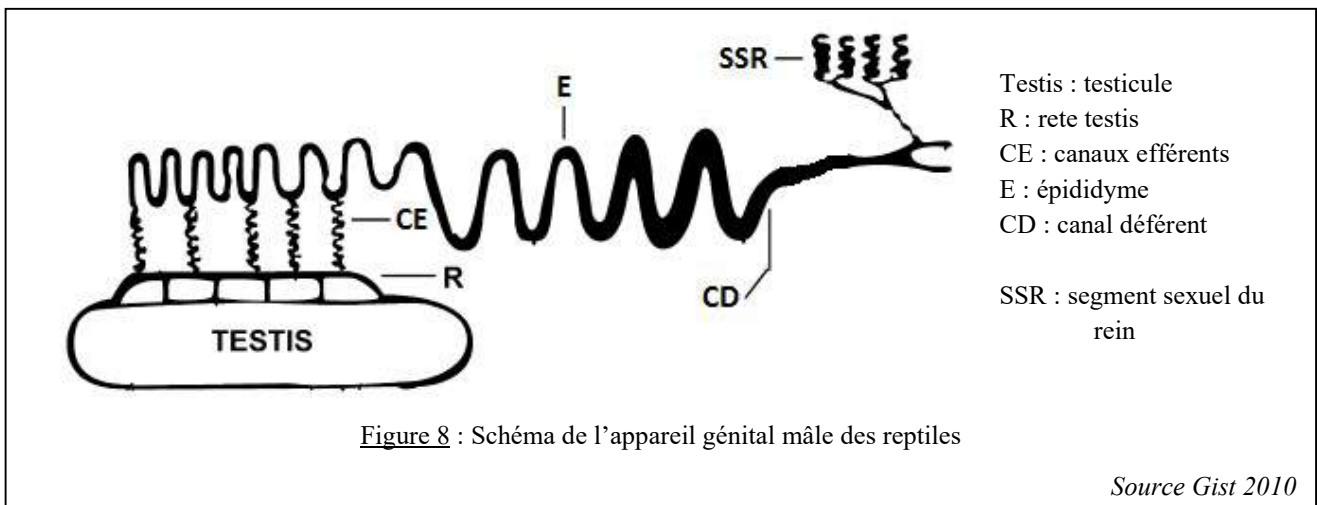
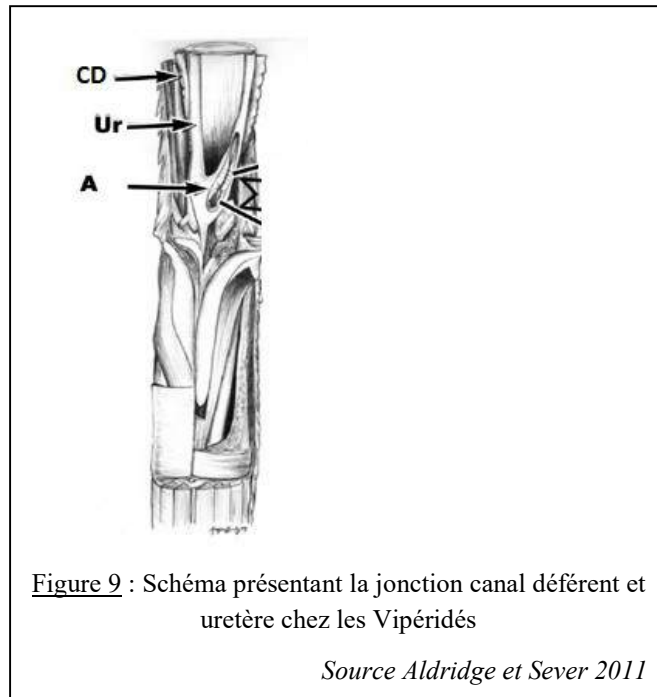


Figure 8 : Schéma de l'appareil génital mâle des reptiles

Source Gist 2010

Chez les Vipéridés, le canal déférent s'abouche directement dans l'uretère (Figure 9), ce qui n'est pas le cas chez les Colubridés. Cet uretère est une structure sécrétoire, qui convoie le sperme et l'urine. L'uretère des Vipéridés présente une dilatation, l'ampoule, qui ne semble pas avoir de rôle dans le stockage de sperme (Aldridge et Sever 2011). L'uretère s'ouvre distalement dans le cloaque via la papille urogénitale.

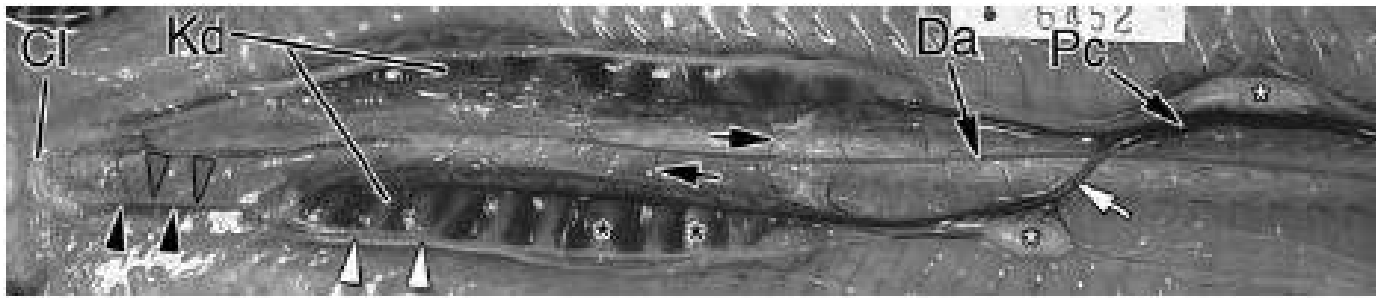


Le mâle de la vipère aspic présente deux organes copulateurs, les héli-pénis (Figure 5). Ils ne possèdent pas d'urètre, mais présentent un sillon séminal facilitant l'écoulement du sperme. Seul un des héli-pénis s'introduit dans le cloaque de la femelle au cours de l'accouplement, il semble que le mâle les utilise à tour de rôle (Aldridge et Sever 2011).

- Segment sexuel du rein

Il s'agit de la seule glande annexe connue chez les Squamates (elle est absente chez les autres reptiles, et observée seulement dans deux autres taxons : les poissons et les salamandres).

Il s'agit d'une portion très spécialisée du néphron (Figure 10), située en région tubulaire caudale (Gist 2010). Elle est présente chez tous les mâles, et est androgéno-dépendante : sa taille varie de manière saisonnière et est corrélée avec la testostéronémie : ainsi, elle est hypertrophiée en période d'accouplement (Gist 2010 ; Aldridge et Sever 2011). Les sécrétions de cette glande sont collectées dans un canal débouchant sur l'uretère et sont émises dans la femelle au cours de l'accouplement (Gist 2010 ; Aldridge et Sever 2011). Il semblerait qu'elles forment un « bouchon » persistant pendant plusieurs heures dans le cloaque de la femelle, créant une barrière contre le passage de sperme provenant d'accouplements ultérieurs. D'autres fonctions peuvent être envisagées : elles pourraient servir de support nutritif aux spermatozoïdes ou encore être un lubrifiant, facilitant l'écoulement de sperme (Gist 2010 ; Aldridge et Sever 2011).



- | | | |
|-----------------|------------------|--------------------------|
| Cl : cloaque | ▲ veine porte | → artère rénale |
| Kd : rein | ▴ uretère | ⇨ veine rénale |
| Da : aorte | ▷ canal déférent | ★ segment sexuel du rein |
| Pc : veine cave | | ☆ testicule |

Figure 10 : Vue macroscopique du système urogénital d'un Vipéridé mâle (*Agkistrodon piscivorus*)

Source Aldridge et Sever 2011

II. Reproduction de la vipère aspic

La vipère aspic est un serpent vivipare : elle met au monde des petits déjà totalement formés et autonomes (Figure 11).

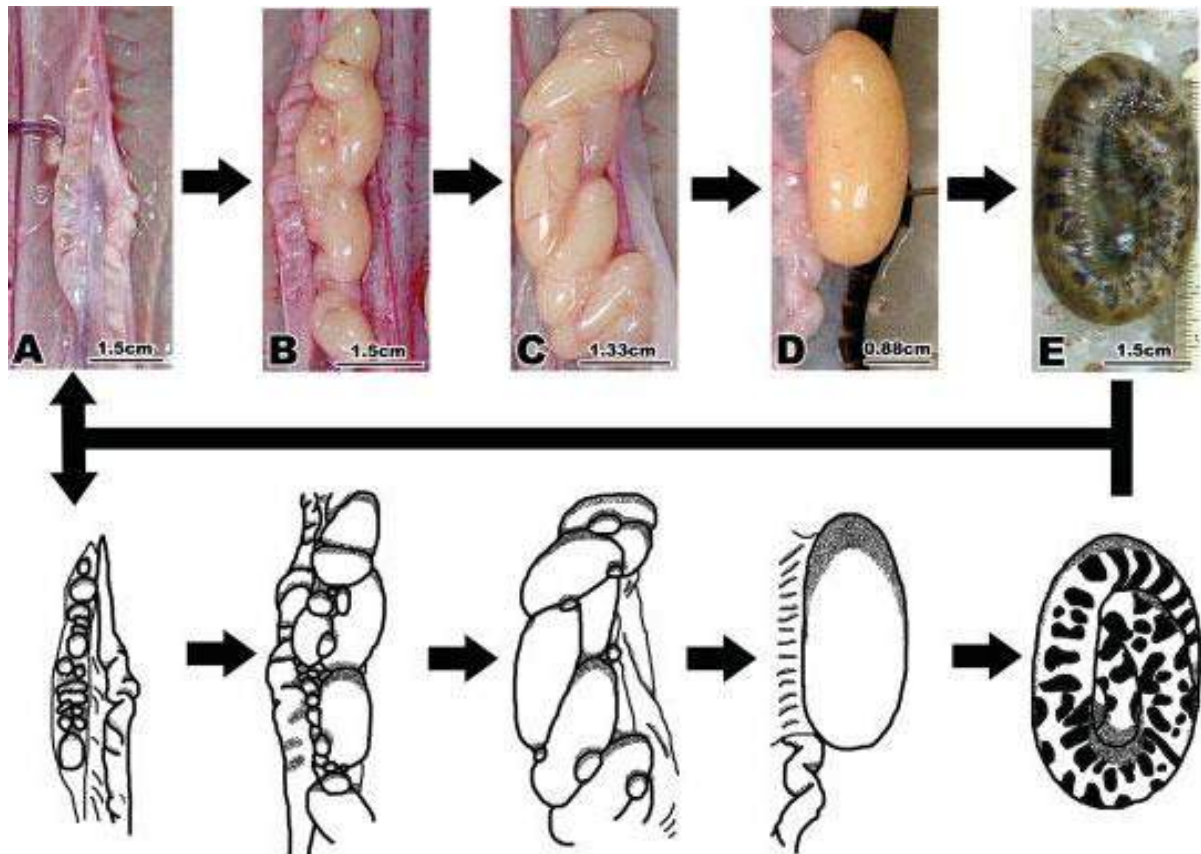


Figure 11 : Développement folliculaire et embryonnaire chez un Vipéridé femelle (*Agkistrodon piscivorus*)

- A : ovaire au repos
B : follicules en début de vitellogenèse (période d'accouplement)
C : follicules en cours de vitellogenèse
D : follicule pré-ovulatoire
E : embryon prêt à naître

Source Siegel et Sever 2008

II. 1. Physiologie de la reproduction chez la femelle

II. 1. a. Ovogenèse (Bonnet 1996 ; Zug et al. 2001)

La gamétogenèse chez les serpents est comparable à celle se déroulant chez la grande majorité des Vertébrés : les ovocytes sont donc produits dans les ovaires.

Chez la plupart des reptiles, l'ovogenèse se déroule pendant toute la vie de l'animal, souvent suivant un rythme saisonnier. Dans la paroi des ovaires se trouve une couche de cellules germinales primordiales, les gonocytes. Ce sont les cellules primaires, qui, en subissant plusieurs mitoses, vont conduire à la formation d'ovogonies.

Chaque ovogonie va à son tour subir deux divisions mitotiques, et grossit pour former un ovocyte primaire. Cet ovocyte, entouré d'une couche de cellules épithéliales, forme le follicule primordial. Deux méioses successives ont alors lieu : la première conduit à la formation d'un ovocyte secondaire et d'un premier globule polaire (cellule non fonctionnelle) ; les cellules-filles issues de la seconde méiose sont l'ovocyte et un autre globule polaire.

Ainsi, une ovogonie ne va produire qu'un unique ovocyte, entouré de cellules folliculaires.

L'ovaire et les ovocytes formés peuvent alors entrer dans une phase de quiescence (Figure 11A) ; la reprise d'une activité ovarienne et la maturation folliculaire se feront au moment de la vitellogenèse (Figure 11B).

II. 1. b. Vitellogenèse (Bonnet 1996 ; Gist 2010 ; Jones 2010)

Cette étape est considérée comme l'évènement fondamental de la reproduction et s'accompagne de modifications physiologiques importantes.

Initiée par des facteurs physiologiques et environnementaux, elle correspond à l'accumulation de nutriments dans le cytoplasme de l'ovocyte. Ces nutriments, majoritairement des phosphoprotéines et des lipides, vont former le jaune, contenu dans une vésicule vitelline.

Les œufs sont caractérisés par la quantité de jaune qu'ils contiennent. Les ovocytes de la plupart des mammifères sont alcithes, c'est-à-dire qu'ils ne contiennent que très peu de jaune, qui est réparti équitablement dans tout l'œuf. Les reptiles, au contraire, produisent des ovocytes contenant une grande quantité de jaune (œufs télolécithes).

C'est la présence de ce jaune en grande quantité qui soutient le développement de l'embryon : la vipère peut donc être considérée comme une espèce lécithotrophe. Cependant, il y a également mise en place d'un placenta : il s'agit d'une espèce à placentotrophie secondaire (cf. infra).

Tous les follicules présents dans les ovaires n'entrent pas en vitellogenèse. Le nombre de follicules qui se développent est variable (Figure 12). Les cellules épithéliales (de la thèque interne et de la granulosa) vont s'hypertrophier, formant de grosses cellules à vocation glandulaire.

Les follicules vitellogéniques augmentent rapidement de taille, au fur et à mesure qu'il y a accumulation de jaune, pour finalement donner un œuf télolécithe, dans lequel la totalité du volume de l'œuf est occupée par du jaune (Figure 11D).

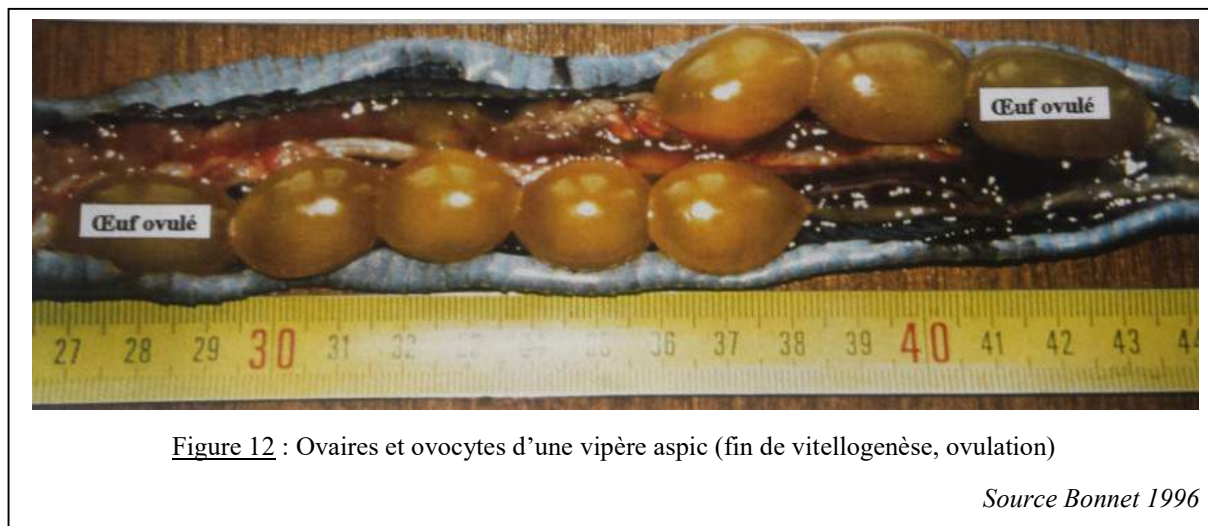


Figure 12 : Ovaires et ovocytes d'une vipère aspic (fin de vitellogénèse, ovulation)

Source Bonnet 1996

Le jaune des œufs de reptiles semble majoritairement composé d'une grosse molécule complexe, la vitellogénine. Très étudiée chez les Poissons, chez les Oiseaux et chez les Amphibiens, les données sur cette molécule sont moindres chez les Serpents.

Il s'agit d'une glycolipoprotéine dont la structure et la composition sont proches des lipoprotéines transportant le cholestérol. C'est une molécule d'environ 250 kDa, formée de deux sous-unités (Bast et Gibson 1985 ; Janeiro-Cinquini et al. 1999). Chez le serpent-jarretière *Thamnophis sirtalis*, elle est composée de 47% de lipides et 53% de protéines (Dessauer et Fox 1959). Précurseur du vitellus, elle est physiologiquement produite seulement par les femelles reproductrices. Il est cependant possible d'induire sa production chez des mâles ou des femelles non reproductrices par un apport hormonal exogène (Bast et Gibson 1985 ; Bonnet et al. 1994).

Le déroulement de la synthèse de vitellogénine est encore peu étudié à ce jour, en particulier chez les serpents. Elle passe par la mobilisation des réserves maternelles, et en particulier des lipides accumulés au niveau des corps gras, qui sont acheminés jusqu'au foie.

La vitellogénine est finalement sécrétée dans le sang par exocytose et est acheminée vers les follicules, où elle s'accumule sous forme de globules protéiques (Guraya 1989).

Chez la vipère aspic, l'influence hormonale semble prépondérante dans le déclenchement et le déroulement de la vitellogénèse et la synthèse de vitellogénine. L'hormone impliquée est le 17β -œstradiol (Bonnet et al. 1994). Il est synthétisé sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, via la sécrétion d'hormones peptidiques (Bonnet 1996).

Des récepteurs aux œstrogènes sont présents dans les hépatocytes. Suite à la fixation du 17β -œstradiol, une hypertrophie hépatique et une stimulation de la synthèse d'ARN codant pour la vitellogénine vont avoir lieu. Étudiée chez le xénope lisse *Xenopus laevis*, la synthèse d'ARN passe de 0 à 35000 copies par hépatocyte entre 12h et 12 jours après une stimulation au 17β -œstradiol (Ho et al. 1982 ; Guraya 1989 ; Callard et al. 1990).

II. 1. c. Ovulation (Guraya 1989)

Le cycle sexuel chez la vipère aspic est annuel (voire pluriannuel), un processus ovulatoire est donc possible tous les ans. Mais, de par son statut de « capital-breeder », la vipère ne va ovuler que tous les deux ou trois ans selon son état corporel et selon le climat.

L'ovulation est la rupture du follicule (Figure 13), libérant l'ovocyte mature qui est capté par l'oviducte. Le mécanisme exact est encore inconnu chez les reptiles, mais est très probablement sous imprégnation hormonale, comme chez la majorité des Vertébrés.

Chez les serpents, l'ovulation est généralement multiple, et se déroule simultanément dans les deux ovaires ; chaque ovaire produit de nombreux follicules vitellogéniques pré-ovulatoires (jusqu'à une trentaine). Cependant, chez la vipère aspic, tous les follicules mûrs n'ovulent pas forcément (Bonnet et al. 2008). Le taux d'ovulation moyen n'est pas connu chez la vipère aspic. En effet, plusieurs facteurs semblent intervenir dans le nombre de follicules parvenant à maturité suite à la vitellogenèse : le nombre de cellules germinales présent dans chaque ovaire, le taux circulant de GTH (Gonadotropin Hormone ; cf infra) mimant l'action de la FSH (Follicle Stimulating Hormone), la croissance des follicules qui n'est pas obligatoirement synchronisée (tous les follicules ne sont donc pas forcément mûrs au moment de l'ovulation).

Le nombre d'ovocytes effectivement produit est dépendant avant tout de l'état corporel de la femelle, mais également de la taille de celle-ci et de la quantité de nourriture qu'elle va ingurgiter au cours des semaines précédant l'ovulation (Lourdais et al. 2003).



Figure 13 : Follicule post-ovulatoire (lézard *Hemidactylus flaviviridis*)

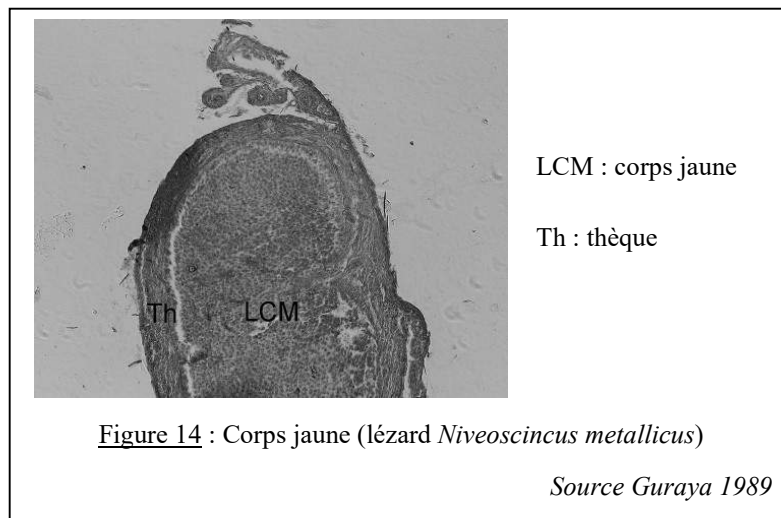
Source Guraya 1989

II. 1. d. Après l'ovulation : le corps jaune (Guraya 1989 ; Jones 2010)

Le follicule post-ovulatoire va évoluer en corps jaune (Figure 14), structure sécrétant de la progestérone, sous contrôle de l'hypophyse.

Les cellules de la granulosa s'hypertrophient, se lutéinisent sous l'action de la gonadotropine mimant les effets de la LH (Luteinizing Hormone ; cf. infra) et combinent la cavité centrale laissée vacante par l'expulsion de l'ovocyte. Ces cellules sont grosses, avec un cytoplasme

abondant riche en lipides. La vascularisation du corps jaune peut être plus ou moins importante.



Les espèces de serpents ovipares et vivipares sécrètent toutes de la progestérone, mais la cinétique de production va être très différente entre les espèces vivipares et ovipares (Callard et al. 1992).

Chez les espèces ovipares, la production maximale se fait avant l'ovulation, et le corps jaune ne va persister qu'un temps limité (jusqu'à l'oviposition, qui est la mise en place des œufs dans l'oviducte ; place qu'ils occuperont jusqu'à la ponte). Au contraire, chez les serpents vivipares, la progestérone est produite plutôt après l'ovulation, et le corps jaune reste sécrétant jusqu'à la mise-bas, même si sa taille diminue à partir de la mi-gestation.

On suppose que, comme chez les mammifères où la progestérone est nécessaire au maintien et au développement du fœtus *in utero*, chez les reptiles, elle est très probablement impliquée dans la rétention des œufs et donc dans l'évolution de certaines espèces vers la viviparité (Naulleau et Fleury 1990).

II. 1. e. Fécondation, placentogenèse et gestation (Zug et al. 2001 ; Bauchot et al. 2005)

La fécondation a lieu au sein des voies génitales de la femelle (fécondation interne), à partir du sperme conservé depuis l'accouplement.

Tous les ovocytes présents dans les oviductes ne sont pas obligatoirement fécondés (le taux de fécondation n'est pas connu), et ceux qui ne le sont pas dégèrent et ne sont plus observables après le premier tiers de la gestation (Bonnet et al. 2008).

La fusion d'un ovocyte et d'un spermatozoïde aboutit à la formation d'une cellule-œuf ou zygote. Dans les oviductes, les glandes utérines présentes vont produire une sécrétion dont les cellules-œufs seront enveloppées : il s'agit de la membrane fine, souple et transparente dont sont entourés les vipéreaux et faisant office de « coquille ».

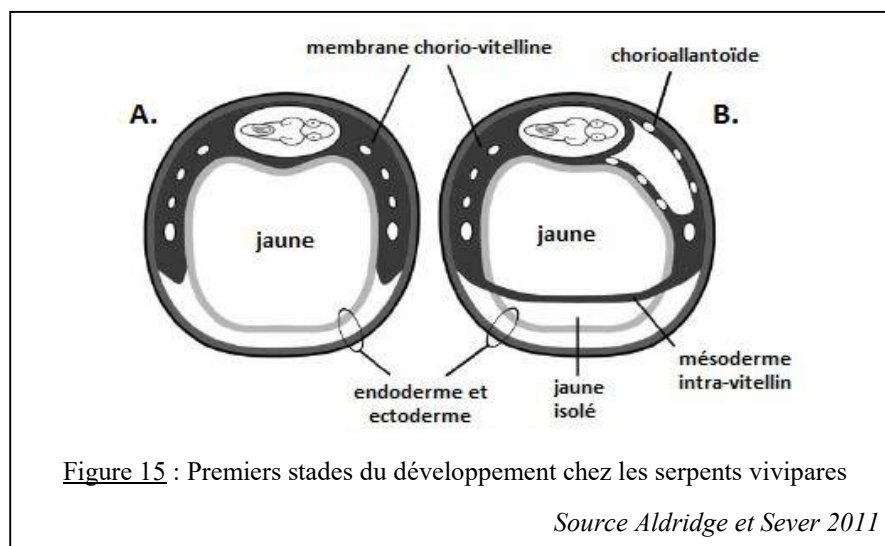
A partir de la cellule-œuf, des mitoses successives se déroulent, conduisant à une blastula. Les divisions se poursuivent, jusqu'à ce que les cellules aient la taille de cellules

somatiques. La taille et la masse de la cellule-œuf et de l'amas final de cellules ne sont pas différentes, mais la quantité de jaune présente initialement dans la cellule-œuf influence le déroulement des divisions cellulaires successives, et par conséquent, l'état final de la cellule-œuf.

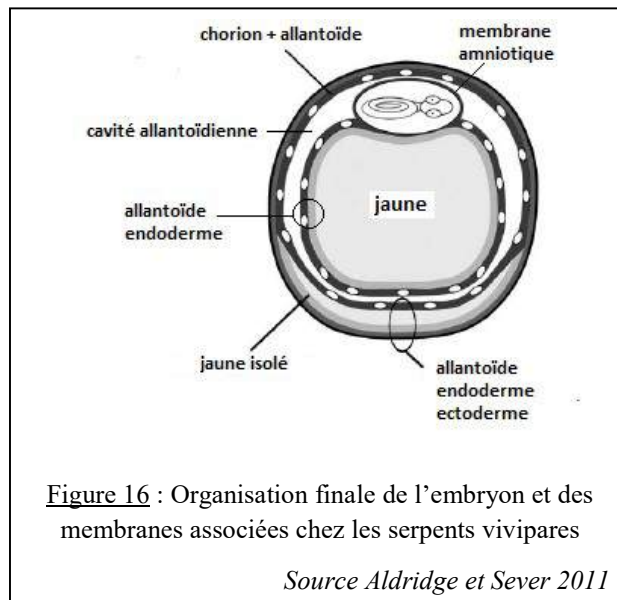
En effet, la présence d'une vésicule vitelline de gros volume va limiter les plans de clivage possibles, et les divisions vont se dérouler en superficie du jaune. Ainsi, la blastula va se retrouver limitée à une petite surface sur le dessus de la cellule-œuf, et elle prend la forme d'un disque plat couvrant environ un tiers de la surface de la cellule-œuf (Figure 15A). Elle seule deviendra l'embryon et les membranes associées.

La phase suivante est la gastrulation, qui conduit, via des divisions et des mouvements cellulaires, à la mise en place des trois couches de tissus embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. A ce stade, ces tissus sont composés de cellules indifférenciées, et sont les précurseurs de tous les tissus à venir. L'ectoderme deviendra l'épiderme et le tissu nerveux, le mésoderme formera le squelette, les muscles, le système circulatoire et les tissus associés, tandis que l'endoderme conduira aux tissus du système digestif.

Ces processus conduisent au stade de la pharyngula, lorsque les systèmes biologiques basiques sont mis en place selon l'axe antéro-postérieur. Dans le cas des reptiles, la pharyngula est « perchée » au-dessus de la masse du jaune, qui reste extra-embryonnaire. Ce jaune va servir de support à l'embryon, via des apports nutritifs. Dans certains cas, l'endoderme va continuer sa migration et son développement autour du jaune, créant ainsi une sorte de sac (Figure 15B).



L'organisation finale autour de l'embryon est la suivante : quatre couches de tissus séparés par une cavité (Figure 16). On peut observer, successivement : ectoderme, mésoderme, cavité, mésoderme et ectoderme. Les deux couches les plus externes forment le chorion, qui double intérieurement la « coquille ». Une seconde membrane, l'allantoïde, délimite la cavité allantoïdienne. Les deux couches les plus internes forment la membrane amniotique, entourant la cavité amniotique pleine de liquide amniotique dans lequel baigne l'embryon.



En parallèle, une placentation se met en place, complémentaire du jaune présent dans la structure embryonnaire. Elle est de type épithéliochorial et permet des échanges d'eau, de nutriments et de gaz respiratoires entre la mère et l'embryon (Aldridge et Sever 2011). Ces échanges se font via les vaisseaux qui tapissent l'ensemble allantoïde-chorion et la paroi de la vésicule vitelline, qui est également au contact du chorion. Cette placentation reste secondaire et difficile à évaluer, les échanges entre la mère et l'embryon n'atteignant que rarement l'importance de ceux observés chez les mammifères (cependant, il a été montré que chez différentes espèces de scinques du genre *Mabuya*, la placentotrophie est largement dominante ; Blackburn et Vitt 1992).

Chez les reptiles, la naissance (viviparité) ou l'éclosion (oviparité) n'aura lieu que lorsque l'embryogenèse (morphogenèse, histogenèse, organogenèse) sera complète. La chute de la progestéronémie semble jouer un rôle dans le déclenchement de la mise-bas chez les squamates, mais cela n'est pas confirmé chez la vipère aspic. En effet, des implants de progestérone placés chez des femelles gravides ne prolongent pas la gestation (Naulleau et Fleury 1990).

II. 1. f. Régulation hormonale : l'axe gonadotrope

Comme chez les autres vertébrés, la production des hormones sexuelles est sous le contrôle d'un axe endocrinien à trois étages, l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Licht et Porter 1987 ; Licht 1995). Les données sont relativement rares chez les serpents, et la majorité des études ont été menées chez le serpent-jarretièrre *Thamnophis sirtalis*.

L'engagement dans le processus reproducteur est gouverné majoritairement par des facteurs environnementaux, et en particulier la température et la durée d'éclairement (Lillywhite 2014). En effet, ces stimuli entraînent la production par la glande pinéale de mélatonine, hormone qui module les paramètres reproducteurs physiologiques et comportementaux. La mélatonine entraîne la production par l'hypothalamus de GnRH

(Gonadotropin Releasing Hormone ou gonadolibérine), hormone elle-même agissant sur l'hypophyse (Figure 17).

A l'étage hypophysaire, les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse sécrètent la gonadotropine GTH (Figure 17). Cette gonadotropine, dont la structure précise reste encore inconnue, semble comparable aux hormones LH et FSH observées chez les mammifères (Taylor et Denardo 2010) et semble remplir les rôles cumulés de ces deux dernières. En effet, des études ont mis en évidence que le développement gonadique, la gamétogenèse, l'ovulation et la production d'hormones stéroïdiennes sont stimulés par la LH et FSH de plusieurs espèces de mammifères (Licht 1974 ; Tsui et Licht 1977). D'autre part, des études ont également participé à l'identification des récepteurs à ces hormones (Licht et Rees Midgley 1976, 1977 ; Licht et al. 1979 ; Bluhm et al. 2004) et, bien qu'elles soient encore incomplètes, il semblerait qu'il n'existe qu'un seul type de récepteur. Cette observation, couplée au fait qu'il n'a pas été possible d'isoler la LH et qu'il semblerait qu'elle ne soit pas produite chez plusieurs espèces de serpents (Licht 1974), appuie l'hypothèse d'une unique gonadotropine (Guillette et al. 1995 ; Lombardi 1998).

La gonadotropine GTH stimule la production des hormones sexuelles stéroïdiennes, comparables à celles des mammifères (Figure 17). Les principales sont les suivantes : les androgènes (dont le représentant le plus étudié est la testostérone), responsables des caractères sexuels mâles ; les progestagènes (dont le représentant le plus étudié est la progestérone), qui sont essentiels dans le développement des embryons ; et les œstrogènes (dont le représentant le plus étudié est le 17β -œstradiol), qui jouent un rôle, entre autres, dans le développement des follicules, la vitellogénèse, certains caractères sexuels secondaires et les comportements sexuels.

D'autre part, ces hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur les étages supérieurs (Figure 17).

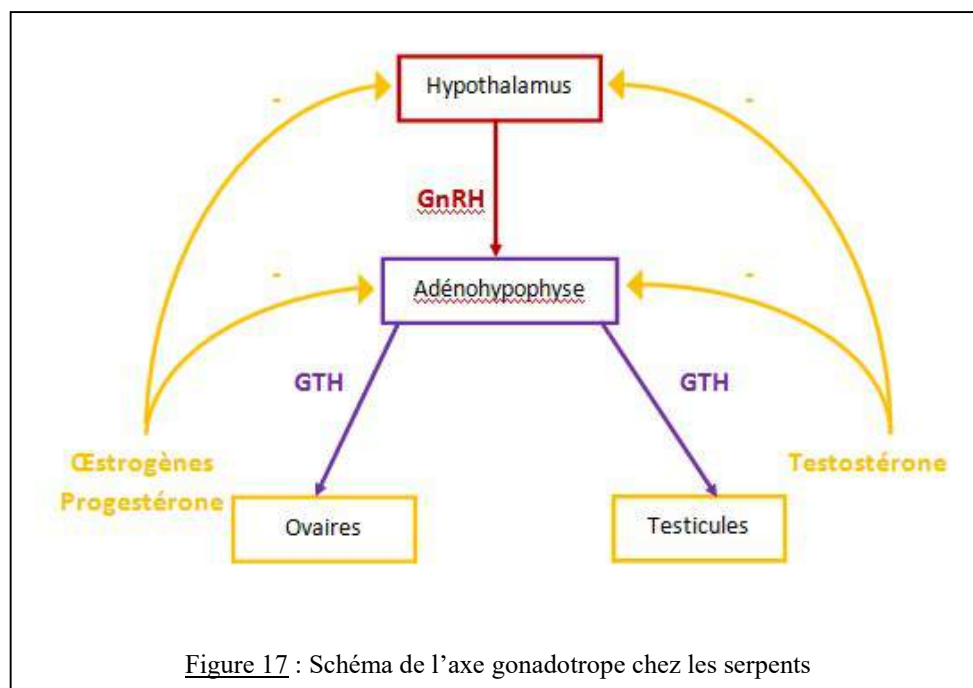


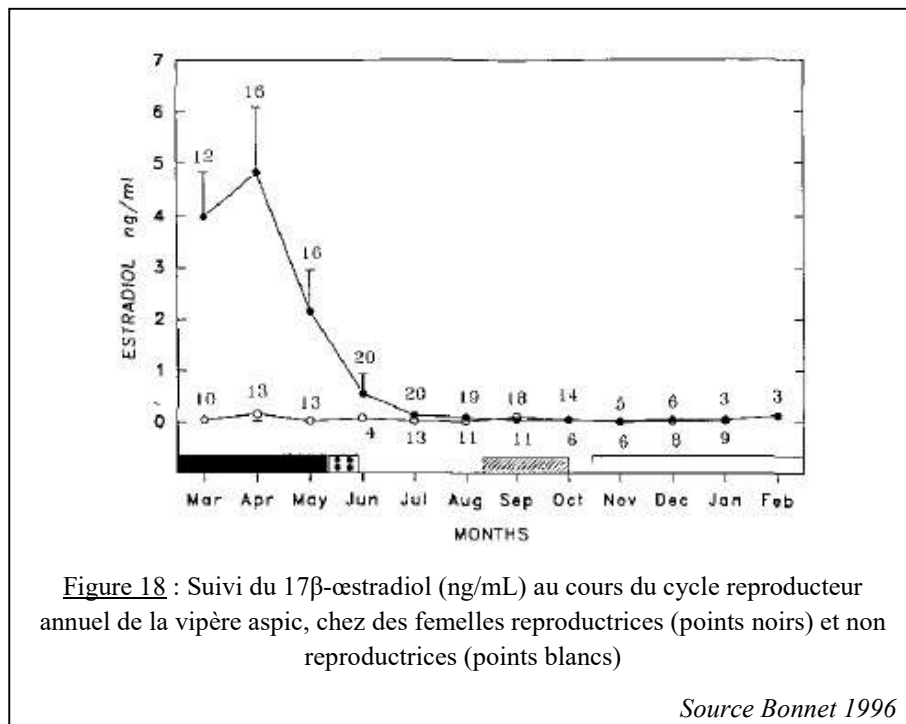
Figure 17 : Schéma de l'axe gonadotrope chez les serpents

II. 2. Etude des hormones sexuelles au cours du cycle reproducteur chez la vipère aspic femelle

Il est possible de noter des différences dans les profils hormonaux des femelles reproductrices et non reproductrices, en particulier en réalisant des suivis des taux d'œstrogènes et de progestérone.

II. 2. a. 17β -œstradiol (Bonnet et al. 1994)

Les femelles reproductrices ont une œstradiolémie très supérieure à celle mesurée chez les femelles non reproductrices (Figure 18). A la sortie de l'hibernation en mars, le taux est d'environ 4 ng/mL chez les femelles reproductrices alors qu'il est quasiment nul chez les autres. Un pic est observé en avril, avec des valeurs proches de 5 ng/mL, puis les valeurs diminuent progressivement pour atteindre en juin un taux basal, stable sur les 7 mois suivants (autour de 0,10 ng/mL) et correspondant à celui observé tout au long de l'année chez les femelles non reproductrices.



II. 2. b. Progestérone (Bonnet et al. 2001)

Chez les femelles reproductrices, la progestéronémie suit une évolution opposée à celle des œstrogènes (Bonnet et al. 2001). Elle augmente fortement au mois de mai, à la fin de la vitellogenèse (Figure 19). Elle atteint ainsi un plateau durant les deux premiers mois de gestation (juin et juillet). Elle diminue fortement en septembre, et atteint après la mise-bas un niveau minimal comparable à celui observé en sortie d'hibernation (mars). Un second pic est observé en décembre, au cours de l'hibernation.

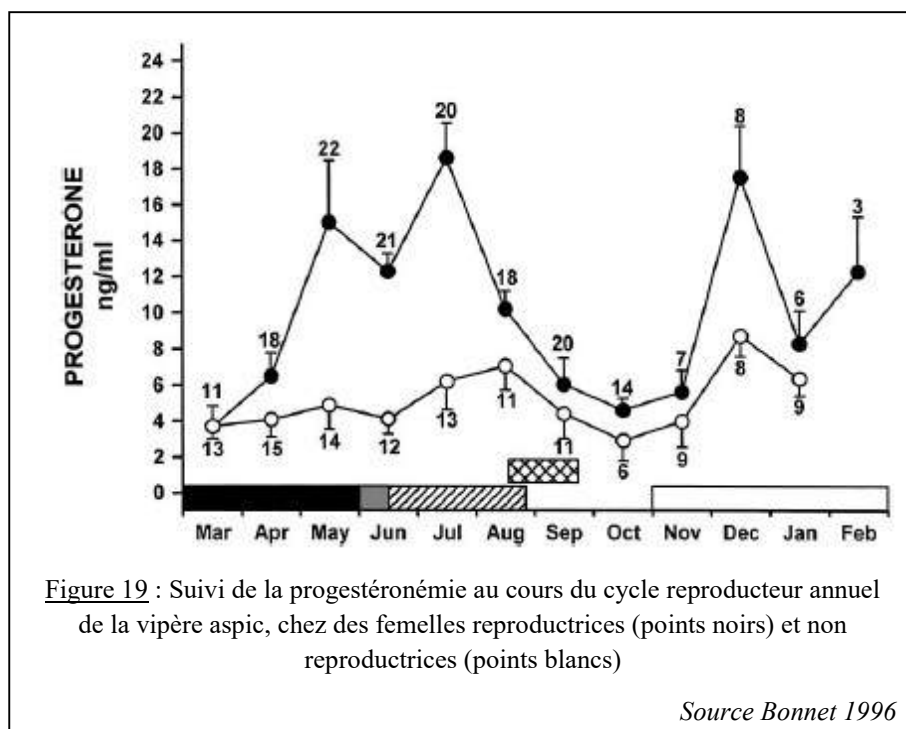


Figure 19 : Suivi de la progestéronémie au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)

La progestérone étant un antagoniste de l'œstradiol, il est possible que le pic observé au mois de mai soit impliqué dans l'arrêt de la mobilisation des réserves et stoppe la vitellogenèse. Aucune explication n'a été avancée pour expliquer le pic mesuré au mois de décembre.

II. 3. Variations biochimiques au cours du cycle reproducteur chez la vipère aspic femelle

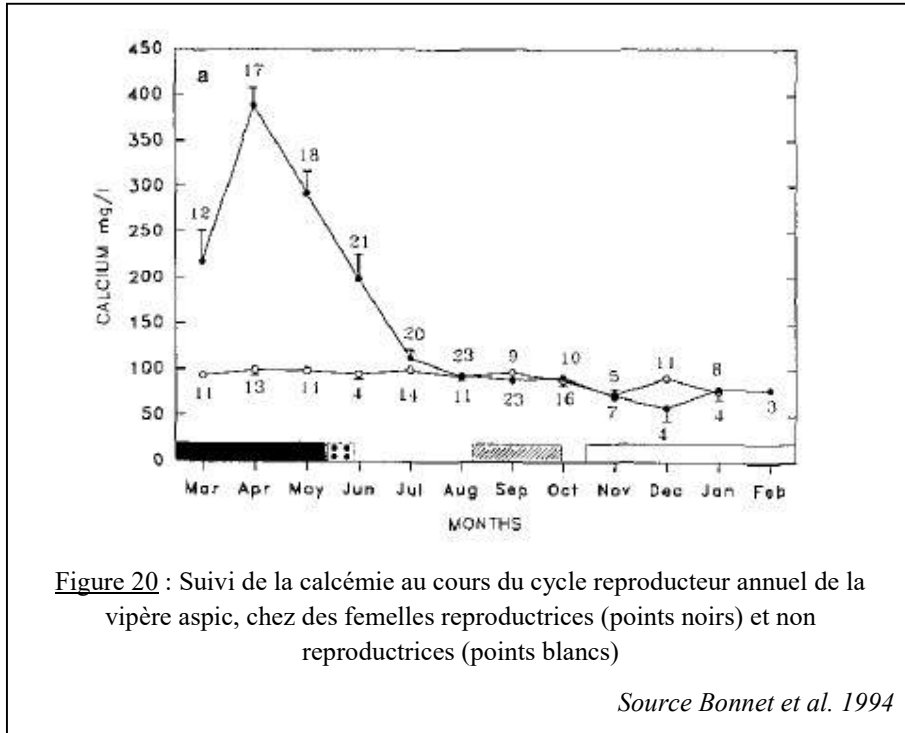
La vitellogenèse et la gestation sont des événements très demandeurs en énergie. Les lipides en particulier sont mobilisés pour la vitellogenèse. Cependant, les embryons nécessitent des éléments diversifiés pour leur développement, et non uniquement des lipides : l'étude de plusieurs métabolites plasmatiques circulants a été réalisée afin d'identifier lesquels prennent une part active dans la vitellogenèse (Bonnet et al. 1992, 1994).

Les paramètres biochimiques étudiés chez la vipère aspic sont les suivants : le calcium total, le phosphore, l'albumine et les protéines totales, le cholestérol, les phospholipides et les triglycérides.

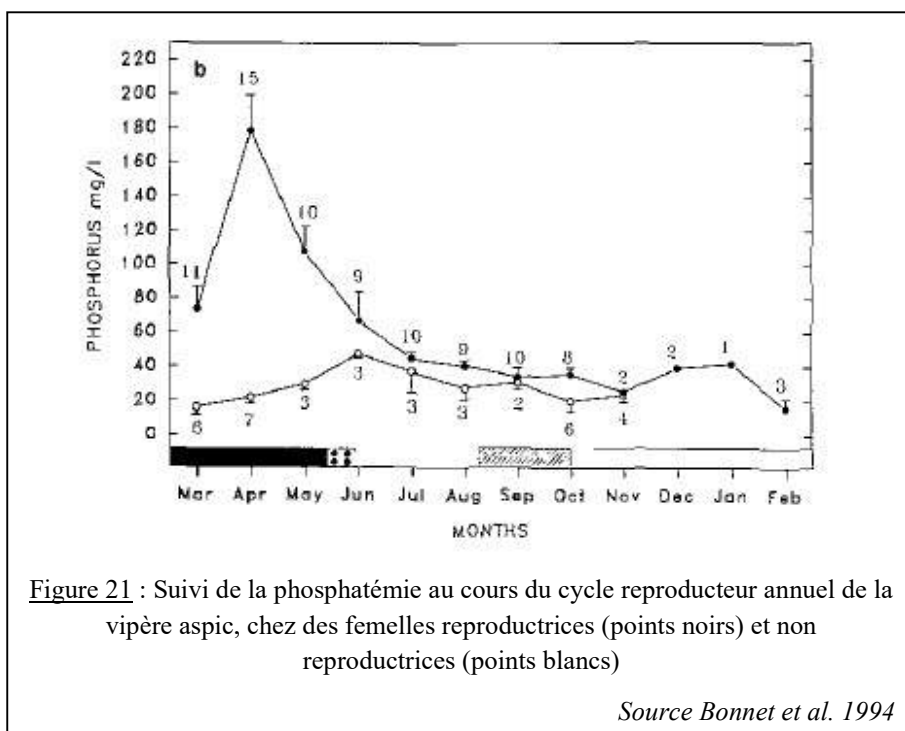
II. 3. a. Calcium et Phosphore (Bonnet et al. 1992, 1994)

Il existe une nette différence de calcémie entre les femelles reproductrices et les femelles non reproductrices (Figure 20). Chez les premières, des valeurs élevées sont observées dès la sortie de l'hibernation, et atteignent un pic au mois d'avril, soit vers le milieu

de la vitellogénèse (environ 415 mg/L). La calcémie diminue ensuite pour retrouver un taux stable autour de 100 mg/L, qui se retrouve tout au long de l'année chez les femelles non reproductrices.



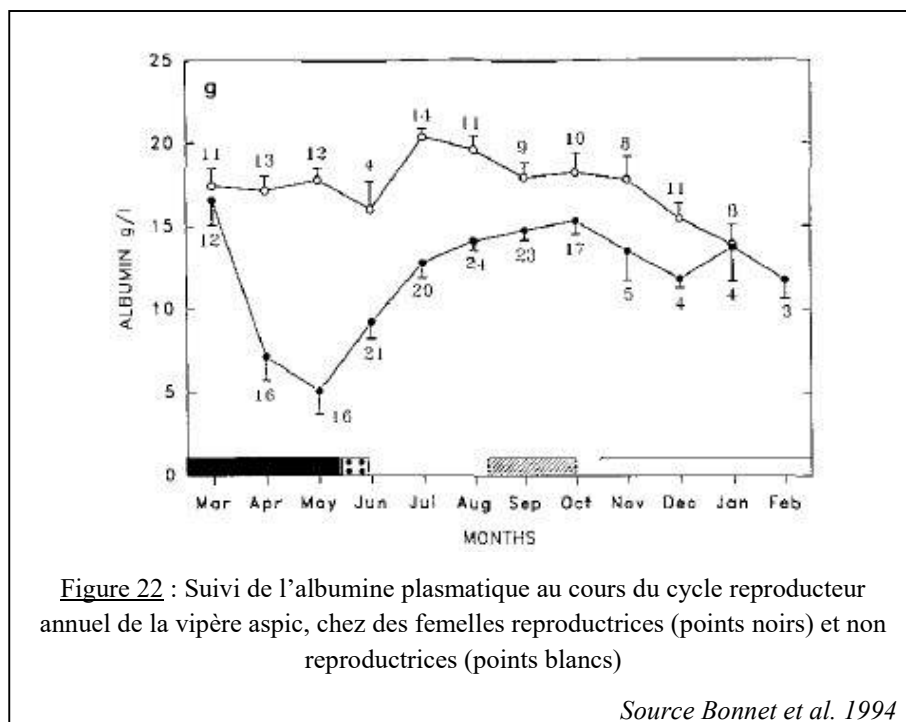
Les variations du phosphore sont comparables à celle du calcium total : on retrouve la même évolution, avec des valeurs déjà hautes au sortir de l'hibernation pour les femelles reproductrices, un pic au mois d'avril (144 mg/L) et une diminution des valeurs jusqu'à un taux stable, identique à celui observé toute l'année chez les femelles non reproductrices (Figure 21).



L'hypercalcémie et l'hyperphosphatémie peuvent donc être considérées comme des indices marqueurs de la vitellogenèse. L'origine de ces deux métabolites plasmatiques (calcium et phosphore) est une érosion ostéolytique de l'os vertébral (Alcobendas 1989 ; Alcobendas et al. 1991). La mobilisation de ces éléments est à mettre en relation avec la synthèse de vitellogénine, qui est un complexe protéique phosphorylé, liant les ions calcium.

II. 3. b. Albumine (Bonnet et al. 1994)

Chez les femelles non reproductrices et chez les mâles, l'albuminémie est stable au cours de l'année, entre 15 et 22 g/L. Chez les femelles reproductrices, à la sortie de l'hibernation, l'albuminémie est comparable à celle des femelles non reproductrices. En avril et mai, une chute très importante est observée : l'albumine est indétectable chez certaines femelles (Figure 22). Les taux remontent progressivement en juin et juillet, mais restent cependant inférieurs à ceux observés chez les animaux non reproducteurs pour le reste de l'année.



Les taux très bas en albumine au moment de la vitellogenèse peuvent être expliqués par deux hypothèses. En premier lieu, il est possible que l'albumine soit consommée en grande quantité par la croissance des ovocytes. La synthèse hépatique ne suffirait pas à couvrir les besoins, il s'ensuit donc un déficit.

D'autre part, et plus probablement (Callard et al. 1990), il est possible de penser que le foie, mobilisé pour la vitellogenèse, réduit ou suspend la synthèse d'albumine au cours de ce processus.

II. 3. c. Protéines totales (Bonnet et al. 1992, 1994)

Le taux de protéines totales mesuré chez les femelles reproductrices est élevé (autour de 65 g/L) durant les mois de mars, avril et mai (mois de vitellogenèse), par rapport à ceux observés chez les femelles non reproductrices (40 g/L ; [Figure 23](#)). Puis le rapport s'inverse à partir du mois de juin : la protéinémie diminue fortement chez les femelles reproductrices en juin (40 g/L) et continue à diminuer de manière moins importante jusqu'en hiver (30 g/L), tandis qu'elle augmente chez les non reproductrices (autour de 50 g/L, sans variations saisonnières).

La protéinémie très élevée observée en période de vitellogenèse s'explique par la mobilisation des réserves maternelles et par la circulation sanguine de protéines, comme par exemple la vitellogénine acheminée du foie aux ovocytes.

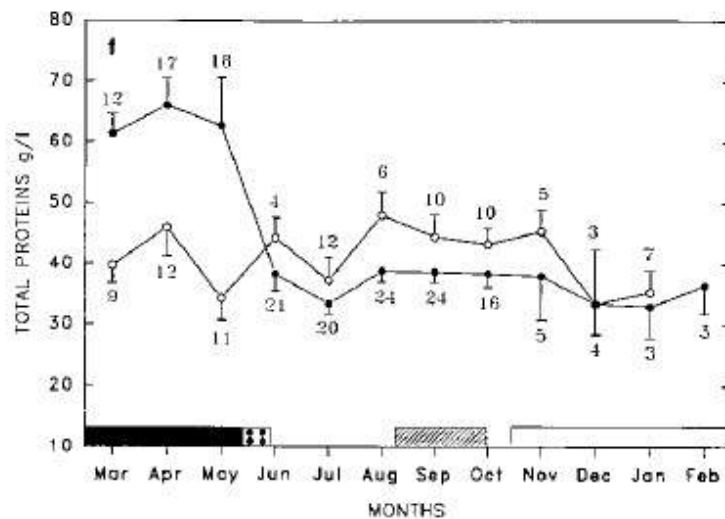
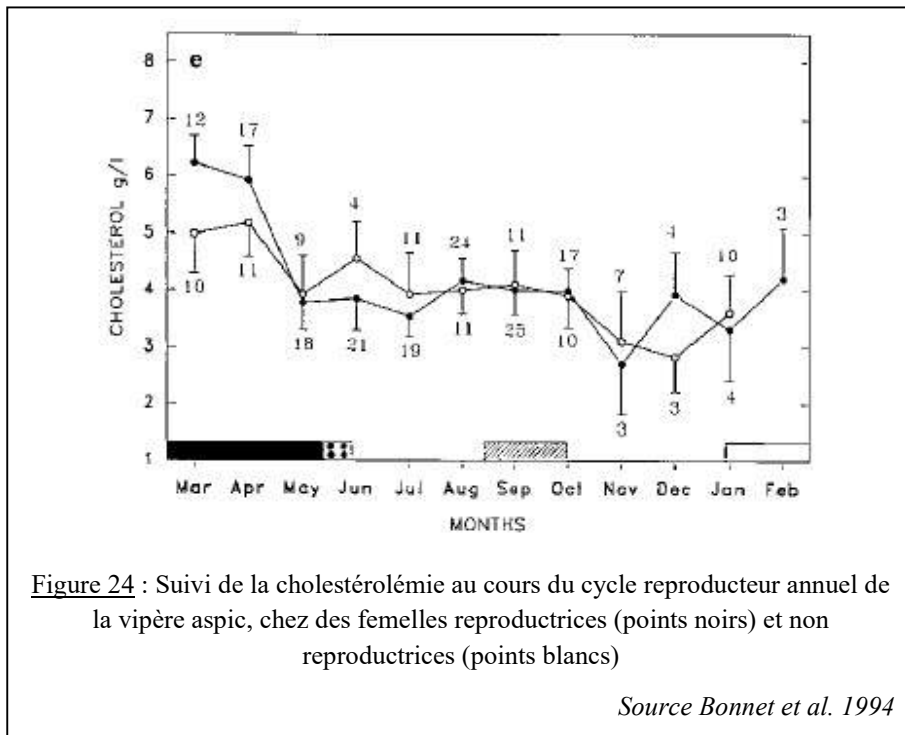


Figure 23 : Suivi des protéines totales au cours du cycle reproducteur annuel de la vipère aspic, chez des femelles reproductrices (points noirs) et non reproductrices (points blancs)

Source Bonnet et al. 1994

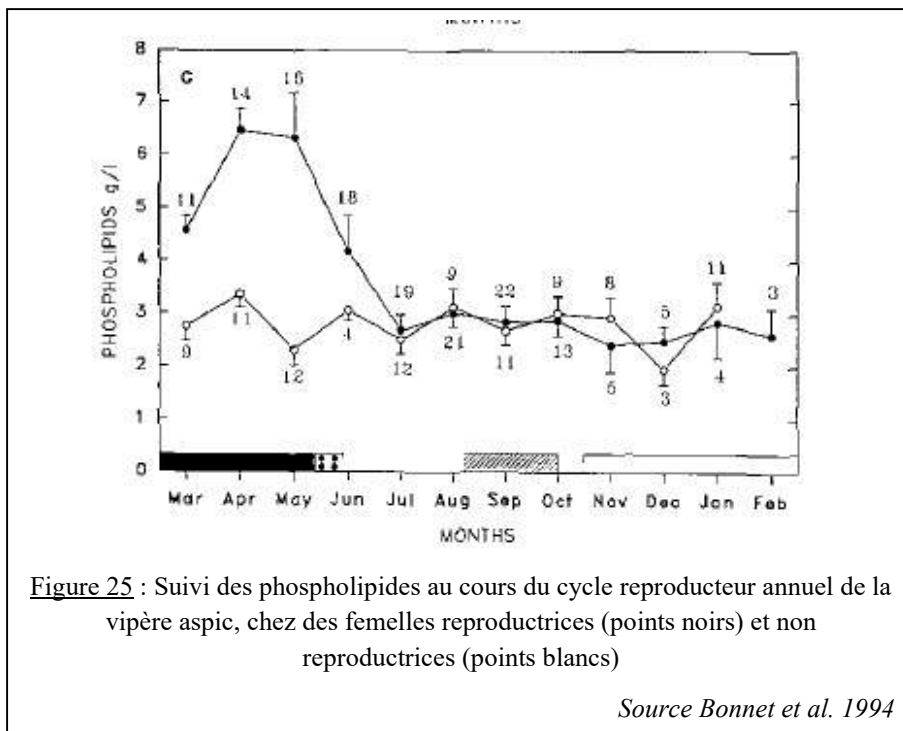
II. 3. d. Cholestérol (Bonnet et al. 1994)

Dès la sortie de l'hibernation, les valeurs de cholestérolémie mesurées sont élevées chez les femelles reproductrices. Elles restent autour de 6 g/L pendant les deux premiers mois de vitellogenèse, puis une diminution importante est observée en mai ([Figure 24](#)). Le taux reste alors stable autour de 4 g/L, taux également mesuré chez les animaux non reproducteurs.



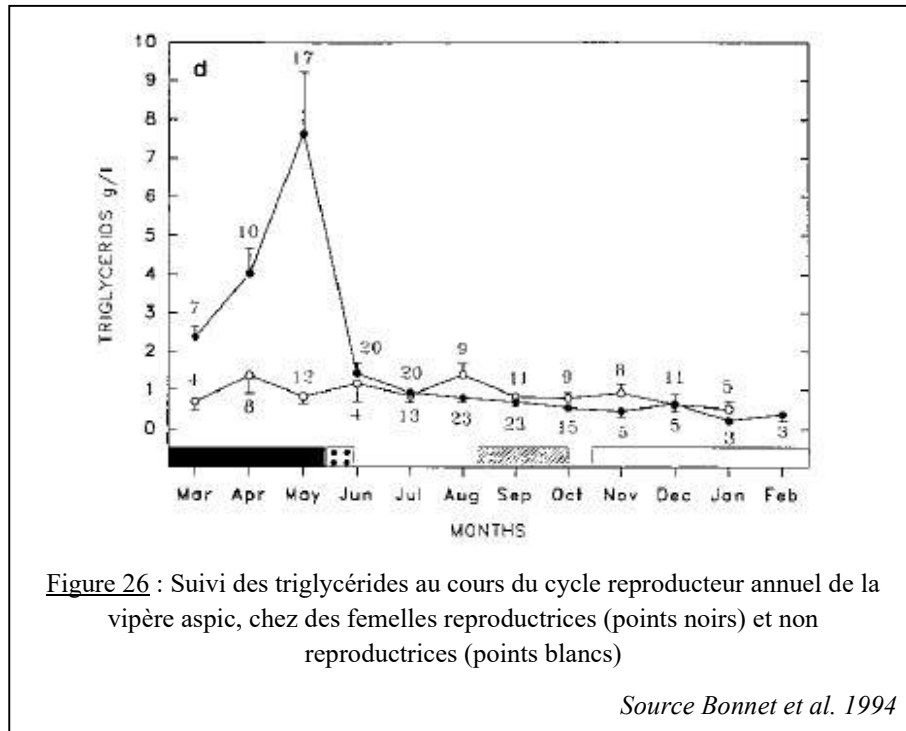
II. 3. e. Phospholipides (Bonnet et al. 1992, 1994)

Là encore, une différence est observée entre les femelles reproductrices et les femelles non reproductrices (Figure 25). Chez les premières, des valeurs de phospholipidémie élevées sont observées dès la sortie de l'hibernation, et atteignent leur maximum aux mois d'avril et mai (environ 6,5 g/L). Le taux diminue ensuite pour retrouver en juillet un taux stable autour de 3 g/L, qui se retrouve tout au long de l'année chez les femelles non reproductrices.



II. 3. f. Triglycérides (Bonnet et al. 1992, 1994)

Les observations mettent en évidence une augmentation de la triglycéridémie à la sortie de l'hibernation chez les femelles reproductrices, les valeurs atteignant un pic d'environ 8 g/L au mois de mai. En juin, une très forte diminution est notée, le taux mesuré est alors autour d'1 g/L, et est comparable à celui mesuré toute l'année chez les femelles non reproductrices (Figure 26).



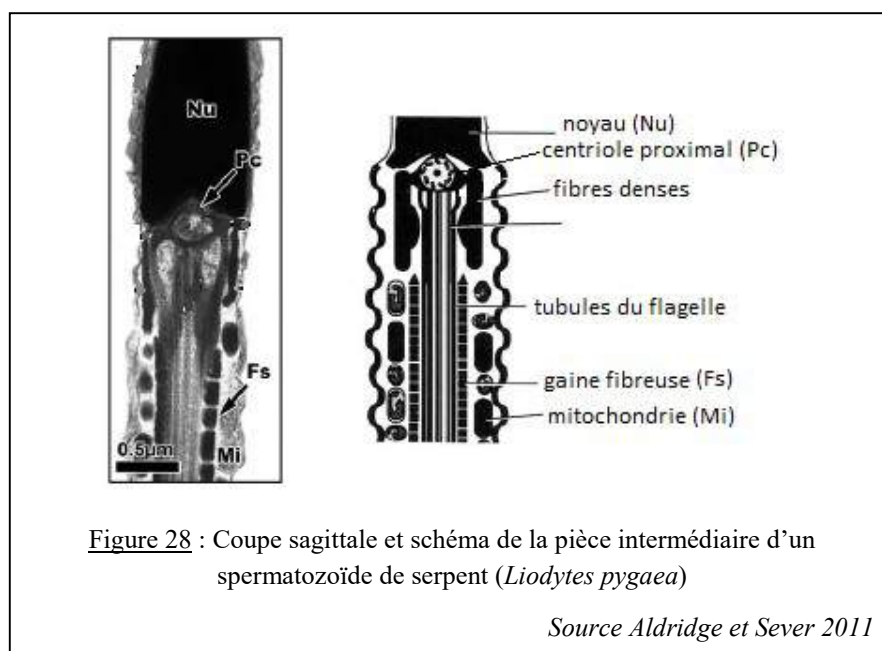
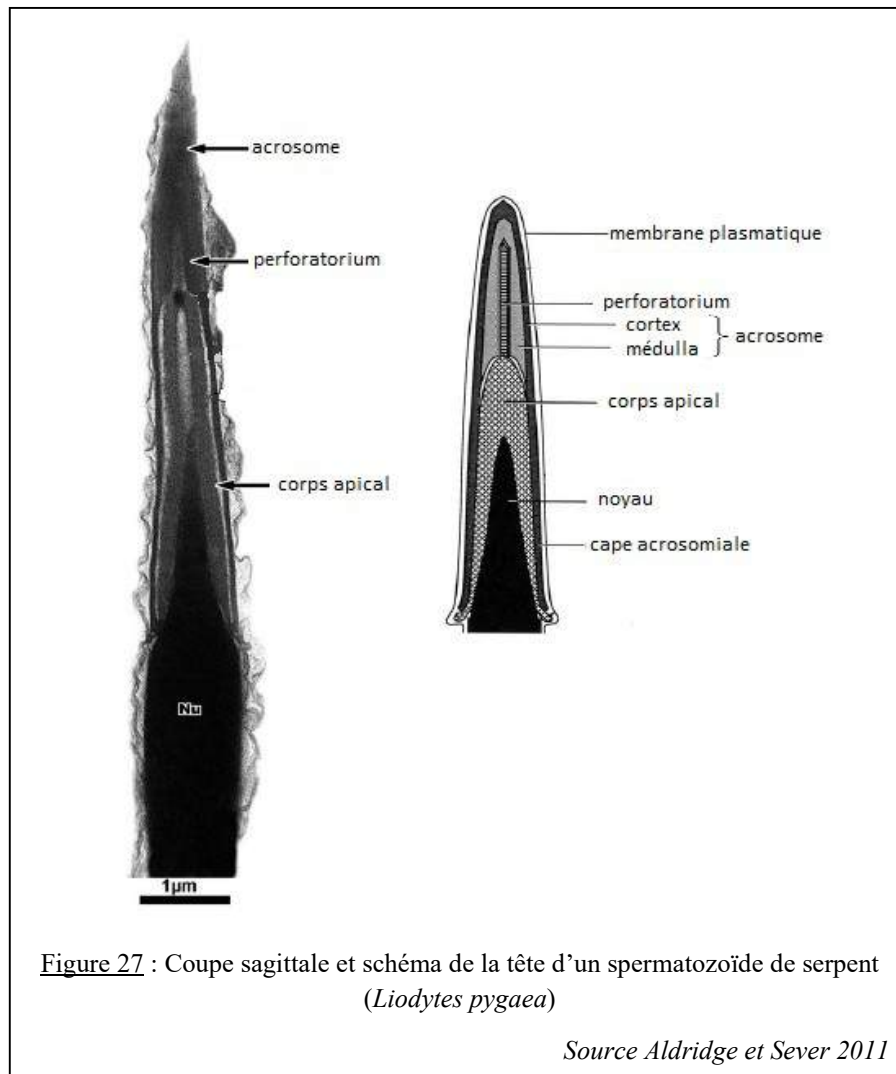
En conclusion, le processus de vitellogénèse a de très fortes répercussions sur les taux circulants de tous les métabolites étudiés : tous les taux sont sensiblement augmentés, sauf l'albumine qui est diminuée. Il est ainsi possible, en mesurant la concentration sanguine de ceux-ci, de déterminer le statut reproducteur ou non d'une femelle.

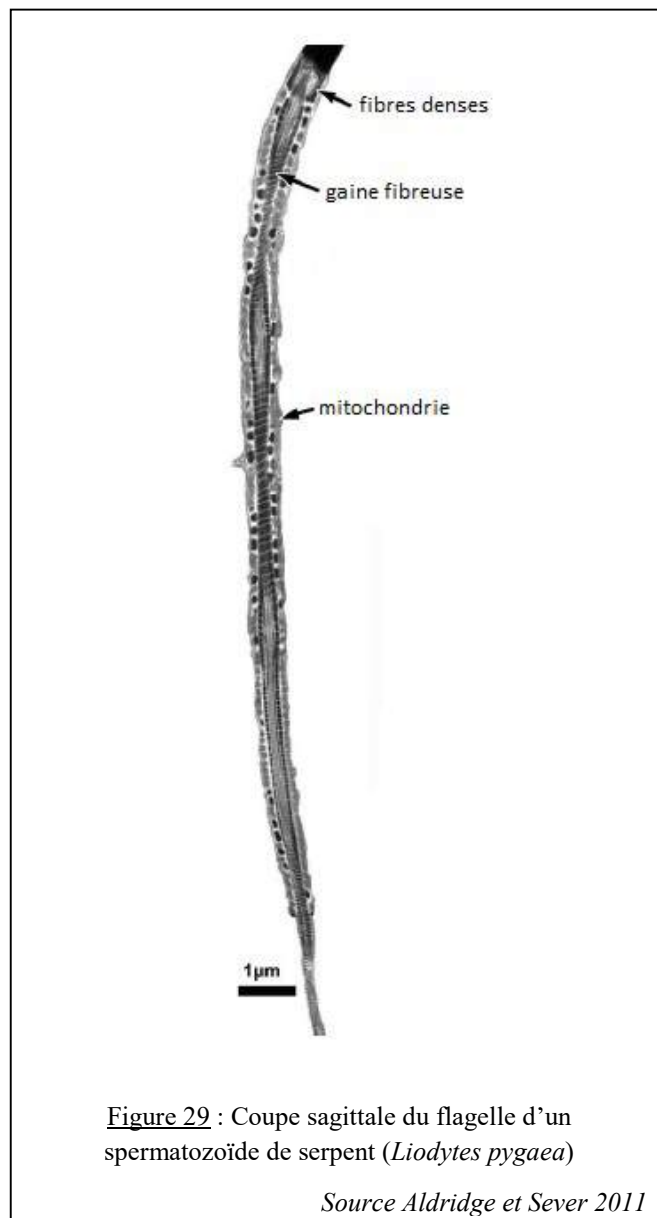
II. 4. Physiologie de la reproduction chez le mâle

II. 4. a. Spermatogénèse (Zug et al. 2001)

Les études menées sur la spermatogénèse et sur les spermatozoïdes des serpents ont mis en évidence qu'ils possèdent la même origine et la même structure que ceux des autres Vertébrés (Zug et al. 2001 ; Aldridge et Sever 2011).

Ils peuvent se diviser en trois parties : la tête (Figure 27), la pièce intermédiaire (Figure 28) et le flagelle (Figure 29). Ils mesurent environ 20 μm , ce qui peut éventuellement varier en fonction des espèces.





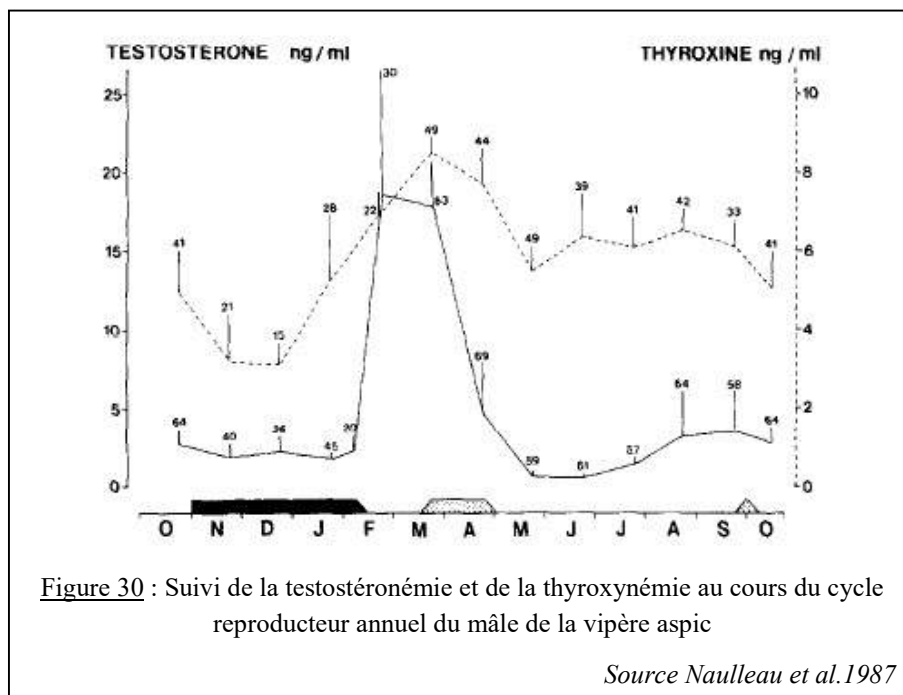
II. 4. b. Etudes des hormones sexuelles (Taylor et Denardo 2010 ; Kumar et al. 2010)

Le déroulement du cycle sexuel est dépendant des conditions environnementales (température, sortie d'hibernation) et le fonctionnement des testicules est sous contrôle hormonal.

Il semblerait que l'influence hormonale de la spermatogenèse chez les reptiles soit partagée : la prolifération des spermatogonies et les premiers stades de méiose sont sous l'imprégnation de la FSH (Masson et Guillette 1985 ; Licht et al. 1989), tandis que les dernières étapes de la spermatogenèse et de la spermiogenèse dépendent plutôt de la testostérone (Lance 1984). Les œstrogènes sont impliqués dans la régression testiculaire lors des périodes de repos.

Afin d'objectiver les relations entre environnement et réponse hormonale, un suivi de la testostérone et de la thyroxine (témoin de l'activité hypophysaire) a été réalisé (Naulleau et al. 1987).

Les profils restent constants au cours des ans sur l'ensemble des animaux (Figure 30). La thyroxinémie connaît une augmentation au printemps, à la fin de l'hibernation. Le maximum est atteint environ un mois plus tard, et une légère diminution a lieu après ce pic. Le taux reste ensuite stable jusqu'au début de l'hibernation suivante. Le suivi de la testostéronémie met en évidence deux pics : le premier, très important, à la sortie de l'hibernation et le second, bien moindre, à la fin de l'été. Ces deux pics correspondent aux deux périodes d'accouplements notées chez la vipère aspic, le premier étant le principal (cf. supra).



II. 5. Cycle reproducteur

II. 5. a. Généralités (Saint Girons 1957 ; Naulleau 1970 ; Bonnet 1996)

La maturité sexuelle est atteinte vers l'âge de trois ou quatre ans chez le mâle et vers l'âge de cinq ou six ans chez la femelle.

Le cycle reproducteur de la vipère aspic se déroule sur une année. Il se sépare en plusieurs phases, dont le début, la fin et la durée sont plus ou moins variables selon les années (climat) et les individus.

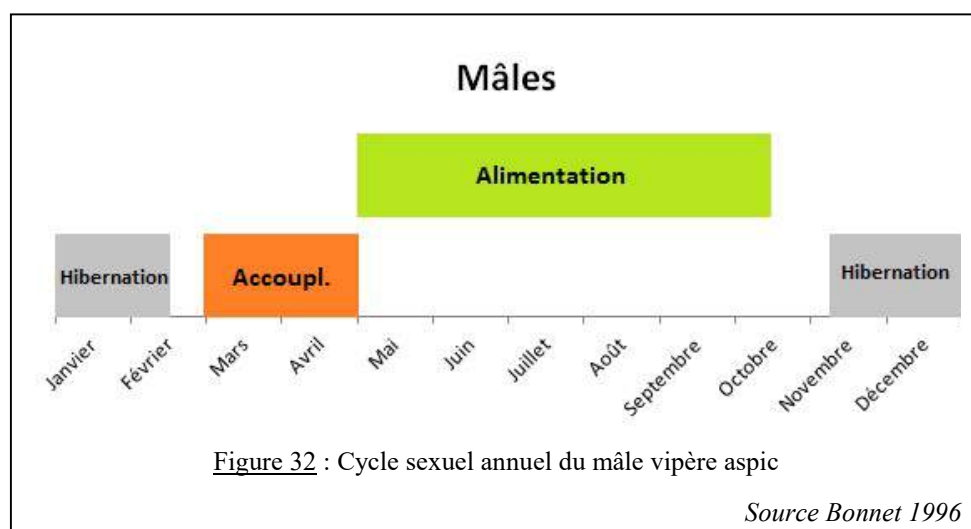
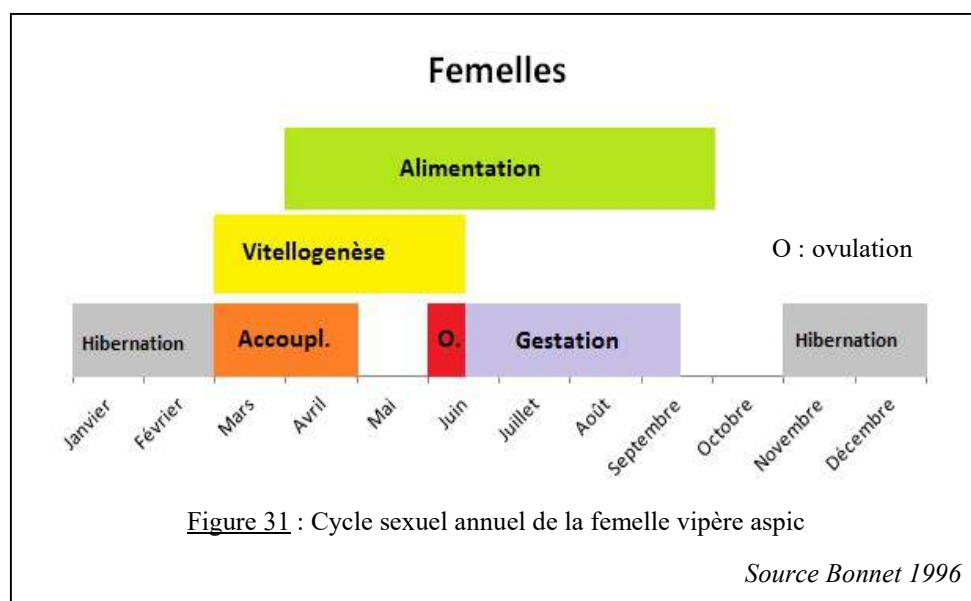
L'hibernation dure en moyenne de novembre à février. Les mâles en sortent légèrement plus tôt que les femelles (Figure 31 et Figure 32). L'accouplement principal a lieu en mars-avril (il peut être décalé en fonction de la sortie d'hibernation, voire fractionné), le mâle introduit un de ses héli-pénis dans le cloaque de la femelle. Seules les femelles

reproductrices sont concernées (en effet, une partie des femelles adultes ne se reproduit pas une année donnée ; cf. infra). Il peut y avoir une période facultative d'accouplement à la fin de l'été, mais elle est discrète, secondaire en énergie requise et concerne les femelles qui se reproduiront l'année suivante.

La vitellogénèse s'engage principalement au même moment, dès la sortie d'hibernation pour les femelles reproductrices.

La période d'ovulation semble être assez constante : elle a lieu durant les deux premières semaines de juin. La gestation est d'environ trois mois, mais la durée varie en fonction de la température ambiante (cf. infra). En captivité, la durée entre l'accouplement et la mise-bas est d'en moyenne 88 jours (oscillant entre 80 et 100 jours).

La mise-bas se fait généralement en septembre. Le nombre de vipéreaux par portée est en moyenne de cinq ou six, le nombre pouvant varier de 1 à 22 (Nauveau 1970). Les petits sont mis au monde dans une fine membrane, qu'ils vont percer dans les minutes suivant la naissance. Le cordon ombilical se rompt quasi immédiatement ; ils muent dans les heures suivant la naissance. Ils sont totalement autonomes et ne nécessitent pas de soins parentaux.



II. 5. b. Etat corporel et réserves métaboliques : Body Condition Index, « capital-breeding » (Bonnet 1996)

Chez tous les Vertébrés femelles, la reproduction est un processus physiologique extrêmement coûteux en énergie. Chez les serpents, l'estimation des réserves corporelles, et donc de l'énergie et des matières disponibles pour la reproduction, a longtemps été limitée à la masse des corps gras. Cependant, et bien que ce paramètre soit un bon indicateur, il n'est pas le seul à prendre en compte : en effet, le foie, la peau et la masse musculaire peuvent constituer des réserves énergétiques et de matière. L'animal peut les utiliser en fonction de ses besoins (Bonnet 1996).

Une méthode simple d'estimation des réserves corporelles totales a été mise en place via un indice d'état corporel BCI (Leloup 1976 ; Bonnet et Naulleau 1994), dont le mode de calcul est le suivant :

$$\mathbf{BCI = M / TM}$$

M : masse actuelle de l'animal étudié (en g)

TM : masse théorique de l'animal étudié en fonction de sa longueur corporelle

$$\text{avec } \mathbf{TM = (L / l)^3 * m}$$

L : longueur corporelle de l'animal étudié (en cm)

l : longueur moyenne des nouveau-nés de l'espèce étudiée (en cm)

m : masse corporelle moyenne des nouveau-nés de l'espèce étudiée (en cm).

- Chez les femelles

Bien que les mâles semblent pouvoir s'accoupler tous les ans (même s'ils ne le font pas nécessairement ; Vacher-Vallas et al. 1999), les femelles ne s'engagent pas annuellement dans un processus reproducteur.

Au nord de l'aire de distribution, elles n'acceptent l'accouplement (Naulleau et al. 1999) et ne donnent naissance à des vipéreaux seulement tous les deux à quatre ans, tous les trois ans en moyenne (Saint Girons 1957).

Il a été démontré qu'il existe en réalité un « seuil » d'état corporel (un BCI minimal) au-dessus duquel la femelle se reproduit. La valeur de ce seuil est de 0,70 chez la vipère aspic, contre 0,55 chez la couleuvre d'Esculape (Bonnet et Naulleau 1994 ; Naulleau et Bonnet 1996).

La présence de ce seuil explique un rythme de reproduction pluriannuel : l'animal doit se constituer un capital de réserves suffisamment important pour soutenir les différentes étapes de la reproduction (vitellogenèse, gestation). La quantité de réserves à accumuler est très importante et le stockage se déroule généralement sur plusieurs années. Chez les femelles,

l'essentiel des réserves est stocké par le foie et les corps gras : ils peuvent représenter respectivement jusqu'à 18% et 11% de la masse totale d'un individu. Par conséquent, les masses de ces deux organes sont corrélées avec le BCI (Bonnet 1996).

La vipère aspic est donc ce qu'on appelle un « capital-breeder », comptant sur son capital de réserves pour mener à bien son processus reproducteur. Cet indice BCI permet ainsi, en début de période de reproduction, de prévoir le statut reproducteur et d'identifier les femelles potentiellement reproductrices.

- Chez les mâles

Les observations menées chez les mâles traduisent un schéma très différent de celui de la femelle. En effet, l'effort énergétique du mâle pour la reproduction est inévitablement moindre que celui de la femelle : la spermatogenèse est bien moins exigeante en termes de dépenses énergétiques que ne le sont les étapes de vitellogenèse et de gestation.

L'effort de reproduction des mâles se concentre principalement autour de la recherche de femelles reproductrices, pouvant comprendre des combats entre mâles. Il semble que l'état corporel d'un mâle n'ait pas d'influence sur son comportement sexuel en présence d'une femelle. Cependant, il y a une relation entre le BCI et la production de testostérone et la quantité de réserves est corrélée à la masse des testicules, lieu de production de la testostérone (Bonnet 1996).

Le succès reproducteur se compte en nombre de femelles séduites et donc en nombre d'accouplements. Chez la vipère péliade *Vipera berus*, les mâles les plus longs et les plus lourds ont un meilleur succès reproducteur (Madsen et Shine 1993). En effet, lorsque deux mâles convoitent la même femelle, ils s'engagent dans un combat (sans morsure). Le plus grand, donc souvent le plus lourd, prend généralement l'avantage et obtient la femelle. Il peut exister des tactiques individuelles : distance parcourue à la recherche de femelles, évitement des combats (pour les mâles les plus petits). Ces tactiques permettent de réguler l'énergie dépensée lors de cette période. Des travaux ont confirmé qu'un mâle dont l'état corporel n'est pas optimal n'est pas systématiquement exclu de tout processus reproducteur, contrairement à la femelle (Aubret et al. 2002).

En conclusion, il est possible de dire que les mâles ajustent leur engagement dans le processus reproducteur en fonction de leur état corporel ; ce n'est pas un système de « tout ou rien » comme observé chez la femelle. Les mâles les plus gros, ayant le plus de réserves, connaîtront un meilleur succès reproducteur en parcourant des distances plus grandes et en rencontrant davantage de femelles ; mais tous les mâles restent potentiellement reproducteurs lorsque l'occasion se présente.

II. 5. c. Impact du comportement alimentaire

L'anorexie durant la gestation est un phénomène relativement répandu chez les Squamates, en particulier chez les « capital breeders ». Il a longtemps été admis chez la vipère que les femelles reproductrices arrêtaient totalement de s'alimenter durant la période de

vitellogenèse et de gestation et vivaient sur leurs réserves (Saint Girons 1979) ; et ce en raison de l'encombrement stérique dans l'abdomen, qui ne pourrait contenir à la fois les embryons et les proies.

En réalité, l'alimentation joue un rôle important tout au long de la période de reproduction, bien que les premiers critères déterminants dans les caractéristiques de la portée soient la longueur de l'animal et son état corporel au début de la vitellogenèse.

En effet, les femelles les plus grandes ont des vipéreaux globalement plus lourds (Bonnet et al. 2001). Le nombre de petits est plutôt influencé par l'état corporel de la mère au début de la vitellogenèse, mais pas seulement : il existe un lien entre la prise de nourriture au cours de la vitellogenèse et la taille de la portée. Il a été supposé que la prise de nourriture au cours de la vitellogenèse réduit l'atrésie folliculaire et la résorption des follicules les plus petits, et par conséquent, conduit au développement d'un nombre plus important d'embryons. Ainsi, la taille de la portée dépendrait non seulement de la quantité de réserves accumulées au cours des années précédentes, mais aussi de la nourriture ingérée dans les semaines précédant l'ovulation (Bonnet et al. 2001 ; Lourdais et al. 2003).

De plus, l'anorexie au cours de la gestation n'est pas obligatoire mais facultative (Lourdais et al. 2002). Les femelles reproductrices acceptent de la nourriture si l'occasion se présente. L'anorexie s'expliquerait plutôt par un changement de comportement et de mode de vie, qui fait passer la croissance des embryons et la thermorégulation avant tout, et en particulier avant la chasse (Lorioux et al. 2013). La prise de nourriture au cours de la gestation semble n'avoir pas d'effet sur les caractéristiques de la portée (nombre et taille des vipéreaux, nombre de nouveau-nés vivants), au contraire de la prise de nourriture durant la vitellogenèse. Cependant, une femelle nourrie au cours de la gestation aura un meilleur état corporel après la mise-bas (Lourdais et al. 2002).

II. 5. d. Température et environnement

L'un des avantages de la viviparité est l'accès, pour les embryons, à des températures plus élevées et plus stables que celles disponibles sur les sites de ponte des espèces ovipares. La thermorégulation semble ainsi être la priorité des femelles vipères aspic en gestation (Lorioux et al. 2013).

La durée de la gestation est fortement influencée par les températures subies par la femelle. En effet, la température est un point-clé du développement des embryons : une thermorégulation maternelle précise favorise un développement plus rapide des embryons et semble garantir une meilleure santé de ceux-ci. Le comportement des femelles gestantes présente ainsi des modifications : elles ont des préférences thermiques modifiées et maintiennent une température corporelle plus élevée et plus stable que les femelles non reproductrices. Le temps d'exposition directe est par conséquent plus long, au détriment du temps dédié à l'exploration et à la recherche de proies ou du temps passé en cachette. Elles sont par conséquent plus à même de subir des attaques de prédateurs, et ce d'autant plus que leurs capacités de déplacement sont réduites au fur et à mesure que les embryons grandissent.

Malgré une maîtrise précise de la thermorégulation qui permet de limiter l'impact des variations de la température ambiante, la mère n'est pas toujours en mesure de maintenir une température d'incubation optimale. Ainsi, il a été montré qu'une température trop basse compromet fortement la naissance d'une portée viable (Michel et al. 2013).

En cas de conditions climatiques extrêmes (températures estivales très élevées dans le cas d'un pays tempéré comme la France), les caractéristiques de la portée peuvent être modifiées (Lourdais et al. 2002 ; Lourdais et al. 2004). En cas de températures très élevées, des effets ont également été observés aux différents stades de la gestation. Si des températures très élevées se font sentir au début de la gestation (mois de juin), le phénotype des vipéreaux sera affecté : le nombre d'écailles ventrales, témoin des segments corporels, sera augmenté. Si des températures élevées interviennent au milieu de la gestation (juillet), le développement s'en trouvera accéléré et la date de mise-bas sera avancée. En fin de gestation (août), des températures élevées réduisent le nombre de vipéreaux mort-nés.

III. Le stress chez la vipère aspic

III. 1. Définitions et généralités (Tokarz et Summers 2010)

Le terme de stress a été utilisé simultanément pour désigner plusieurs phénomènes qui, bien qu'ils soient indéniablement liés, n'en restent pas moins différents : ainsi, les stimuli nuisibles auxquels un individu peut être exposé, les modifications physiologiques et comportementales qui en découlent, et enfin, la sur-stimulation de ces mécanismes qui peuvent conduire à des pathologies.

Nous allons ici différencier les facteurs de stress, qui sont les stimuli extérieurs (environnementaux, physiques) menaçant un individu et capables d'impacter l'homéostasie de celui-ci ; et la réponse au stress, mécanismes physiologiques et comportementaux mis en place pour la restaurer. L'état de stress en lui-même est défini comme l'état physiologique résultant de l'exposition de l'organisme à un facteur de stress, comme l'ensemble des réactions non spécifiques mises en place lors d'un dérèglement de l'homéostasie.

On peut différencier deux types de stress : d'une part, un stress stimulant et productif, adapté à la situation, nommé l'« eustress », et d'autre part le « distress », inadapté et nuisible (Levi 1971 ; Serban 1976).

III. 2. La réponse au stress

L'état de stress se met donc en place suite à une stimulation ou facteur de stress d'ordre environnemental, physique ou social. La réponse à cette stimulation est semblable chez les reptiles à celle observée chez les autres vertébrés (Selye 1936, 1951 ; Romero 2002 ; Moore et Jessop 2003 ; Wingfield et Sapolsky 2003).

III. 2. a. Le Syndrome Général d'Adaptation (Selye 1936, 1951)

L'ensemble des réponses mises en place par un individu face à un stress a été rassemblé dans le Syndrome Général d'Adaptation au stress ou GAS, permettant à l'individu de répondre au stimulus de manière plus ou moins adaptée. Le GAS se décompose en trois phases : la phase initiale ou phase d'alarme, la phase de résistance et la phase d'épuisement. La phase d'alarme voit l'intégration du facteur de stress par les organes sensoriels. Le système nerveux, via le cortex et le système limbique, va ainsi « comparer » la situation avec l'ensemble des expériences vécues, afin d'élaborer une réponse adaptée à cette nouvelle situation. L'organisme va réagir et une réponse est mise en place.

On passe alors dans la phase de résistance, au cours de laquelle l'organisme essaye de s'adapter à la perturbation et de rétablir son homéostasie.

La dernière phase (phase d'épuisement) advient si la réaction est inadaptée : elle peut être insuffisante ou excessive et conduire à l'apparition de pathologies.

Il est nécessaire de différencier deux types de réponse à un facteur de stress : on peut parler de stress aigu et de stress chronique. Le stress aigu se caractérise par un changement brutal physiologique, nerveux et comportemental, clairement observable et coïncidant avec l'exposition à une perturbation ponctuelle. Le stress chronique, à l'opposé, est observé lorsque le facteur de stress persiste sur une période prolongée. Cependant, sur ces seuls critères, il peut parfois être difficile de juger de la différence entre stress aigu et chronique. Nous étudierons ici plus particulièrement la réponse à un stress aigu.

III. 2. b. Le déroulement physiologique de la réponse au stress (Tokarz et Summers 2010)

Il s'agit d'une mobilisation neuronale, endocrine, métabolique et comportementale, qui se déroule à plusieurs niveaux, et mettant en jeu entre autres l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (Figure 33).

La première étape se déroule en quelques secondes, immédiatement lors de la survenue de la perturbation (Sapolsky et al. 2000). Elle se traduit par une forte augmentation (décharge) de la production de catécholamines (noradrénaline et adrénaline) par les cellules chromaffines (tissu médullo-surrénalien), suite à une stimulation via le système nerveux sympathique (Guillette et al. 1995).

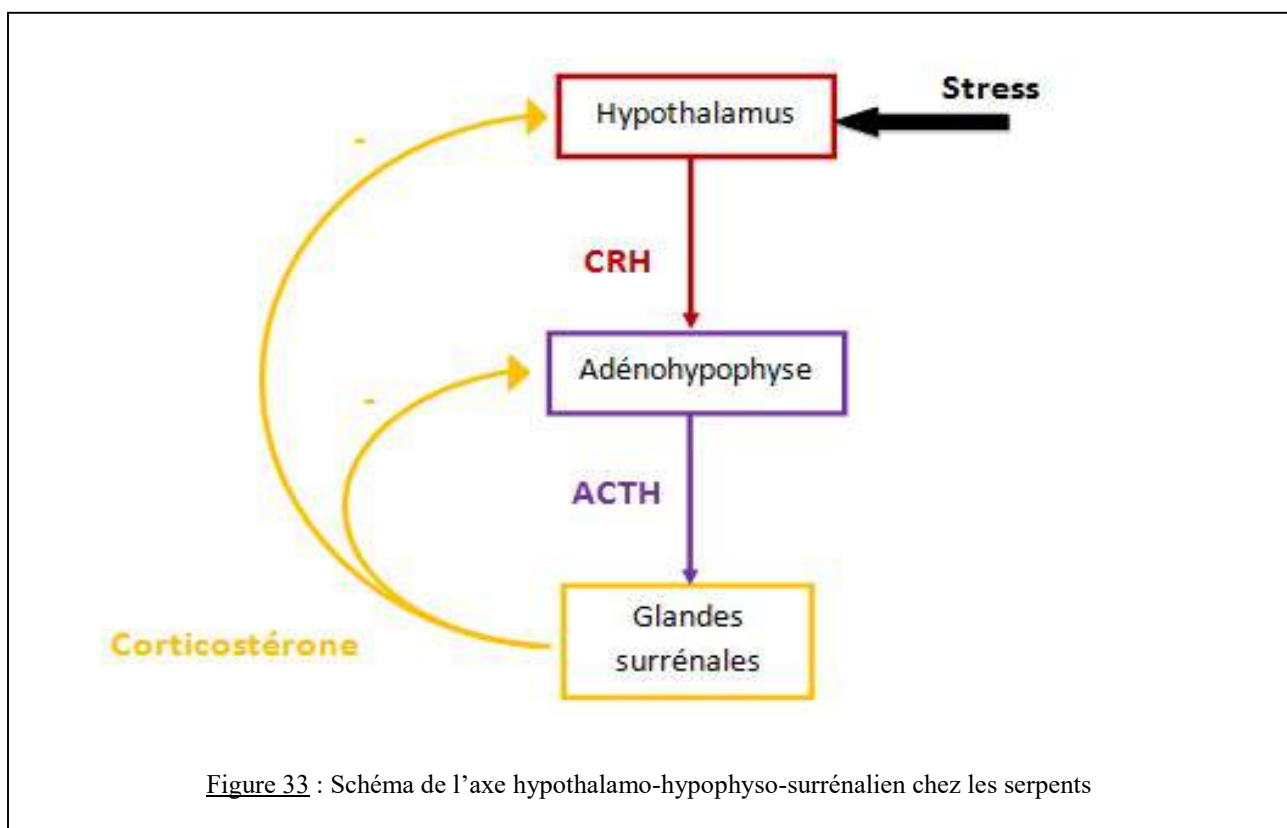


Figure 33 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien chez les serpents

Dans les minutes qui suivent, la sécrétion de corticolibérine CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) par l'hypothalamus est fortement augmentée. La présence de corticolibérine a été démontrée dans le cerveau de plusieurs reptiles, dont la couleuvre vipérine *Natrix maura* (Jackson 1986 ; Mancera et al. 1991). Bien que les caractéristiques de cette hormone soient très peu connues chez les reptiles, sa distribution semble identique à celle observée chez les mammifères.

La libération de CRH stimule ainsi les cellules corticotropes de l'adénohypophyse, entraînant en quelques secondes la production d'ACTH (Figure 33). L'ACTH stimule la synthèse et la libération pulsatile de glucocorticoïdes (corticostéroïdes) par le tissu cortico-surrénalien des glandes surrénales. Cela a été démontré chez plusieurs espèces de lézards : *Sceloporus undulatus* (Carsia et John-Alder 2003), *Hoplodactylus maculatus* (Preest et al. 2005), *Amblyrhynchus cristatus* (Romero et Wikelski 2006), *Egernia whitii* (Cartledge et Jones 2007).

Il existe également un rétrocontrôle négatif au sein de cet axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Cela a été démontré chez la tortue *Trachemys scripta elegans* (Fellmann et al. 1984) et supposé présent chez les Squamates. Ce rétrocontrôle se fait via la corticostérone et régule la production de CRH ; il peut être modulé en fonction des situations physiologiques, mais pas chez toutes les espèces de reptiles (Moore et Jessop 2003). La modulation de la réponse au stress se ferait via des récepteurs aux glucocorticoïdes, ayant une affinité plus ou moins importante pour les hormones en fonction des situations (Tokarz et Summers 2010). Les données sont relativement peu nombreuses sur le sujet.

III. 2. c. Les glucocorticoïdes, marqueurs de stress

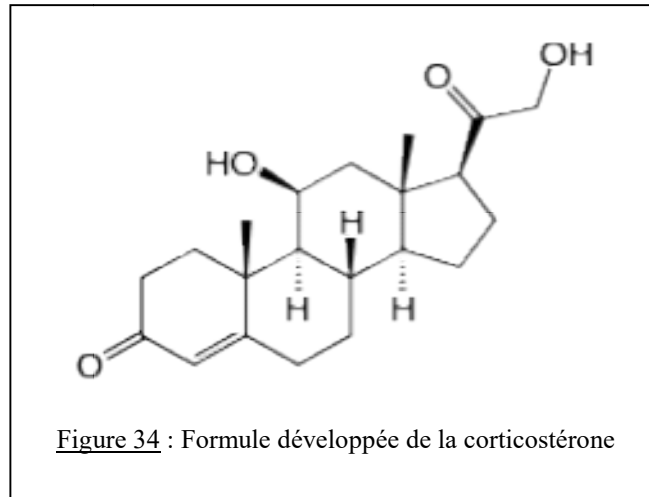
Au cours des phases d'alarme et de résistance, la réponse mise en place se traduit par des modifications physiologiques variables. Elles peuvent être expliquées, entre autres, par la sécrétion d'hormones stéroïdiennes, les glucocorticoïdes.

- Généralités

Les glucocorticoïdes sont sécrétés par un tissu glandulaire situé chez la plupart des reptiles en avant des reins (Norris et Carr 2013). Ces glandes sont comparables aux glandes surrénales des mammifères, présentant deux types de tissus (Guillette et al. 1995). Cependant, ces tissus sont entremêlés et il n'y a pas de séparation cortico-médullaire (Wright et Jones 1957 ; Guillette et al. 1995). Le premier tissu est constitué de cellules chromaffines (tissu médullo-surrénalien), le second nommé tissu interrénal correspond au tissu cortico-surrénalien des mammifères.

Chez la majorité des mammifères, l'hormone considérée comme marqueur de la réponse au stress est le cortisol. Chez certains rongeurs, ainsi que chez les Oiseaux et chez les reptiles, l'hormone majoritairement sécrétée est la corticostérone (Guillette et al. 1995 ; Hanke et Kloas 1995).

Elle a été ainsi considérée jusqu'à présent comme le meilleur indicateur de stress : cette hormone est relativement bien connue (Figure 34) et dosable chez la majorité des espèces (Creel 2001). Cela a été confirmé chez la vipère aspic (Bonnet et al. 2013). Elle est synthétisée à partir du cholestérol et possède des propriétés à la fois gluco- et minéralocorticoïdes.



Les glucocorticoïdes, en situation de stress, jouent plusieurs rôles (Sapolsky et al. 2000). Les actions peuvent être (1) **permissives** : elles se manifestent dans les premières minutes de la réponse au stress, et sont dues aux glucocorticoïdes déjà présents dans l'organisme au moment du stress, (2) **suppressives** : elles se mettent en place au minimum une heure après la perturbation, et semblent responsables, entre autres, du rétrocontrôle sur l'axe HPA ; attribuables à l'augmentation (3) **stimulatrices** : à l'opposé de l'action suppressive des glucocorticoïdes, elles potentialisent les hormones déjà présentes et améliorent la réponse première ou (4) **préparatrices** : elles n'ont pas un effet immédiat sur la réponse au stress mais modulent la réponse globale de l'organisme.

- Rôle hyperglycémiant des glucocorticoïdes

Parmi les conséquences connues d'une augmentation de la concentration circulante en glucocorticoïdes, il est admis que ceux-ci ont un rôle hyperglycémiant (Guillette et al. 1995 ; Sapolsky et al. 2000). Chez les reptiles, cela a été confirmé chez plusieurs espèces, dont *Xenodon merremi* (Houssay et Penhos 1960) et chez la couleuvre à collier *Natrix Natrix* (Skoczylas et Sidorkiewicz 1974).

Des protéines plasmatiques ont été mises en évidence chez le lézard *Urosaurus ornatus*, jouant le rôle de récepteur aux glucocorticoïdes (Jennings et al. 2000). Les mécanismes exacts ne sont pas connus, mais suite à la liaison hormone/récepteur, la concentration de glucose circulant augmente, ce métabolite devenant ainsi disponible pour les organes primaires dont la consommation est augmentée, comme le cerveau (Sapolsky et al. 2000). Cette augmentation s'explique d'abord via une stimulation de la néoglucogenèse et de la glycogénèse hépatique, ainsi que par une réduction de l'utilisation de glucose par les organes secondaires et périphériques (Munck 1971). De plus, les glucocorticoïdes entraînent

une mobilisation des réserves, lipides (lipolyse des corps gras) et acides aminés (protéolyse musculaire et inhibition de la synthèse protéique).

Chez le crocodile de Johnston *Crocodylus johnsoni*, le glucose montre une réponse plus franche que la corticostérone dans les trente minutes suivant la perturbation (Jessop et al. 2003). Il a également été montré que le glucose est un meilleur marqueur du stress chez certaines espèces de tortues (Bonnet, données non publiées). La question peut ainsi également se poser chez la vipère aspic.

III. 2. d. Cinétique de la production de corticostérone en réponse à un stress aigu chez la vipère aspic

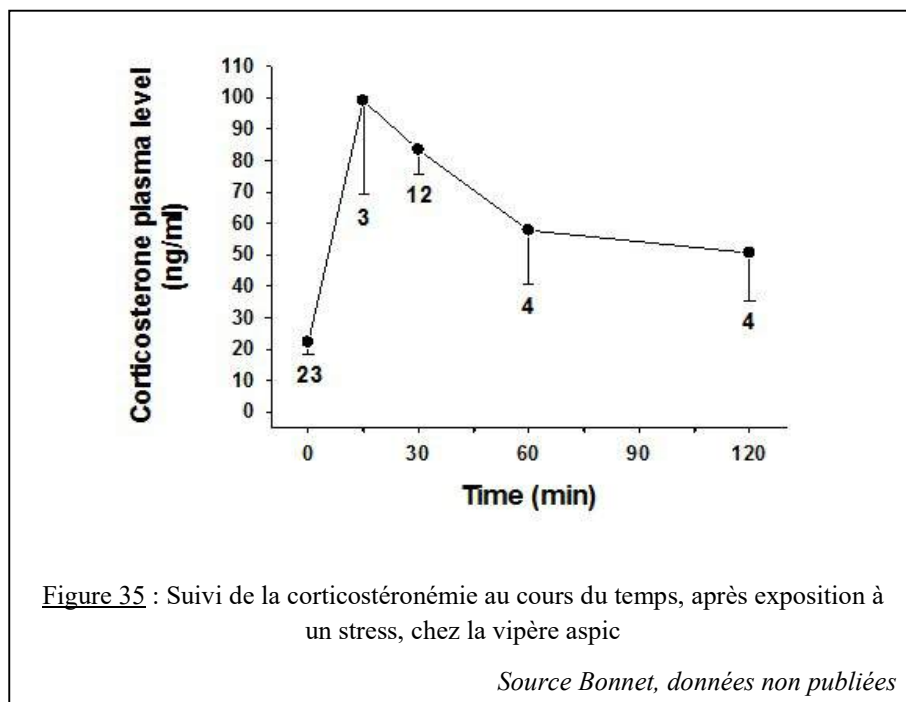
Chez les animaux endothermes, la réponse à un facteur de stress s'observe par une augmentation plus ou moins rapide et importante des concentrations plasmatiques en cortisol ou corticostérone. Elle varie en fonction de la nature, de la durée et de l'intensité de la perturbation ; cependant, en cas de perturbation ponctuelle, la réponse hormonale survient généralement en quelques minutes, et un retour à la normale est observé en un temps maximal de cinq heures.

Chez les reptiles, il semblerait que la réponse au stress soit plus longue à se mettre en place : pour certaines espèces, un délai de plus de dix minutes a été observé avant l'augmentation de la concentration sanguine en corticostérone (Romero 2002). La réponse au stress est biphasique : une augmentation jusqu'à un pic, observé environ soixante minutes après la perturbation (Romero 2002 ; Summers 2002 ; Moore et Jessop 2003).

Une première étude a été menée chez la vipère aspic (Bonnet, données non publiées), étudiant la réponse à une perturbation ponctuelle (manipulation et prélèvement sanguin par cardiocentèse). Un suivi de la concentration plasmatique en corticostérone a été effectué (Figure 35).

Le taux basal de corticostérone plasmatique peut ainsi être fixé autour de 20 ng/mL. Suite à une stimulation, une forte augmentation de la corticostéronémie est observée, jusqu'à un pic atteint entre 15 et 30 minutes après la perturbation, marquant le point maximum de la réponse au stress.

Puis la concentration en corticostérone diminue lentement, la valeur équivalente au taux basal n'est pas retrouvée 120 minutes après la perturbation. Cette étude ne s'est pas poursuivie jusqu'au retour au taux basal. Chez le serpent-jarretière *Thamnophis sirtalis*, dont la réponse au stress semble comparable à celle de la vipère aspic, des mesures effectuées 250 minutes après le stress montrent que la corticostéronémie n'a alors toujours pas rejoint sa valeur minimale (Moore et Jessop 2003).



III. 3. Stress et reproduction

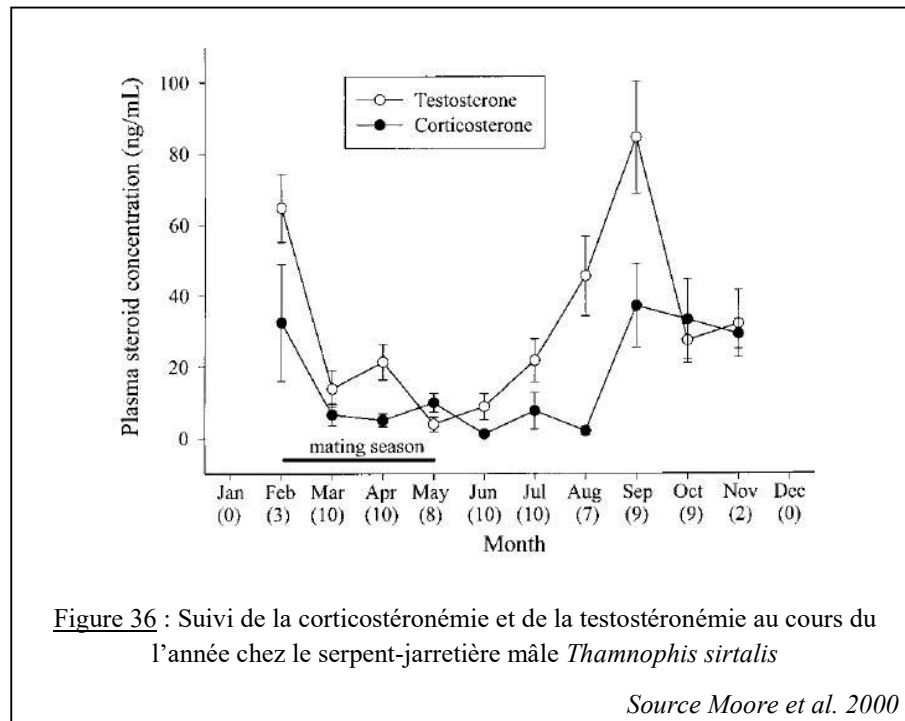
III. 3. a. La corticostérone, une « aide » à la reproduction chez les reptiles ?

Parmi les effets du stress sur l'homéostasie et sur l'organisme des Vertébrés, une conséquence reconnue est l'impact négatif sur la reproduction, qu'il s'agisse d'un stress aigu entraînant par exemple un avortement, ou d'un stress chronique modifiant l'équilibre de l'organisme de manière prolongée (Greenberg et Wingfield 1987). En effet, les hormones libérées par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien peuvent agir à différents niveaux pour inhiber la sécrétion ou l'action des hormones sexuelles (Tokarz et Summers 2010).

Chez les reptiles et amphibiens, la majorité des études porte sur les mâles. Il existe beaucoup d'espèces au sein desquelles les concentrations en hormones sexuelles (androgènes) vont diminuer après exposition à un facteur de stress (Tokarz et Summers 2010). Cependant, des observations ont conduit à nuancer ce constat : par exemple, les périodes de reproduction, qui peuvent être excessivement stressantes, ne conduisent pourtant pas à une suppression de la fonction reproductrice (Moore et Jessop 2003).

L'hypothèse soulevée a donc été la suivante : la corticostérone pourrait, chez certaines espèces et dans une certaine mesure, faciliter certaines étapes de la reproduction. Plusieurs espèces présentent en effet des taux de corticostérone plus élevés durant la période de reproduction, par exemple le serpent-jarretière mâle *Thamnophis sirtalis* (Moore et al. 2001).

De plus, toujours chez cette espèce, les taux de corticostérone sont corrélés tout au long de l'année avec les taux de testostérone (Figure 36 ; Moore et al. 2000). Cette corrélation pourrait s'expliquer par le fait que les demandes énergétiques sont accrues lors des périodes de reproduction (compétition, accouplement...), et que les corticoïdes participent à la mobilisation des réserves.



III. 3. b. Une influence variable : stress aigu vs. stress chronique

En plus d'une variabilité intra-spécifique importante, il semblerait également que le type de stress auquel est soumis l'individu soit déterminant vis-à-vis de l'impact sur la fonction reproductrice : il semblerait en effet qu'un stress chronique soit beaucoup plus délétère. Cette hypothèse a été soulevée en particulier chez *Boiga irregularis* (Moore et al. 2005) : la population sauvage vivant sur l'île de Guam dans des conditions difficiles présente des concentrations augmentées en corticostérone et des concentrations diminuées en hormones sexuelles (testostérone et œstrogènes) par rapport à des animaux captifs.

Cependant, des observations contradictoires ont été rapportées : une réponse adéquate à un stress d'origine environnementale permettrait aux individus de faire face et de s'adapter à des conditions fluctuantes et à un environnement changeant. Il semblerait que des taux augmentés de corticostérone soient un composant essentiel de l'évolution oviparité/viviparité chez les reptiles, entrant en jeu dans le mécanisme de la rétention d'œufs. D'autre part, une corticostéronémie élevée retarderait l'oviposition et donc augmenterait la durée de gestation (Shine et Guillette 1988 ; Guillette et al. 1995).

Les effets d'un stress aigu (généralement une capture) semblent varier en fonction des espèces (Guillette et al. 1995 ; Tokarz et Summers 2010). Le plus souvent, un stress aigu conduit à une diminution des hormones sexuelles concomitamment à l'augmentation des glucocorticoïdes, plus ou moins rapidement après la perturbation.

Il n'est pas exclu que le sexe ait une influence : chez plusieurs espèces, comme *Alligator mississippiensis* et les tortues *Caretta caretta* ou *Lepidochelys olivacea*, les taux mesurés en corticostérone sont différents entre les populations mâle et femelle. Chez le lézard *Cnemidophorus sexlineatus*, les femelles présentent des concentrations plasmatiques supérieures à celle des mâles après exposition à un facteur de stress identique.

Cependant, parfois, un stress aigu semblerait avoir un impact faible voire inexistant : certaines espèces ne voient pas de modifications de la concentration en hormones sexuelles après que les individus aient été soumis à un stress aigu (Tokarz et Summers 2010). Chez le serpent-jarrettière femelle *Thamnophis sirtalis*, il semblerait qu'un stress aigu n'ait pas d'influence sur les hormones de la reproduction (Whittier et al. 1987).

Le maintien en captivité semblerait être, chez beaucoup d'espèces, un contexte excessivement stressant pouvant conduire à des échecs de reproduction répétés. En particulier, chez la femelle, le stress induit par une captivité semble inhiber la production d'œstrogènes et par conséquent conduit à un développement ovarien limité et une vitellogenèse réduite (Guraya 1989 ; Romero 2002 ; DeNardo 2005).

III. 3. c. Influence de la saison et du cycle reproducteur

Des études histologiques ont montré que les glandes surrénales subissent des variations de volume, de poids ainsi que des modifications cytologiques au cours de l'année (Guillette et al. 1995).

La sensibilité des surrénales à une stimulation à l'ACTH semble varier de manière saisonnière, tout comme la concentration plasmatique en corticostérone, comme observé chez plusieurs espèces de lézards désertiques en Australie (Bradshaw 1987). Chez le serpent-jarrettière *Thamnophis sirtalis*, la réponse à un stress est d'une amplitude plus faible au printemps, coïncidant avec les activités de reproduction. L'hypothèse avancée est qu'en réduisant la réponse au stress au moment de la période de reproduction, les chances de succès reproducteur soient maximisées : les individus continuent à se consacrer à leur activité reproductrice en ignorant le stress, même sévère (Moore et Jessop 2003).

De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'hypertrophie glandulaire ayant lieu au printemps et en été, en même temps qu'un développement des gonades.

Le stade reproducteur semble donc également entrer en jeu : des traitements hormonaux ont montré que des injections de LH, FSH, 17 β -œstradiol et eCG (Equine Chorionic Gonadotropin) chez des tortues femelles *Chrysemys picta* entraînent une augmentation de la corticostéronémie (Guillette et al. 1995). De même, chez la tortue serpentine *Chelydra serpentina*, les concentrations en 17 β -œstradiol et en progestérone sont respectivement

augmentées et diminuées de manière plus forte chez les femelles non gravides (Mahmoud et al. 1989).

Cependant, les études sont rares, et il est très difficile de s'assurer d'un lien systématique existant entre le stade reproducteur et l'activité surrénalienne.

III. 3. d. Impact du stress sur les gonades et sur le déroulement du processus reproducteur (Greenberg et Wingfield 1987 ; Guillette et al. 1995 ; Pottinger 1999 ; Tokarz et Summers 2010)

La majorité des études ont été menées chez les lézards et scinques, les données concernant spécifiquement les serpents sont rares.

- Fonction ovarienne

Il est admis que la fonction ovarienne est influencée par le stress ressenti par les femelles : par exemple, les femelles *Anolis carolinensis* soumises à des conditions environnementales difficiles (humidité, température, photopériode), à une forte densité de population ou à des mâles agressifs présentent un recrutement et une croissance folliculaires moindres (Crews 1974).

Chez le scinque *Eutropis carinata* (aussi nommé *Mabuya carinata*), une série d'études soumettant les femelles à des stress répétés a confirmé ces observations (Ganesh et Yajurvedi 2002a). Il a aussi été mis en évidence que l'administration de corticostérone empêche la stimulation ovarienne par la FSH et la croissance folliculaire (Nijagal et Yajurvedi 1999).

L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien a été mis en cause, de par une hypertrophie cellulaire du tissu cortico-surrénalien, lors de stress répétés (Ganesh et Yajurvedi 2002b). De plus, l'administration d'un antagoniste de la CRH (hCFR, en hélice α) effectuée en parallèle à des stress répétées conduit à une annulation des effets du stress (Ganesh et Yajurvedi 2002b) : on observe un rétablissement de la croissance folliculaire et la vitellogenèse.

D'autre part, il a été mis en évidence que la noradrénaline joue un rôle dans la croissance ovarienne et dans l'ovulation : il a été noté que la concentration d'un métabolite de la noradrénaline (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol) augmente avec la taille des follicules préovulatoires et jusqu'à l'ovulation (Desan et al. 1992). Cela pourrait traduire l'implication de la noradrénaline dans la production de GnRH.

- Fonction testiculaire

L'impact des glucocorticoïdes sur la fonction testiculaire a également été démontré (Tokarz et Summers 2010). Chez l'anole brun *Anolis sagrei*, des implants de corticostérone entraînent en trois semaines une diminution de la taille et du poids des testicules, ainsi qu'une spermatogenèse altérée, avec une réduction du nombre de spermatozoïdes et de spermatozoïtes (Licht 1967 ; Tokarz 1987). Les mêmes observations ont été menées chez le lézard des palissades *Sceloporus occidentalis* (Dunlap et Schall 1995).

Le phénomène observé chez la femelle *Eutropis carinata* a été également observé chez le mâle : des facteurs de stress environnementaux et une corticostéronémie élevée vont avoir un effet inhibiteur sur l'activité testiculaire ainsi que sur le taux circulant de testostérone (Yajurvedi et Nijagal 2000 ; Yajurvedi et Menon 2005). Il semblerait chez cette espèce que la spermiogenèse soit davantage affectée que la prolifération des spermatogonies et les phénomènes de méiose, ce qui est cohérent avec les données présentées plus haut et rapportant que la spermiogenèse est sous dépendance androgénique (Lance 1984).

Cependant, encore une fois, la variabilité interspécifique est à prendre en compte : il semblerait que les effets de la corticostérone soient moins avérés chez le lézard *Anolis carolinensis* (Greenberg et al. 1984). Dans cette étude, aucune relation n'a été montrée entre les taux de corticostérone ou le statut social et la fonction testiculaire.

- Comportement reproducteur

Des études menées sur différentes espèces, comme l'anoie brun *Anolis sagrei* ou le lézard à flancs maculés *Uta stansburiana*, montrent qu'une augmentation du taux de corticostérone circulant (via la pose d'implants) conduit à une inhibition des comportements territoriaux et de l'agressivité vis-à-vis des autres mâles concurrents. Cependant, cela ne semble pas avoir d'impact sur les comportements de parade nuptiale ni d'accouplement (Tokarz 1987 ; DeNardo et Licht 1993). Cela a également été observé chez le serpent-jarretière *Thamnophis sirtalis* (Moore et Mason 2001 ; Lutterschmidt et al. 2004). Les comportements d'accouplement sont fortement inhibés en fonction de la concentration plasmatique en corticostérone. Cependant, la corticostéronémie ne semble pas avoir d'impact sur le taux de testostérone circulant dans cette espèce : il est donc probable que la corticostérone ne soit pas un inhibiteur direct de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Chez les femelles, mis à part les observations rapportant la capacité de celles-ci à maintenir leur comportement sexuel face à des situations extrêmes (blessures graves, conditions climatiques défavorables), les données sont moindres (Moore et Jessop 2003 ; Tokarz et Summers 2010).

Il n'y a pas connaissance d'espèces qui voient leur comportement reproducteur modifié en réponse à un stress. Il y a plusieurs raisons possibles (Moore et Jessop 2003) : tout d'abord, étant donné l'investissement énergétique nécessaire à la reproduction chez la femelle, il est possible que celle-ci soit favorisée et même prioritaire face à la survie de l'individu. Ensuite, il a été montré que les taux de corticostérone doivent être plus élevés chez les femelles que chez les mâles pour conduire effectivement à un changement dans le comportement (donc potentiellement que l'intensité du stress soit supérieure).

- Influence de la corticostérone sur la gestation, la mise bas et les embryons

Une étude menée chez le gecko néo-zélandais commun *Woodworthia maculatus* (ou *Hoplodactylus maculatus*), lézard vivipare, a mis en évidence via des implants qu'un taux de corticostérone extrêmement élevé peut entraîner des malformations embryonnaires et des

dystocies (Cree et al. 2003). Cependant, les concentrations auxquelles les animaux ont été soumis étaient non-physiologiques. Chez la couleuvre de l'ouest *Thamnophis elegans*, la corticostérone est responsable de dystocies et d'un nombre de mort-nés accru (Robert et al. 2009).

D'autres études portant sur les lézards *Woodworthia maculatus* et sur *Lacerta vivipara* semblent montrer qu'une corticostéronémie élevée n'a pas d'impact significatif sur la durée ou le succès de la gestation (Prest et al. 2005). La taille de la portée, le sex-ratio ou les caractères de dimorphisme sexuel ne sont pas non plus affectés (Uller et al. 2005).

Les effets sur les embryons semblent par contre établis : chez *Lacerta vivipara*, la corticostérone a un effet inhibiteur sur la dispersion spatiale des nouveau-nés, ce qui se traduit par une santé moindre (De Fraipont et al. 2000 ; Warner et Shine 2008). Ils bougent significativement moins et sont moins rapides que des nouveau-nés nés de mères non exposées (Belliure et al. 2004 ; Meylan et Clobert 2004).

Une étude récente conduite sur la couleuvre de l'ouest *Thamnophis elegans* met en évidence une influence de la corticostérone sur la taille des nouveau-nés femelles : elles sont significativement plus petites que les femelles issues de portées non traitées (Robert et al. 2009).

Il apparaît également que la taille de la mère avant la mise-bas entre en considération : plus la femelle est grande, plus les effets de la corticostérone sont visibles (Meylan et al. 2004).

Pour conclure cette étude bibliographique, nous pouvons dire que les données sur le processus reproducteur de la vipère aspic sont relativement complètes (étudiées directement ou déduites des connaissances existantes chez d'autres espèces). D'autre part, la réponse au stress a commencé à être étudiée. Cependant, il apparaît ici que, bien que des observations aient été faites permettant d'admettre un impact du stress sur la reproduction chez plusieurs espèces, de nombreux éléments demeurent inconnus, en particulier chez la vipère aspic. Par quels mécanismes la corticostérone est-elle impliquée dans les différentes étapes du processus reproducteur ? A-t-elle une influence directe sur la production et sur les taux circulants d'hormones sexuelles ? Sur les métabolites impliqués dans la reproduction ?

Dans le but d'étoffer ces connaissances, et d'essayer de commencer à répondre à ces questions, nous avons donc pris le parti d'effectuer des suivis hormonaux, comparant taux circulants de corticostérone, d'hormones sexuelles et de quelques métabolites impliqués dans la reproduction.

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes

I. 1. Animaux

I. 1. a. Elevage

Le Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC) possède un élevage de vipères aspic, permettant de faire avancer la recherche fondamentale sur cette espèce. Il a été mis à la disposition de cette étude une vingtaine d'animaux. L'un d'entre eux a immédiatement été éliminé : il présentait un état de santé dégradé avec des troubles nerveux. Les autres animaux ont été inclus dans l'étude, mais cinq n'ont pas pu être suivis tout au long de celle-ci (deux morts, deux mises en quarantaine et un cas de résorption d'œufs). Il a cependant été décidé d'inclure dans l'étude les échantillons prélevés.

Ainsi, nous avons pu mener l'étude sur dix-neuf animaux élevés en captivité : treize femelles (entre quatre et douze ans) et six mâles (entre quatre et neuf ans). Les animaux ont été maintenus dans des conditions artificielles d'élevage, dans des boîtes individuelles présentant un abri et un point d'eau. La température ambiante est maintenue autour de 30°C le jour et 20°C la nuit.

L'état corporel de ces animaux est assez variable d'un individu à l'autre : leurs poids au début de l'étude étaient compris entre 61 grammes (mâle) et 260 grammes (femelle).

Le calcul des BCI pour chaque animal indique aussi de fortes variations, mais avec des valeurs plus élevées pour les femelles (Annexe 1). Pour les mâles, le BCI est compris entre 0,44 et 0,59, avec une moyenne de 0,54. Concernant les femelles, il est possible de les répartir en deux groupes :

- dix femelles ont un BCI supérieur à 0,70 et peuvent être considérées comme potentiellement reproductrices (BCI compris entre 0,76 et 1,15 ; cf. supra).
- trois femelles ont un BCI inférieur à 0,70 (entre 0,61 et 0,68), leurs réserves corporelles étant donc considérées comme insuffisantes pour assurer une gestation.

I. 1. b. Conduite de la reproduction

Les animaux ont été sortis d'hibernation à la fin du mois d'avril. L'accouplement a eu lieu sur trois jours autour du 14 mai 2015, par lots réorganisés quotidiennement et contenant systématiquement plus de femelles que de mâles.

L'engagement dans la vitellogenèse a été diagnostiqué par palpation abdominale au moment supposé de l'ovulation (10 juin) : quatre femelles ont été considérées comme reproductrices.

La gestation a été confirmée, toujours par palpation abdominale, pour ces quatre animaux en milieu de gestation (20 juillet).

Trois mises bas ont eu lieu à partir du 17 août 2015, dont deux n'ont donné que des œufs non fécondés. L'autre a vu la naissance de deux nouveau-nés vivants, de trois mort-nés et d'un

œuf non fécondé. La dernière femelle, très en retard, a été examinée et a présenté une résorption totale de la portée (cf. supra, Bonnet et al. 2008).

On constate ainsi que la reproduction au sein de l'élevage a eu un succès limité : sur les dix femelles ayant un BCI supérieur à 0,70, seulement deux ont mené à bien un processus reproducteur. La troisième femelle ayant mis bas possédait en début d'étude un BCI limite (0,67). Le nombre de vipéreaux nés est très faible, et la présence d'œufs fécondés, observée relativement fréquemment dans une portée, peut être remarquée ici de par sa quantité (portées entières).

I. 1. c. Captures

Attenante au CEBC, une Réserve Biologique Intégrale (RBI) créée par l'Office National des Forêts dans la forêt de Chizé permet l'étude des écosystèmes forestiers. Afin de suivre l'évolution des populations de serpents dans la RBI, un programme de Capture-Marquage-Recapture (CMR) a été mis en place : les animaux sont capturés, mesurés, marqués et relâchés. Dans le cadre de cette étude, neuf vipères adultes femelles gravides ont été capturées.

Il a alors été décidé de les inclure au sein de l'étude, à partir de la date de capture, et ce même si les données les concernant sont incomplètes (entre autres, BCI au moment de l'accouplement et premières prises de sang).

La première capture a eu lieu le 2 juin 2015, la dernière le 16 juillet 2015.

Nous n'avons pas déterminé l'âge de ces animaux, car il n'existe pas de technique fiable pour l'évaluer sur des serpents capturés adultes.

Les animaux ont également été maintenus dans des conditions d'élevage, dans des boîtes individuelles présentant un abri et un point d'eau. La température ambiante est moins bien régulée que pour les autres animaux d'élevage, maintenue autour de 30°C le jour et n'étant pas inférieure à 25°C la nuit.

Les mises bas ont commencé plus tôt que pour les vipères de l'élevage : la première a eu lieu le 26 juillet (cette différence peut s'expliquer par les différences entre les conditions d'élevage, en particulier une température de maintien plus élevée qui a conduit à un développement plus rapide et un raccourcissement du temps de gestation).

Les neuf portées ont vu la naissance de quatre-vingt-quatorze nés vivants (dont trois sont morts dans les jours suivants) et trois mort-nés. Les vipéreaux ont été relâchés après quelques semaines. Les mères ont été nourries plusieurs fois, afin d'améliorer leur état corporel, avant d'être également relâchées.

On peut alors noter que le succès reproducteur est beaucoup plus important chez les vipères capturées, avec un grand nombre de vipères capturées, des portées de taille importante et un très haut taux de nés vivants.

I. 2. Choix des marqueurs

I. 2. a. Marqueurs de la reproduction

Se basant sur les études menées et présentées plus haut dans ce manuscrit, il a été décidé de suivre les marqueurs connus pour être modifiés au cours du cycle reproducteur de la vipère aspic.

Ainsi, concernant les mâles, il a été décidé de doser la testostérone.

Quant aux femelles, le choix s'est porté sur la progestérone, pour des raisons pratiques. En effet, les œstrogènes sont difficiles à doser, car les concentrations sont souvent très faibles, de l'ordre du pg/mL (Bonnet 1996) et surtout ne sont élevées qu'en début de reproduction.

La décision a également été prise de doser plusieurs métabolites marqueurs de la reproduction : calcium, protéines totales, cholestérol et triglycérides.

I. 2. b. Marqueurs de stress : corticostérone et glucose

Etant donné son rôle de marqueur principal de la réponse au stress chez la majorité des reptiles et en particulier chez la vipère aspic, le glucocorticoïde choisi pour les dosages a été la corticostérone.

Cependant, il est admis que le glucose connaît des variations en situation de stress : sa concentration plasmatique augmente suite à l'action hyperglycémisante de la corticostérone, mais également sous l'effet des catécholamines (mis en évidence chez la grenouille-taureau *Rana catesbeiana* : Herman 1977 ; MbangKollo et DeRoos 1983). Afin de tester chez la vipère aspic l'hypothèse déjà confirmée chez le crocodile de Johnston et chez certaines espèces de tortues (plaçant le glucose comme meilleur marqueur de stress que les glucocorticoïdes, cf. supra), il a été décidé que le glucose serait également mesuré et comparé aux taux de corticostérone.

Il s'est alors présenté deux moyens de mesurer la glycémie.

La spectrophotométrie est la méthode habituelle, méthode nécessitant un certain volume de sang (au moins 200 μ L) et une contention efficace (au moins deux personnes dans le cas d'une prise de sang sur une vipère). Les prélèvements de sang doivent être centrifugés, car les mesures se font sur le plasma. Cette méthode nécessite une organisation importante en cas de prélèvements sur le terrain, car il faut prévoir une centrifugeuse et de quoi congeler le plasma récolté.

Le glucomètre portatif est un outil très utilisé en médecine humaine et vétérinaire dans le cadre de suivis de diabète. Il s'agit d'un appareil simple d'utilisation, pratique et d'un prix abordable. La mesure de glycémie se fait sur sang total, immédiatement et en quelques secondes. Une goutte est suffisante pour effectuer la mesure. Cependant, il ne s'agit pas d'un appareil destiné à être utilisé sur du sang de reptile : en particulier, les valeurs physiologiques de glycémie chez ces espèces peuvent se trouver dans un intervalle beaucoup plus étendu que chez les Mammifères (entre 0,1 g/L et 3 g/L ; Bonnet et Naulleau 1993).

Par conséquent, il a été décidé de comparer ces deux méthodes de mesure, afin de déterminer si l'utilisation du glucomètre peut être fiable et pertinente.

I. 3. Protocole

I. 3. a. Principe

L'objectif étant de réaliser un suivi comparatif des marqueurs de la reproduction par rapport aux hormones de stress, il a été décidé d'effectuer un suivi aux moments-clés du processus reproducteur. Ces périodes ont été identifiées ainsi :

(1) accouplement/début de vitellogenèse, qui correspond au moment les mâles et les femelles ont été mis ensemble pour l'accouplement, quelques semaines après la sortie d'hibernation ;

(2) ovulation/fin de vitellogenèse, période où les follicules vitellogéniques libèrent les ovules et où la fécondation a lieu et correspondant à une période de repos pour les mâles ;

(3) gestation pour les femelles, les mâles étant toujours « au repos »

et **(4) post-partum**, pour les femelles ayant mis bas ; les femelles non reproductrices étant également prélevées afin de pouvoir mettre en place une comparaison.

Evidemment, les mâles ne sont concernés ni par la vitellogenèse, ni par l'ovulation, ni par la gestation. Ces périodes ont été appelées ainsi par praticité, en fonction des dates de prélèvement.

Quatre séries de prélèvements ont donc été réalisées, à chaque étape de la reproduction. Ils ont été répartis comme suit :

- accouplement / début de vitellogenèse : 15 mai 2015
- ovulation / fin de vitellogenèse : 10 juin 2015
- gestation : 20 juillet 2015
- après la mise-bas : date variable, au maximum 48h post-partum.

Une première prise de sang a été réalisée le plus rapidement possible. Etant donné la cinétique de réponse au stress chez la vipère aspic, ce prélèvement, effectué en quelques minutes (en moyenne 5 minutes et 20 secondes ; minimum 1 minute et 17 secondes ; maximum 17 minutes et 43 secondes), peut être considéré comme représentatif du taux basal et noté t0. En effet, il est possible de considérer que la réponse au stress ne s'est pas encore mise en place.

Puis l'animal est laissé pendant environ 30 minutes dans des conditions stressantes, favorisant la réponse hormonale : boîtes transparentes sans abri, en pleine lumière, en contact visuel et sonore avec les personnes réalisant les prélèvements. Un second prélèvement est alors réalisé (en moyenne 33 minutes et 12 secondes après la première manipulation ; minimum 24 minutes et 45 secondes ; maximum 50 minutes et 9 secondes).

Ce délai de 30 minutes a été choisi car il a été montré qu'il s'agit, pour la majorité des individus chez la vipère aspic, du temps nécessaire à ce que la réponse au stress atteigne un pic (cf. supra ; Bonnet, données non publiées). Le but ici n'est pas de réaliser une cinétique de

la réponse au stress (déjà connue), mais de mettre en évidence et de comparer, au plus fort de celle-ci, l'impact de ce stress sur les marqueurs et hormones de la reproduction.

I. 3. b. Prises de sang

- Sang « central »

Le sang a été obtenu par cardiocentèse (Figure 37). Cette technique de prélèvement intracardiaque est bien maîtrisée, et est bien supportée par les animaux. Le volume de sang prélevé par prise de sang a été en moyenne de 400 μL , à l'aide d'aiguilles de 30G et de seringues d'1 mL. Etant donné que deux prises de sang sont réalisées à trente minutes d'intervalle, le volume total prélevé est au maximum de 800 μL par animal.



Figure 37 : Prélèvement de sang par cardiocentèse

Crédit photo : Chebrou 2015

Le sang est immédiatement centrifugé après la prise de sang, le plasma est récupéré et stocké dans un aliquot au congélateur jusqu'aux dosages.

La goutte de sang présente dans l'aiguille est utilisée pour la mesure de glycémie via le glucomètre.

Aucun problème n'a été observé chez les individus prélevés.

- Sang périphérique

Suite à la décision prise vis-à-vis de l'utilisation du glycomètre portatif, et étant donné la possibilité donnée par celui-ci de n'utiliser qu'une très petite quantité de sang pour donner des résultats (0,3 μL), nous avons également tenté de prélever du sang provenant de capillaires sanguins.

En effet, la question s'est posée, en faisant le parallèle avec les procédés utilisés chez les petits animaux de compagnie, de savoir s'il serait possible d'obtenir un volume de sang suffisant en piquant en périphérie dans un capillaire sanguin, évitant d'utiliser la méthode bien

tolérée mais tout de même traumatique et plus difficile à mettre en œuvre de la prise de sang intracardiaque.

Le long de la colonne vertébrale et la queue sont des zones généralement bien irriguées. Chaque prise de sang intracardiaque a donc été précédée de piqûres superficielles à l'aide d'aiguilles démontées de 25G, répétées pendant environ quarante-cinq secondes ou jusqu'à obtention d'une goutte de sang ou de lymphe, sur la queue et le long de la colonne vertébrale (Figure 38).

Cependant, le taux de réussite de ces prélèvements a été faible (15/116, soit 13%).

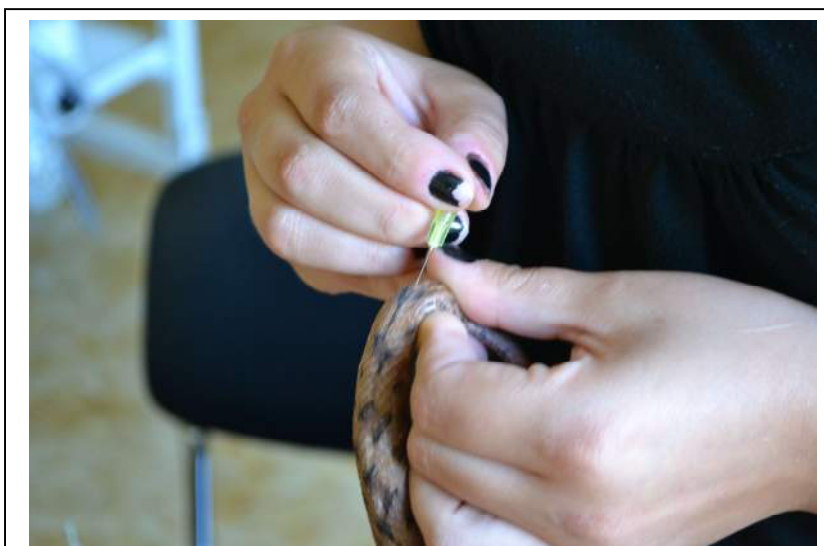


Figure 38 : Piqûres superficielles le long de la colonne vertébrale

Crédit photo : Chebrou 2015

I. 4. Mesures biochimiques et hormonales

I. 4. a. Dosage du glucose par coulométrie

Le glucomètre portatif utilisé est le modèle AlphaTRAK2® (Abbott, Chicago, IL, USA), utilisé aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Il permet de mesurer la glycémie sur sang total avec un volume minimum de 0,3 μ L.

La technique utilisée est la coulométrie : elle repose sur la réaction d'oxydoréduction se produisant entre le glucose sanguin et les composants de la bandelette, dans notre cas glucose déshydrogénase et flavine-adénine dinucléotide (couple FAD/FADH). Cette réaction conduit à la production d'électrons, et donc d'un courant électrique, qui est mesuré directement par le glucomètre. La force du courant est directement liée à la quantité de glucose présent dans le sang et permet de la déterminer. Le seuil de détection permis par cette réaction est de 0,20 g/L.

I. 4. b. Dosage des hormones stéroïdiennes par radio-immunologie (corticostérone, testostérone et progestérone)

Les dosages hormonaux ont également été réalisés au laboratoire du CEBC. La radio-immunologie (RIA : Radio Immuno Assay) est la technique utilisée ici pour le dosage d'hormones stéroïdiennes. Il s'agit d'une technique de dosage très performante, qui permet de détecter des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de pg/mL dans le plasma sanguin. La mesure se fait par l'enchaînement de deux étapes : l'extraction, qui permet d'extraire les stéroïdes du plasma, et le dosage comprenant lui-même deux phases : la compétition et la séparation, permettant une évaluation de la radioactivité et donc de la concentration.

- Extraction des hormones stéroïdiennes

L'extraction se fait à l'aide d'un solvant organique (ici l'éther éthylique ; Tableau 1). Cela permet d'extraire les stéroïdes plasmatiques, qui sont solubles dans les phases organiques non polaires.

En effet, les hormones stéroïdiennes présentes dans le plasma sont liées à des protéines de transport, qui sont insolubles dans les phases organiques. Le solvant rompt la liaison entre les protéines et les hormones en les solubilisant.

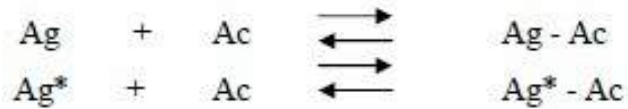
Tableau 1: Etapes de l'extraction d'hormones stéroïdiennes plasmatiques

Etapes de la manipulation	Rôle de l'étape
Prélèvement de la quantité de plasma à analyser (20-50 µL)	Prise d'essai
Ajout de tampon PBS (450-480 µL)	Dilution dans une solution physiologique
Ajout de l'éther éthylique (3 mL)	Extraction des stéroïdes solubles dans l'éther qui étaient liés à des protéines plasmatiques
Centrifugation	Séparation des phases aqueuse et organique
Congélation et récupération de la phase organique	Récupération de la phase organique seule
Evaporation au bain-marie	Evaporation de la phase organique : les stéroïdes restent sur les parois du tube
Ajout de tampon dans l'extrait sec (300-500 µL) et mélange	Récupération des stéroïdes
Prélèvement d'un volume défini d'échantillon (100 µL)	Fin de l'extraction

- Dosage par radio-immunologie

Le principe du dosage d'une hormone par la technique de radio-immunologie repose sur une réaction antigène/anticorps et la création d'un complexe immun. Ici, ce dosage est basé sur la compétition entre l'antigène à doser (l'hormone) et un même antigène marqué (radioactif) vis-à-vis de l'anticorps spécifique de ces antigènes (Tableau 2).

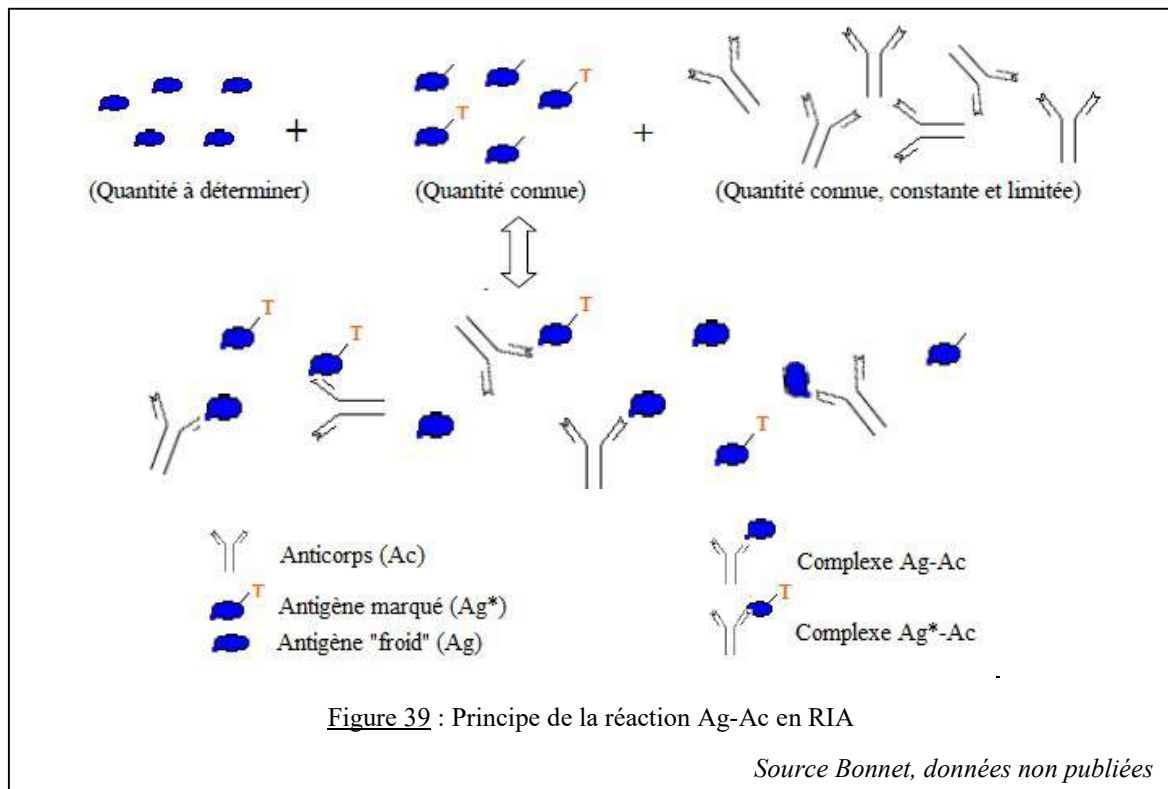
Lorsqu'on met en présence un antigène (Ag), ce même antigène marqué (Ag*) et un anticorps spécifique (Ac) par défaut, il va y avoir formation simultanée de deux types de complexes, selon les deux réactions suivantes :



Ainsi, plus la concentration en antigène « froid » (non marqué) est forte, plus la quantité de complexes Ag-Ac sera importante. Et étant donné que la concentration en antigène marqué (Ag*) est fixe, la formation de complexes Ag-Ac se fera au détriment de celle de complexes Ag*-Ac : plus l'antigène « froid » (Ag) est présent en quantité importante, moins il y aura de complexes marqués.

Ici, la quantité des trois éléments est identique (100 µL). Il s'agit d'un dosage « par défaut de réactif », car la concentration en anticorps est fixe et surtout limitante (d'où la compétition pour les sites de fixation). Une fois la réaction à l'équilibre, on obtient quatre fractions (Figure 39) :

- la fraction libre non marquée dite « froide » (F)
- la fraction libre marquée dite « chaude » (F*)
- la fraction liée non marquée (B)
- la fraction liée marquée (B*).



La séparation des fractions libres et liées se fait par l'utilisation de charbon-dextran (500 μ L), technique favorisée lors de dosages d'hormones car elle est très efficace lorsque l'antigène est de taille très inférieure au complexe Ag-Ac. Le charbon va adsorber les fractions libres (F et F*). De plus, le Dextran (polymère glucidique), qui recouvre le charbon, agit comme un tamis moléculaire compatible avec la taille des molécules à adsorber (Dextran « T70 » pour les stéroïdes).

Ceci permet d'isoler les fractions liées et de mesurer leur radioactivité, et donc de déterminer la concentration de l'antigène (Figure 40). La radioactivité sert de marquage, et permet de mesurer l'activité de l'hormone radioactive marquée et liée, qui est inversement proportionnelle à la quantité d'hormone « froide » présente dans le milieu.

La mesure de la radioactivité se fait via un scintillateur Tricarb 2810TR (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) après ajout d'un scintillant. Ce dernier est composé d'un solvant, d'un scintillant primaire et d'un scintillant secondaire. Les rayonnements β^- , émis par le tritium qui marque l'hormone radioactive, excitent les molécules de solvant qui transfèrent l'énergie au scintillant primaire, puis au secondaire. Ce dernier retrouve sa stabilité par émission radioactive. Les photons émis sont détectés par un photomultiplicateur ; le scintillateur convertit ensuite cette énergie en électricité d'intensité proportionnelle à l'émission radioactive (en coups par minute ; cpm).

Après mesure de la radioactivité de la fraction liée « chaude », qui est en quantité connue, il est possible de déterminer la concentration en hormone « froide » par interpolation.

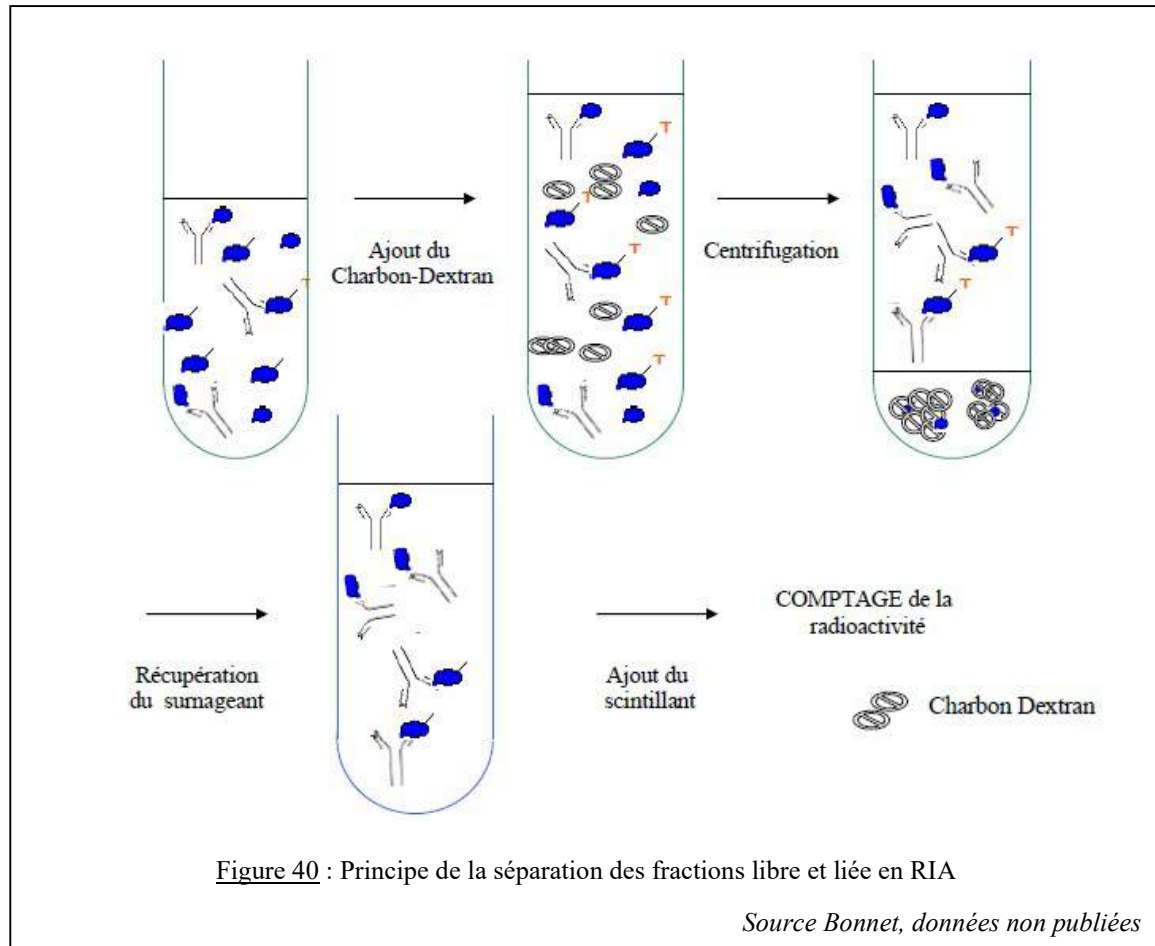


Tableau 2 : Etapes pour la deuxième partie du dosage par RIA

Etapes de la manipulation	Rôle de l'étape
Dans l'échantillon (100 µL) : Ajout de la solution d'anticorps (100 µL) Ajout de la solution d'antigène marqué (100 µL) Mélange et incubation (24h à 4°C)	Réaction antigène-anticorps, par compétition
Ajout du charbon-dextran sous agitation (500 µL, 10 minutes à 0°C)	Piégeage des fractions libres F et F* (petites molécules)
Agitation et centrifugation (10 minutes à 4°C)	Séparation des fractions liées B et B* (surnageant) et du charbon (culot)
Prélèvement d'un volume défini de surnageant (500 µL)	Récupération des fractions liées
Ajout du liquide scintillant (1 mL)	Révélation de la radioactivité du tritium (hormone marquée)
Comptage de la radioactivité	Détermination de la quantité de fraction liée radioactive

Plusieurs informations sont nécessaires pour le bon déroulement du dosage :

(1) La gamme

Les points de la gamme d'étalonnage servent de référence. Elles permettront la lecture de la dose d'hormone « froide » dans l'échantillon, par interpolation de la droite d'étalonnage. Cette droite est établie à l'aide des solutions standards de l'hormone étudiée. Dans le cas de la corticostérone, la gamme s'étend généralement de 1000 à 3,9 pg/tube (intervalle déterminé en fonction des taux usuels observés chez les animaux étudiés).

(2) L'activité totale

Deux tubes « AT » sont exploités. Il s'agit d'hormone marquée, auquel s'ajoute du tampon PBS/BSA. Ces tubes ne subissent pas l'étape de séparation, et les anticorps n'y sont pas ajoutés ; ceci permet de mesurer l'activité totale de l'hormone marquée introduite (= F*+B*).

(3) L'activité non spécifique

Trois tubes dits « ANS » sont réalisés par ajout d'hormone marquée dans du tampon PBS/BSA, ainsi que du charbon, mais ils ne sont pas mis en présence d'anticorps. Sans anticorps, il ne se forme pas de complexes. La totalité de l'antigène radioactif devrait être adsorbée par le charbon, or il reste un peu de radioactivité dans le surnageant (relargage de l'ordre de 1 à 2%).

Il s'agit donc d'une activité qui n'est pas spécifique (= pas liée à l'anticorps), et donc présente dans tous les tubes : il faut systématiquement la soustraire dans chaque tube du dosage.

(4) Les références

Trois tubes « B0 » sont réalisés par ajout d'hormone radioactive et d'anticorps dans du tampon PBS/BSA. Cette mesure du point zéro de la gamme correspond alors à l'activité de l'hormone radioactive liée, en l'absence d'hormone froide.

Les tubes de la gamme, les tubes AT, ANS et B0 n'entrent dans la manipulation qu'à l'étape du dosage et ne subissent pas l'extraction.

- Caractéristiques : plages de mesures et coefficients de variation

Ici sont données les caractéristiques des mesures des hormones stéroïdiennes par radio-immunologie : les plages de mesures, ainsi que les coefficients de variation intra- et inter-assay.

Pour la corticostérone :

- plage de mesures : 0,28 à 60 ng/mL
- coefficient de variation intra-assay : 7,92%
- coefficient de variation inter-assay : 9,46%

Pour la progestérone :

- plage de mesures : 0,05 à 60 ng/mL
- coefficient de variation intra-assay : 5,71%
- coefficient de variation inter-assay : 13,54%

Pour la testostérone :

- plage de mesures : 0,39 à 60 ng/mL
- coefficient de variation intra-assay : 3,73%
- coefficient de variation inter-assay : non calculable car un seul dosage

I. 4. c. Dosage des métabolites plasmatiques par spectrophotométrie (glucose, protéines totales, calcium, cholestérol et triglycérides)

- Préparation et dilution des échantillons

Les échantillons conservés au congélateur sont décongelés environ une demi-heure avant les analyses.

Pour chaque échantillon, tout le plasma restant est utilisé (les prélèvements nécessaires au dosage des hormones ont été réalisés préalablement) ; les volumes disponibles varient entre 20 et 300 μL , en fonction du volume de sang initialement prélevé.

Afin que le volume soit suffisant pour le spectrophotomètre, une dilution est éventuellement réalisée avec de l'eau distillée : quelque soit le volume de plasma disponible, le volume final du prélèvement à tester est de 300 μL .

- Mesures spectrophotométriques

Les dosages des métabolites ont été effectués au laboratoire du CEBC. Ils ont été réalisés à l'aide d'un analyseur Pentra C200® (Horiba Medical, Montpellier, France), destiné à une utilisation en médecine humaine.

La technique utilisée est la spectrophotométrie, et se base sur des mesures colorimétriques.

L'échantillon est ainsi prélevé autant de fois qu'il y a de métabolites à doser. Chaque prélèvement d'échantillon est mis en présence d'un réactif spécifique au métabolite. Les réactions se déroulent dans des cuvettes maintenues à 37°C.

Un spectrophotomètre est utilisé pour la quantification de la réaction, via une mesure d'absorbance. Un rayon lumineux traverse l'échantillon, son intensité est réduite. La réduction de l'intensité lumineuse est liée à la longueur d'onde, la longueur du trajet du rayon lumineux et les caractéristiques de la solution (concentration et absorption molaire à cette longueur d'onde).

L'absorbance à une longueur d'onde spécifique (A_λ) d'une solution peut-être déduite de la mesure de l'intensité lumineuse du rayon à travers la solution (I), avec I_0 l'intensité lumineuse du rayon à travers l'air :

$$A_\lambda = - \log (I/I_0)$$

L'absorbance (A_λ) est proportionnelle à la concentration (c), avec ϵ_λ l'absorption molaire et L la longueur du trajet :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \times L \times c$$

La concentration de l'échantillon peut ainsi être déterminée pour chaque métabolite étudié.

- Caractéristiques : plages de mesures et coefficients de variation

Ici sont données les caractéristiques des mesures réalisées par spectrophotométrie : les plages de mesures, ainsi que les coefficients de variation intra- et inter-assay.

Pour le glucose :

- plage de mesures : 4,51-5,83 mmol/L
- coefficient de variation intra-assay (jour 1) : 1,60%
- coefficient de variation intra-assay (jour 2) : 2,13%
- coefficient de variation intra-assay (jour 3) : 0,43%
- coefficient de variation intra-assay (jour 4) : 1,60%
- coefficient de variation inter-assay : 3,21%

Pour les protéines totales :

- plage de mesures : 58-72,4 g/L
- coefficient de variation intra-assay (jour 1) : 0,34%
- coefficient de variation intra-assay (jour 2) : 1,48%
- coefficient de variation intra-assay (jour 3) : 1,84%

- coefficient de variation intra-assay (jour 4) : 2,06%
- coefficient de variation inter-assay : 1,96%

Pour le calcium :

- plage de mesures : 1,86-2,40 mmol/L
- coefficient de variation intra-assay (jour 1) : 1,59 %
- coefficient de variation intra-assay (jour 2) : 1,55%
- coefficient de variation intra-assay (jour 3) : 1,99%
- coefficient de variation intra-assay (jour 4) : 2,29%
- coefficient de variation inter-assay : 10,27%

Pour le cholestérol :

- plage de mesures : 2,17-2,77 mmol/L
- coefficient de variation intra-assay (jour 1) : 0,95%
- coefficient de variation intra-assay (jour 2) : 3,89%
- coefficient de variation intra-assay (jour 3) : 7,92%
- coefficient de variation intra-assay (jour 4) : 2,40%
- coefficient de variation inter-assay : 4,01%

Pour les triglycérides :

- plage de mesures : 1,09-1,45 mmol/L
- coefficient de variation intra-assay (jour 1) : 0,56%
- coefficient de variation intra-assay (jour 2) : 0,56%
- coefficient de variation intra-assay (jour 3) : 6,96%
- coefficient de variation intra-assay (jour 4) : 2,43%
- coefficient de variation inter-assay : 4,04%

I. 5. Etudes statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica (StatSoft, Inc.). Les comparaisons entre les mesures de glycémie faites au glucomètre et au spectrophotomètre, ainsi qu'entre les taux de glucose et de corticostérone, ont été effectuées par régression linéaire.

Pour les autres études : l'évolution de la corticostérone et du glucose après exposition à un stress, l'influence du sexe sur les taux de glucose et de corticostérone, l'impact du stress sur les taux circulants des hormones sexuelles et des métabolites, nous avons utilisé des tests ANOVA et ANOVA à mesures répétées.

II. Résultats et discussion

Ainsi, plusieurs questions ont été soulevées.

D'un point de vue méthodologique, est-il possible, à la place de mesures réalisées par spectrophotomètre, d'utiliser un glucomètre simple destiné initialement à un usage de suivi de diabète ? Est-il envisageable, dans le cadre de cette utilisation, de ne plus réaliser systématiquement une prise de sang intracardiaque, mais de se contenter d'une ponction de capillaire ?

Le glucose est-il fiable en tant que marqueur de stress ? Est-il « meilleur » marqueur que la corticostérone, considérée jusqu'à présent comme l'hormone de référence pour l'étude de la réponse au stress ?

Et enfin, est-il possible d'observer, tout au long de la période de reproduction, sur les hormones sexuelles (progestérone, testostérone) et sur des marqueurs choisis (protéines totales, calcium, cholestérol et triglycérides), une variation lors de stress ?

Ce sont ces questions auxquelles nous allons tenter de répondre ici.

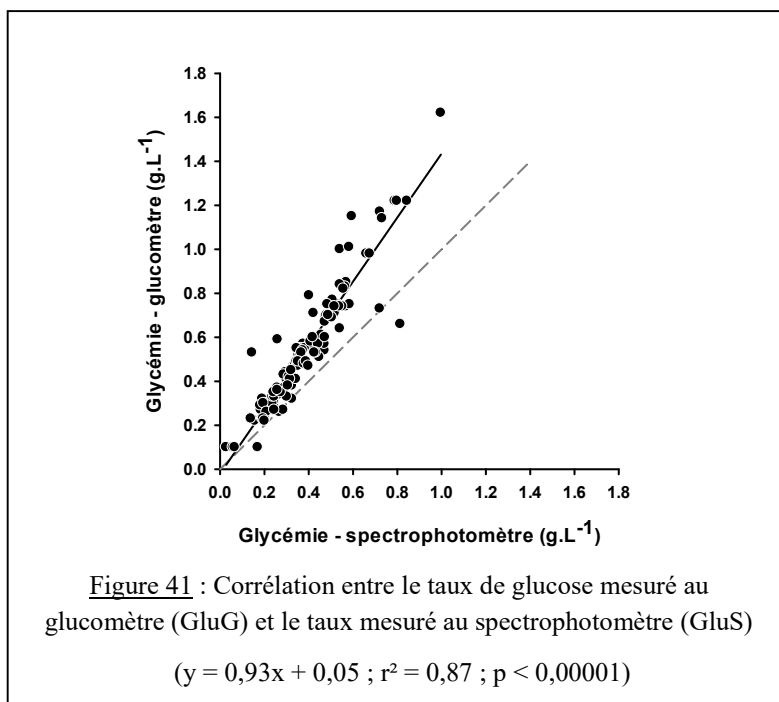
II. 1. Comparaison des mesures de glucose (spectrophotomètre vs. glucomètre)

Etant donné le faible taux de réussite obtenu pour les prises de sang périphérique, les résultats obtenus n'ont pas été exploités.

Afin de comparer les mesures de glycémie effectuées au spectrophotomètre et celles effectuées avec le glucomètre, toutes les valeurs récoltées ont été comparées (N = 115). Chaque prélèvement a été dosé avec les deux techniques. Cet échantillon comprend donc des mesures prises plusieurs fois sur le même individu (niveau basal puis après trente minutes).

On observe une très forte corrélation entre les deux types de mesures avec une valeur très élevée du coefficient de corrélation ($r = 0,95$) et bien sûr une valeur très significative de p ($p < 0,001$). La relation est linéaire, il est possible d'estimer 87% ($r^2 = 0,87$) de la variance d'une mesure à partir des valeurs de l'autre. Donc les valeurs obtenues par le glucomètre sont tout à fait comparables avec les mesures réalisées au spectrophotomètre (Figure 41).

Le glucomètre peut donc tout à fait être utilisé pour mesurer la glycémie chez la vipère aspic : il donnera des valeurs fiables.



Il semblerait cependant qu'il surestime ($b = 0,93$) la valeur de la glycémie ($\text{GluG}_{\text{max}} = 1,62 \text{ g/L}$ vs. $\text{GluS}_{\text{max}} = 0,99 \text{ g/L}$), en supposant que le spectrophotomètre donne des valeurs plus exactes.

D'autre part, son seuil de détection de $0,20 \text{ g/L}$ n'est pas suffisamment bas pour détecter la glycémie chez certains individus ($N = 3 < 0,20 \text{ g/L}$) alors que le spectrophotomètre peut mesurer des valeurs très basses ($\text{GluS}_{\text{min}} = 0,02 \text{ g/L}$). Ainsi, le glucomètre ne sera pas adapté pour toutes les situations, par exemple pour des suivis en période d'hibernation (la glycémie durant cette période se trouvant autour de $0,1 \text{ g/L}$; Bonnet et Naulleau 1993).

Dans les valeurs hautes, bien que nous n'ayons pas obtenu de valeurs supérieures à 2 g/L , le glucomètre peut mesurer des valeurs jusqu'à $7,5 \text{ g/L}$.

En conclusion, nous pouvons donc dire que le glucomètre est parfaitement utilisable en routine et sur le terrain, dans la majorité des circonstances, notamment pour étudier les réponses au stress.

Par la suite, nous utilisons les valeurs de glycémie mesurées au spectromètre.

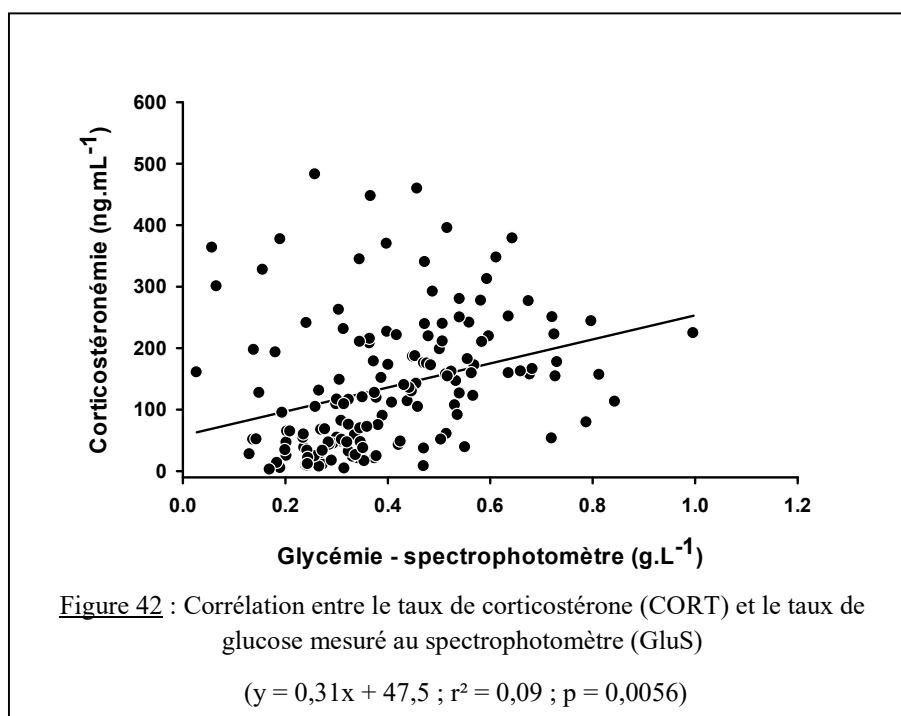
II. 2. Le glucose, marqueur de stress comparable à la corticostérone ?

II. 2. a. Relation entre les taux de glucose et de corticostérone

Dans un premier temps, nous avons essayé d'établir s'il existait une relation entre les taux de corticostérone et les taux de glucose.

On observe qu'il existe une relation très significative ($p = 0,0056$) mais faible entre ces deux éléments (Figure 42), ce qui se manifeste par une faible valeur du coefficient de corrélation ($r^2 = 0,09$). Cela signifie que les valeurs de corticostérone et de glucose ne sont pas indépendantes, mais il n'est pas possible de déduire les valeurs de l'un à partir de l'autre. Cela peut s'expliquer en partie par le fait que le taux de glucose circulant n'est pas uniquement dépendant de la corticostérone, mais de bien d'autres facteurs (par exemple, les catécholamines entraînent également une mobilisation du glucose).

Il est donc nécessaire de les étudier séparément, en particulier afin de déterminer si le glucose peut servir de marqueur de la réponse au stress.

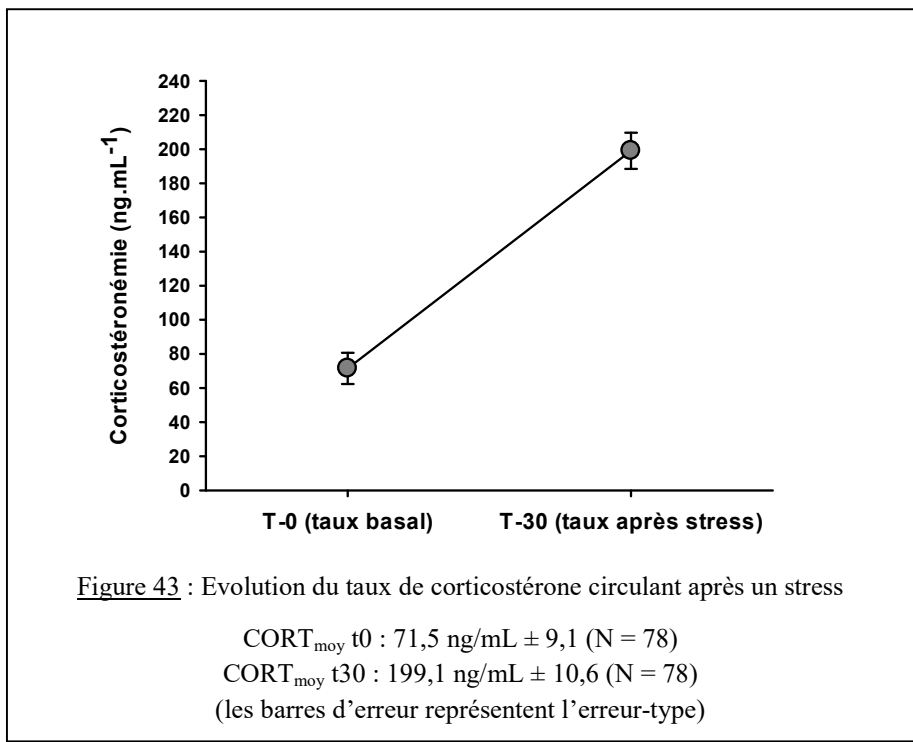


II. 2. b. Evolution de la corticostérone après exposition à un stress

Tous les prélèvements ont été inclus, quelque soit la période de prélèvement, le sexe, l'origine ou le statut de l'animal. On a donc 156 échantillons : 78 pour t0 et 78 pour t30 ; les 28 animaux ont été prélevés plusieurs fois (Figure 43).

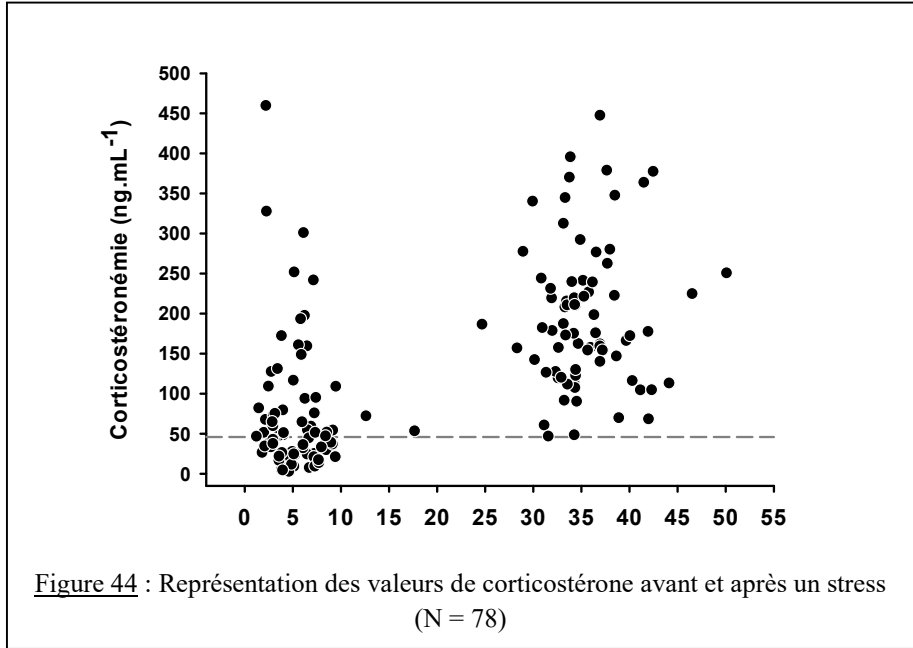
Le taux de corticostérone est basal avant le stress ($Cort_{0_{moy}} = 71,5 \text{ ng/mL} \pm 9,1$). La corticostéronémie est augmentée trente minutes après un stress ($Cort_{30_{moy}} = 199,1 \text{ ng/mL} \pm 10,6$). Cette augmentation est significative ($p = 0,001$).

Ces résultats sont donc comparables avec les connaissances préalables sur la réponse au stress chez la vipère aspic (cf. supra ; Bonnet et al. 2013 ; Bonnet, données non publiées).



D'autre part, nous nous sommes posé la question de savoir s'il existait une valeur-seuil en-dessous de laquelle il est possible de considérer l'animal comme « non stressé ». Pour cela, toutes les valeurs ont été placées sur un graphe en fonction du temps depuis la capture initiale (Figure 44).

Le nuage de gauche présente les prélèvements à t0, tandis que le nuage de droite correspond aux prélèvements après stress (t30). La dispersion dans le temps observée s'explique par le temps nécessaire à la prise de sang, plus ou moins long selon les animaux.



On remarque qu'il y a effectivement une valeur en dessous de laquelle les animaux exposés à un stress aigu ne se trouvent pas. Selon les valeurs de corticostérone obtenues

(données brutes), cette valeur-seuil peut se fixer à 46 ng/mL. Il semblerait que l'on puisse considérer qu'un animal dont la corticostéronémie se situe en dessous de cette valeur est un animal qui n'a pas été récemment soumis à un stress.

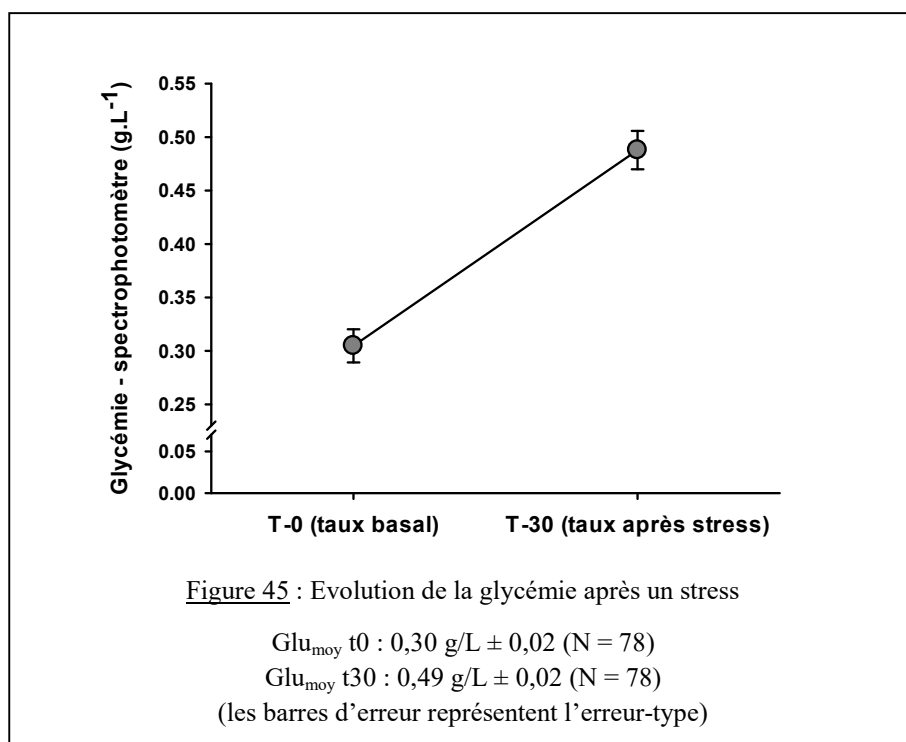
Cependant, pour des valeurs de corticostéronémie se situant au-dessus de ce seuil, il est impossible de faire la différence entre un animal « non stressé » (dans la mesure de nos observations et de nos conditions d'élevage) et un animal ayant subi un stress.

Toutefois, la forte dispersion des valeurs suggère une importante contribution individuelle et incite à ne pas sur-interpréter des résultats isolés.

II. 2. c. Evolution du glucose après exposition à un stress

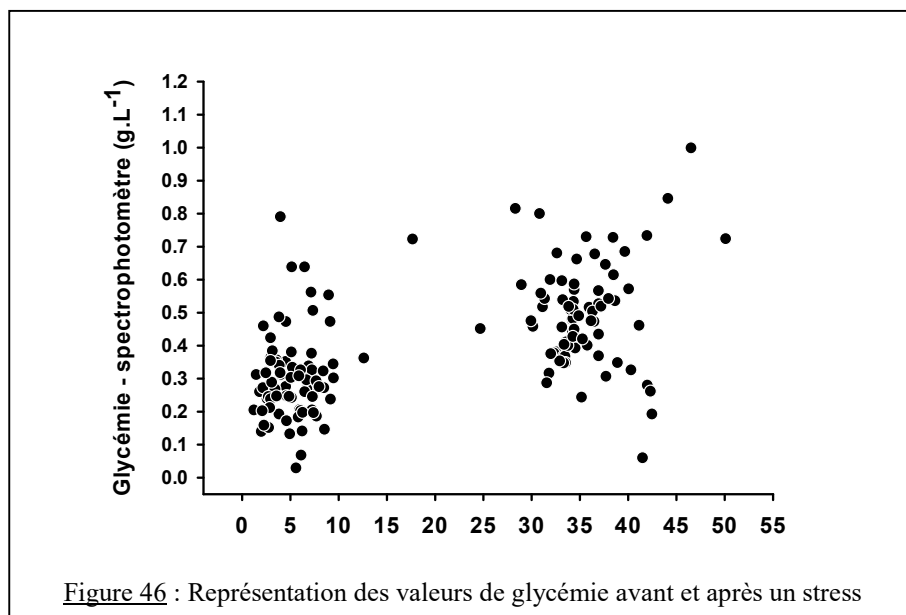
Tous les prélèvements ont été inclus, quelque soit le sexe, l'origine ou le statut de l'animal (N = 156 sur 28 animaux). Il s'agit des mesures réalisées au spectrophotomètre.

On observe le même profil que celui de la corticostérone (Figure 45) : une franche augmentation après la stimulation ($p = 0,0001$). La glycémie, initialement autour de 0,3 g/L ($Gly0_{moy} = 0,30 \text{ g/L} \pm 0,02$), augmente très fortement et se retrouve autour de 0,5 g/L ($Gly30_{moy} = 0,49 \text{ g/L} \pm 0,02$).



Le glucose peut donc tout à fait être utilisé comme marqueur dans le cas d'un suivi de stress.

Comme avec la corticostérone, nous nous sommes posé la question de l'existence d'un seuil permettant d'identifier de manière fiable un individu non stressé. Suivant le même principe (toutes les mesures ont été reportées sur un graphe), la répartition des valeurs de la glycémie est présentée sur un graphe (Figure 46).



On observe ici que la forte variabilité interindividuelle fait qu'une valeur isolée ne peut pas être considérée comme interprétable. Il est ainsi impossible, avec une unique valeur de glycémie obtenue à un temps t , de déterminer l'état de stress d'un animal. En effet, certains animaux, même après un stress, ont des valeurs de glycémie très basses.

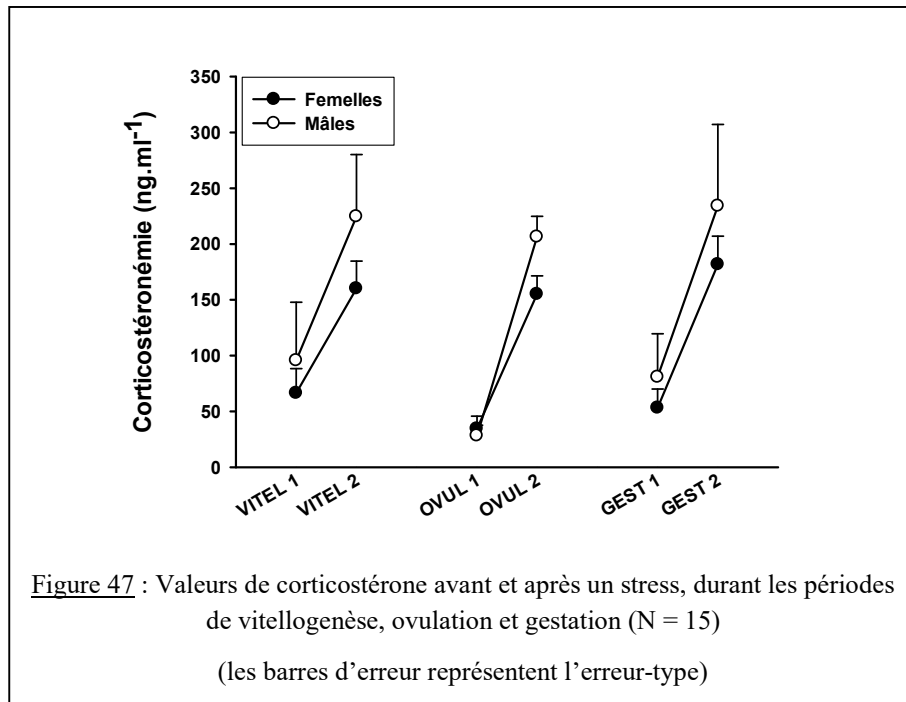
II. 3. Influence du sexe sur la réponse au stress

Afin d'étudier une éventuelle influence du sexe sur la réponse au stress, des comparaisons entre les taux de glucose et de corticostérone ont été effectuées. Cette comparaison s'effectue sur les trois premières périodes : vitellogenèse/accouplement, ovulation/fécondation et gestation. Les prises de sang post-partum sont ici laissées de côté, car réalisées seulement sur les femelles.

II. 3. a. Influence du sexe sur le taux de corticostérone

Le graphe ci-dessous présente les valeurs moyennes successives obtenues pour la corticostérone aux trois phases étudiées selon le sexe (Figure 47). A chaque période est mesuré le taux basal puis le taux après stress.

Les deux sexes suivent des profils proches (pas d'interaction entre la période et le sexe de l'animal, $p = 0,70$), avec à chaque fois une réponse au stress significative. Les valeurs de corticostérone ne sont pas significativement différentes entre les mâles et les femelles ($p = 0,25$).

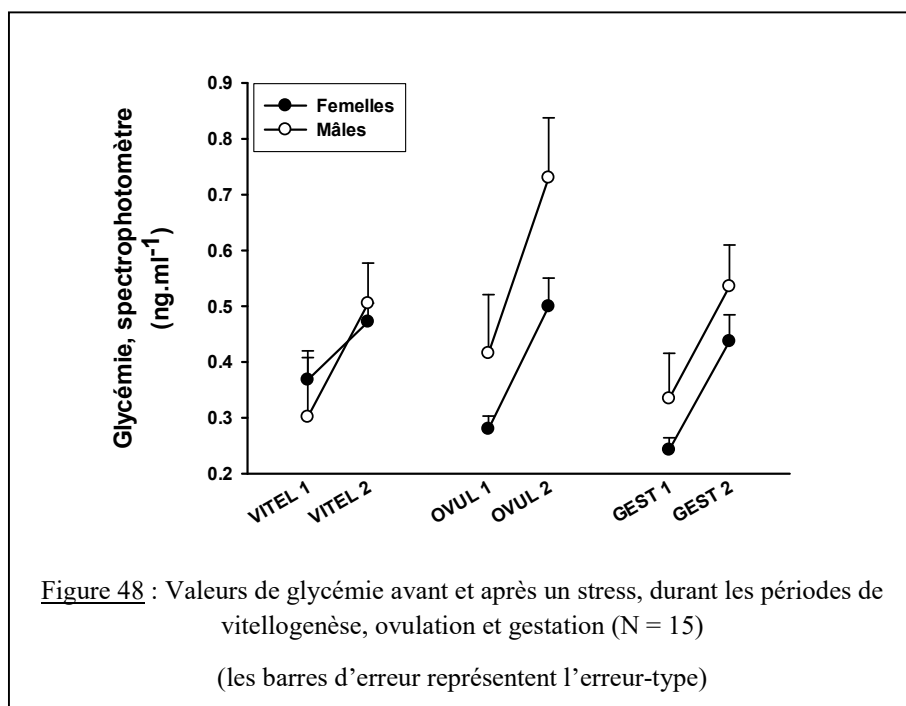


II. 3. b. Influence du stress sur le taux de glucose

Le graphe ci-dessous présente les valeurs moyennes successives obtenues pour la glycémie aux trois phases étudiées selon le sexe (Figure 48). A chaque période est mesuré le taux basal puis le taux après stress.

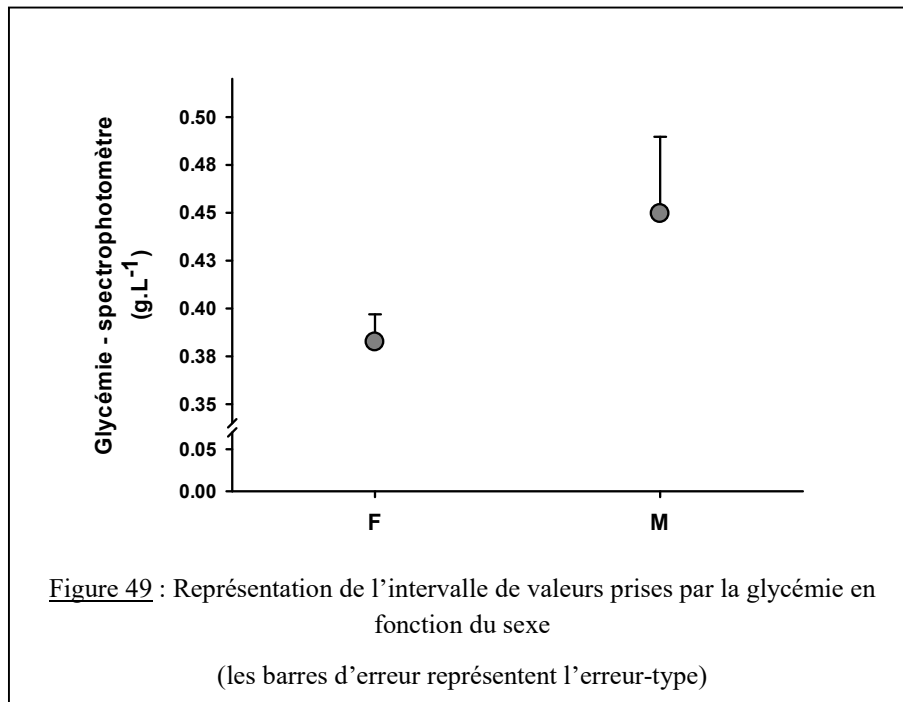
L'allure est assez similaire pour le glucose et pour la corticostérone.

Les deux sexes suivent des profils proches (pas d'interaction entre la période et le sexe de l'animal, $p = 0,25$), avec à chaque fois une réponse au stress significative.



Les fluctuations au cours du temps sont bien présentes de manière comparable chez les deux sexes. On observe un profil similaire de l'évolution de la corticostéronémie (Figure 47) et de la glycémie (Figure 48) chez les mâles et les femelles suite à un stress aigu.

Il est intéressant de noter que les valeurs de glycémie sont significativement plus élevées chez les mâles. En effet, les valeurs du glucose sont plus élevées chez les mâles lorsqu'on ne considère que ce facteur dans l'analyse ($p = 0,009227$; Figure 49).

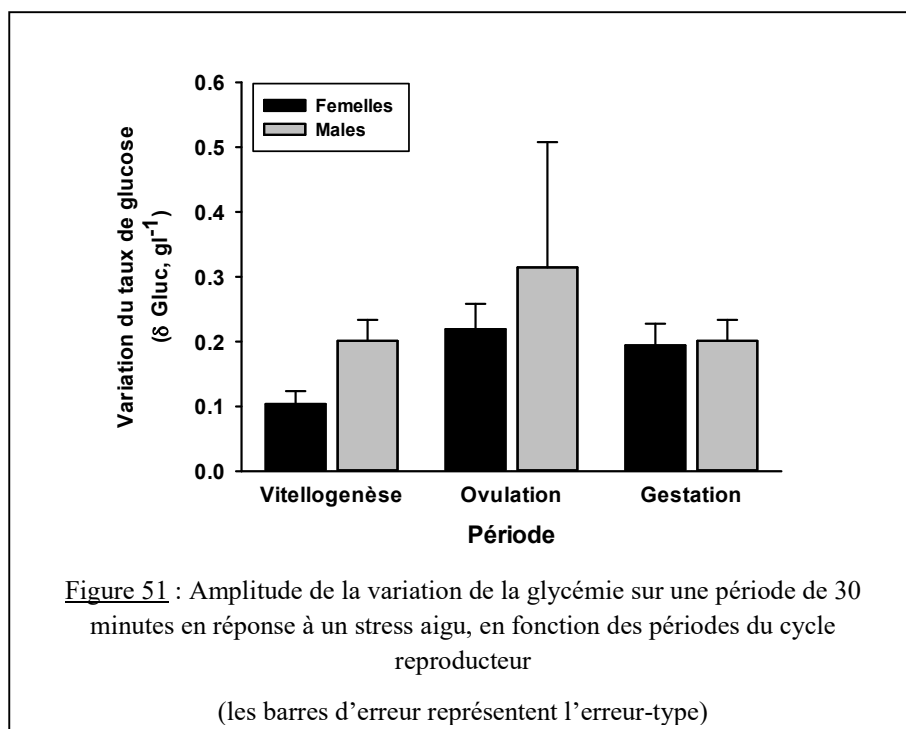
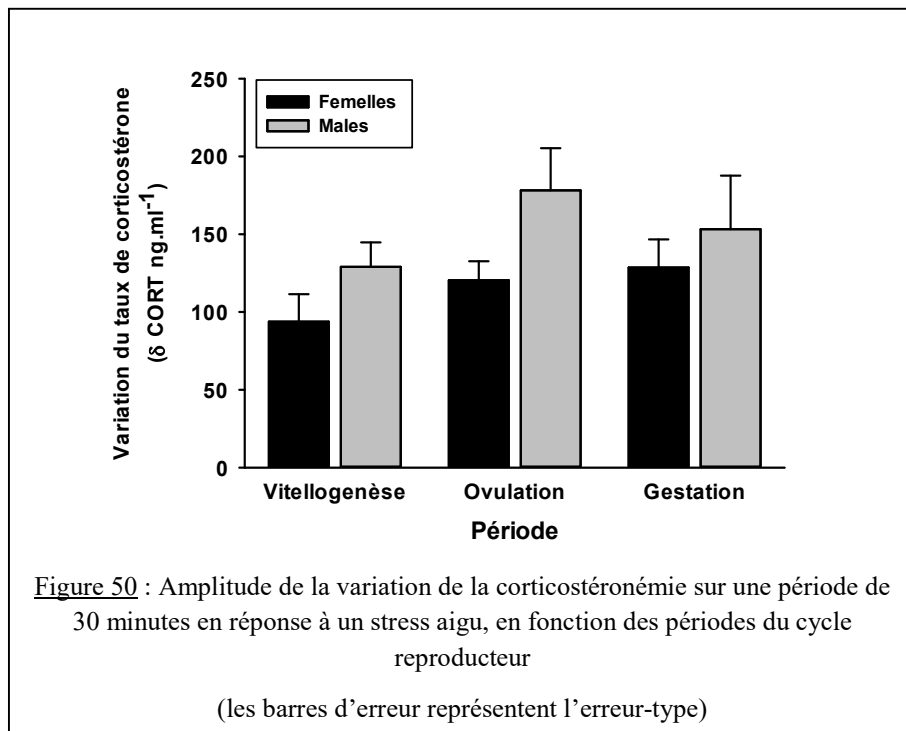


Cette observation est intéressante, car un peu contre-intuitive. En effet, l'hypothèse initiale aurait été que les femelles présentent une glycémie plus élevée, en particulier les reproductrices, la mobilisation des réserves pour supporter la vitellogenèse entraînant une augmentation du taux de glucose circulant.

II. 3. c. Comparaison de l'amplitude de la réponse au stress

Nous nous sommes également posé la question de savoir si le sexe a une influence sur l'importance de la réponse au stress : l'amplitude des variations des marqueurs de stress est-elle plus marquée chez un sexe ? Pour cela nous avons simplement examiné la différence entre le taux basal et le taux après stress aigu. Cette analyse est proche des précédentes, moins robuste sur le plan statistique (une seule valeur est obtenue à partir de deux, d'où diminution de la puissance) mais elle donne une vision plus simple.

L'amplitude de la réponse est la même chez les deux sexes : les mâles, qui ont des valeurs systématiquement un peu plus élevées que les femelles, ne réagissent cependant pas de manière plus forte à un stress aigu et ce quelle que soit la période considérée (Figure 50 et Figure 51).



Des analyses supplémentaires chez les femelles ont permis de dégager un effet significatif mais assez faible du statut reproducteur (reproductrice vs non reproductrices) en fonction de la période (Bonnet, communication personnelle). Après parturition, les réponses au stress ressemblent fortement à celles observées au cours des autres périodes. Nous n'avons pas détecté d'effet de la captivité (femelles issues de la colonie du CEBC vs femelles récemment capturées sur le terrain).

II. 4. Impact du stress sur les taux des métabolites marqueurs de la gestation

L'étude des marqueurs de la gestation s'est portée sur quatre métabolites : le calcium, le cholestérol, les triglycérides et les protéines totales.

Le suivi de ces métabolites au cours des quatre périodes a révélé des profils identiques à ceux présentés dans la partie bibliographique, avec de nettes différences de taux entre les femelles reproductrices et les femelles non reproductrices (Bonnet et al. 1992, 1994). Les taux chez les mâles sont comparables à ceux des femelles non reproductrices.

Les métabolites ont été étudiés en fonction de la réponse au stress (tous groupes confondus), et il n'a pas été observé de différence significative entre les taux basaux et les taux après stress.

Pour le calcium, on passe ainsi de 3,06 $\mu\text{mol/L}$ ($\pm 0,34$) à 2,87 $\mu\text{mol/L}$ ($\pm 0,24$).

Pour les protéines totales, on passe de 43,94 g/L ($\pm 1,47$) à 47,11 g/L ($\pm 1,36$).

Pour le cholestérol, on passe de 9,92 mmol/L ($\pm 0,56$) à 10,40 mmol/L ($\pm 0,56$).

Pour les triglycérides, on passe de 2,20 mmol/L ($\pm 0,36$) à 2,26 mmol/L ($\pm 0,35$).

D'autres analyses ont été faites, en fonction du sexe ou le statut de l'animal (Bonnet, communication personnelle) et aucun métabolite ne présente de modification de sa concentration circulante suite à l'augmentation de corticostérone. Un stress aigu, dans la limite de la demi-heure étudiée, n'a donc pas d'impact sur les concentrations de ces métabolites.

II. 5. Impact du stress sur les taux circulants des hormones sexuelles

L'un des objectifs de cette étude expérimentale était d'objectiver une potentielle modification des taux d'hormones sexuelles circulants après un stress.

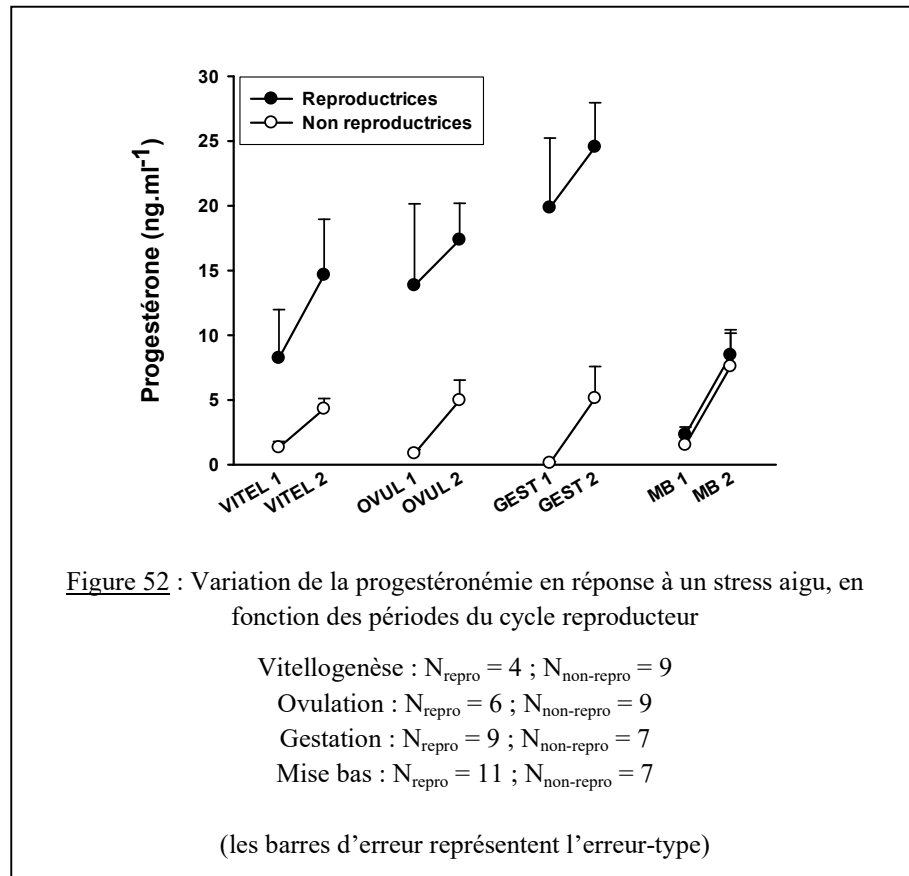
II. 5. a. En fonction du statut chez la femelle

Le taux de progestérone a été mesuré sur les quatre périodes étudiées, avant et après un stress (Figure 52).

Les taux de progestérone sont très différents chez les femelles reproductrices et chez les femelles non reproductrices jusqu'à la mise bas (respectivement pour les trois périodes vitellogénèse, ovulation et gestation : $p = 0,012$; $p = 0,012$ et $p = 0,0007$), ce qui est cohérent avec les données bibliographiques (Bonnet 1996). Chez les femelles reproductrices, la progestéronémie augmente au fur et à mesure de l'avancée dans la vitellogénèse et la

gestation. Suite à la mise bas, elle s'effondre et retrouve un taux basal, comparable à celui des femelles non reproductrices ($p = 0,65$).

D'autre part, les taux de progestérone sont modifiés suite au stress : les concentrations circulantes augmentent, aussi bien chez les femelles reproductrices que chez les femelles non reproductrices. L'augmentation est significative lors de la vitellogenèse et en post-partum (respectivement pour les deux périodes : $p = 0,0063$ et $p = 0,00042$). Elle est moins marquée pour les périodes d'ovulation et de gestation (respectivement $p = 0,076$ et $p = 0,11$).



Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer cette augmentation.

Tout d'abord, nous avons pensé à un problème de mesure dû à la RIA, avec la possibilité d'une réaction croisée entre les anticorps anti-progestérone et la corticostérone présente en grande quantité après un stress. Or, le taux de croisement n'est que de 0,3% (information donnée par le fournisseur) ; il est donc peu probable que les variations soient expliquées ainsi.

Nous avons donc réfléchi à une explication physiologique. Il semble peu probable que l'origine de cette progestérone soit lutéale ; l'augmentation se retrouve à la fois chez les femelles reproductrices, mais également chez les non reproductrices, qui n'ont *a priori* pas de corps jaune. Mais il est possible que la progestérone produite soit le sous-produit d'une autre réaction physiologique. En effet, les glandes surrénales produisent, à partir du cholestérol, de la progestérone. Comme celles-ci sont stimulées en cas de stress, il serait possible que la production de progestérone se retrouve également augmentée.

Il est également envisageable qu'il s'agisse d'une vraie réaction face à un stress. Dans le cas où la femelle n'est pas engagée dans un processus reproducteur, cette réponse n'a pas réellement d'intérêt. Mais dans le cas où la femelle est reproductrice, il est possible que cette augmentation aide à renforcer la vitellogenèse et la gestation face aux effets délétères des glucocorticoïdes.

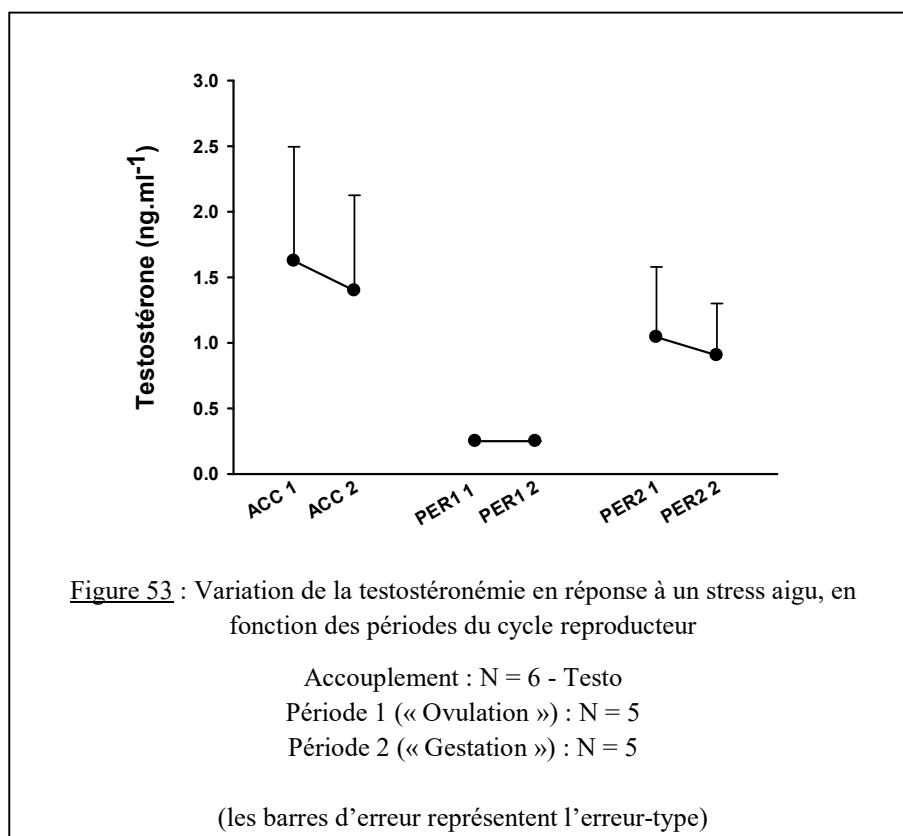
En conclusion, il est important de tenir compte de l'état de stress lors d'un suivi de progestéronémie, car il existe effectivement un impact sur ses valeurs.

II. 5. b. Chez les mâles

Chez les mâles, l'étude n'a pu être menée que sur un nombre restreint d'animaux (5 ou 6 selon les périodes), ce qui limite l'interprétation des résultats (Figure 53).

On observe d'abord que les taux de testostérone sont très bas, même en période d'accouplement. Cela peut s'expliquer par le fait que cette période d'accouplement a été relativement tardive, et le pic de testostérone normalement observé à cette période (Naulleau et al. 1987) était probablement passé et donc non détectable.

D'autre part, il est possible de voir que la testostéronémie n'évolue pas après un stress. Contrairement à ce qui a été observé chez les femelles, même non reproductrices, la concentration de la testostérone circulante reste stable.



Cette observation est intéressante, et il paraît étonnant que la testostérone, qui peut, comme la progestérone, être produite par les glandes surrénales (Aldridge et Sever 2011), ne réagisse pas de manière identique à cette dernière. On aurait pu s'attendre à un profil

identique à celui des femelles non reproductrices. Cependant, les données bibliographiques disponibles chez le serpent-jarretière *Thamnophis sirtalis* vont dans le sens de nos observations : la corticostéronémie ne semble pas avoir d'impact sur le taux circulant de testostérone (Moore et Mason 2001 ; Lutterschmidt et al. 2004).

Néanmoins, la taille de l'échantillon représente une limite non négligeable, et il serait intéressant d'effectuer de nouvelles études sur un plus grand nombre d'animaux, capturés sur le terrain si possible et en commençant plus tôt dans l'année.

CONCLUSION

La première partie de cette thèse, consacrée à la physiologie de la vipère aspic, rassemble l'essentiel des données que l'on peut trouver sur la reproduction et sur la réponse au stress chez cette espèce.

La seconde partie, suivant une approche éco-physiologique, présente des résultats intéressants et des données supplémentaires sur le stress et l'impact de celui-ci sur l'organisme de cette espèce de serpent.

Il a été confirmé que la corticostérone est le marqueur de référence pour étudier le stress chez la vipère aspic. Le glucose est un bon marqueur de stress, et, malgré le fait qu'une valeur isolée ne donne pas d'information interprétable, il peut parfaitement être utilisé dans le cadre d'un suivi.

La mesure de la glycémie peut se faire de deux manières : soit par spectrophotométrie, soit par coulométrie via un glucomètre portable pratique d'utilisation. Les résultats donnés par cet appareil sont fiables ; sa limite réside dans le fait qu'il ne détecte pas une glycémie inférieure à 0,20 g/L, ce qui se trouve régulièrement chez les reptiles.

Un stress n'a pas d'impact sur les quatre métabolites marqueurs de la reproduction étudiés (calcium, cholestérol, triglycérides et protéines totales). Cependant, l'effet du stress est présent sur les taux circulants de progestérone : il y a une augmentation post-stress. Aucun impact sur la testostéronémie n'a pas été mis en évidence, mais l'échantillon de mâles était peut-être insuffisant.

Ces données peuvent être ajoutées à la fois aux connaissances sur une espèce française protégée, mais pourraient éventuellement aussi être appliquées à des élevages d'autres Vipéridés, dans le cadre par exemple d'une espèce en voie de disparition, dont la reproduction est difficile en captivité.

Bien que des informations aient été tirées de ces résultats, une suite à ces travaux peut être envisagée. Tout d'abord, il serait profitable, d'un point de vue méthodologique, de continuer les essais faits pour trouver un moyen de ne prélever qu'une très petite quantité de sang (une goutte). Cela pourrait se coupler à une utilisation du glucomètre sur le terrain, afin d'avoir une idée immédiate et plus précise du statut des animaux en conditions naturelles. Cet outil peut *a priori* être utilisé sur d'autres espèces.

Il pourrait être envisagé de renouveler les dosages de testostérone sur un lot plus important de mâles, afin de confirmer ou d'infirmer la tendance observée : les taux de testostérone ne seraient pas impactés par un stress (cette observation reste relativement opposée à toutes les données bibliographiques).

L'étude d'un stress chronique pourrait également être intéressante, en particulier si l'on considère l'échec de la reproduction en captivité observé ici. Cependant, il se pose alors des questions éthiques sur le maintien d'animaux stressés en permanence.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **Sylvie CHASTANT**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LABIDALLE Chloé** intitulée « **Liens entre stress et reproduction chez la vipère aspic *Vipera aspis* : impact d'un stress aigu sur les hormones sexuelles et sur les métabolites marqueurs de la reproduction.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 20 novembre 2015
Professeur Sylvie CHASTANT
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Gérard CAMPISTRON



Vu et autorisation de l'impression :
Administrateur Provisoire de
l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Amal SAYAH



L'Administrateur Provisoire



Amal SAYAH

Mlle **LABIDALLE Chloé**
a été admis(e) sur concours en : 2010
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 26/06/2014
a validé son année d'approfondissement le : 24/09/2015
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

ALCOBENDAS, M., BAUD, C. A. et CASTANET, J., 1991. Structural changes of the periosteocytic area in *Vipera aspis* (L.) (Ophidia, Viperidae) bone tissue in various physiological conditions. *Calcified Tissue International*. Vol. 49, n° 1, p. 53–57.

ALCOBENDAS, M., 1989. *Recherches sur le métabolisme phosphocalcique au cours du cycle annuel et du cycle de la reproduction chez un reptile, Vipera aspis (L.)*. Thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliquées. Paris 7.

ALDRIDGE, R. D. et SEVER, D. M. (éd.), 2011. *Reproductive biology and phylogeny of snakes*. Enfield (Angleterre) : CRC Press. ISBN 978-1-57808-701-3.

AUBRET, F., BONNET, X., SHINE, R. et LOURDAIS, O., 2002. Fat is sexy for females but not males : the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). *Hormones and Behavior*. Vol. 42, n° 2, p. 135–147.

BAST, R. E. et GIBSON, A. R., 1985. Characterization of reptilian vitellogenin : subunit composition and molecular weights of vitellogenin from the Colubrid snake *Thamnophis sirtalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 80B, n° 3, p. 409–418.

BAUCHOT, R., BON, C., DAVID, P. et GASC, J.-P., 2005. *Serpents*. Paris (France) : Editions Artémis. ISBN 978-2-84416-410-0.

BELLIURE, J., MEYLAN, S. et CLOBERT, J., 2004. Prenatal and postnatal effects of corticosterone on behavior in juveniles of the common lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 301A, n° 5, p. 401–410.

BLACKBURN, D. G. et VITT, L. J., 1992. Reproduction in Viviparous South American Lizards of the Genus *Mabuya*. In : *Reproductive Biology of South American Vertebrates*. New York, NY (USA) : Springer. p. 150-164. ISBN 978-1-4612-7701-9.

BLACKBURN, D. G., 1998. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 282, n° 4-5, p. 560–617.

BLUHM, A. P. C., TOLEDO, R. A., MESQUITA, F. M., PIMENTA, M. T., FERNANDES, F. M. C., RIBELA, M. T. C. P. et LAZARI, M. F. M., 2004. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the snake Follicle-Stimulating Hormone receptor. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 137, n° 3, p. 300–311.

BONNET, X., AKOKA, S., SHINE, R. et POURCELOT, L., 2008. Disappearance of eggs during gestation in a viviparous snake (*Vipera aspis*) detected using non-invasive techniques. *Acta Herpetologica*. Vol. 3, n° 2, p. 129–137.

BONNET, X., FIZESAN, A. et MICHEL, C. L., 2013. Shelter availability, stress level and digestive performance in the aspic viper. *Journal of Experimental Biology*. Vol. 216, n° 5, p. 815–822.

BONNET, X., NAULLEAU, G., BRADSHAW, D. et SHINE, R., 2001. Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake *Vipera aspis*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 121, n° 1, p. 84–94.

- BONNET, X., NAULLEAU, G. et MAUGET, R., 1992. Cycle sexuel de la femelle de *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae) : importance des réserves et aspects métaboliques. *Bulletin de la Société Zoologique de France*. Vol. 117, p. 279–290.
- BONNET, X., NAULLEAU, G. et MAUGET, R., 1994. The influence of body condition on 17-beta estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 93, n° 3, p. 424–437.
- BONNET, X., NAULLEAU, G., SHINE, R. et LOURDAIS, O., 2001. Short-term versus long-term effects of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*. Vol. 92, n° 2, p. 297–308.
- BONNET, X. et NAULLEAU, G., 1993. Relations entre la glycémie et l'activité saisonnière chez *Vipera aspis* (L.). *Amphibia-Reptilia*. Vol. 14, n° 3, p. 295–306.
- BONNET, X. et NAULLEAU, G., 1994. Utilisation d'un indice de condition corporelle (BCI) pour l'étude de la reproduction chez les serpents. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*. Vol. 317, n° 1, p. 34–41.
- BONNET, X., 1996. *Gestion des réserves corporelles et stratégie de reproduction chez la vipère aspic, Vipera aspis*. Thèse de doctorat en Sciences. Université de Lyon I.
- BRADSHAW, S. D., 1987. *Ecophysiology of desert Reptiles*. 1st edition. Sydney et Orlando (Australie) : Academic Press. ISBN 978-0-12-124575-7.
- CALLARD, I. P., FILETI, L. A., PEREZ, L. E., SORBERA, L. A., GIANNOUKOS, G., KLOSTERMAN, L. L., TSANG, P. et MCCRACKEN, J. A., 1992. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *American Zoologist*. Vol. 32, n° 2, p. 264–275.
- CALLARD, I. P., RILEY, D. et PEREZ, L., 1990. Vertebrate vitellogenesis : molecular model for multihormonal control of gene regulation. *Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 342, p. 343–348.
- CARSIA, R. V. et JOHN-ALDER, H., 2003. Seasonal alterations in adrenocortical cell function associated with stress-responsiveness and sex in the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Hormones and Behavior*. Vol. 43, n° 3, p. 408–420.
- CARTLEDGE, V. A. et JONES, S. M., 2007. Does adrenal responsiveness vary with sex and reproductive status in *Egernia whitii*, a viviparous skink? *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 150, n° 1, p. 132–139.
- CREE, A., TYRRELL, C. L., PREEST, M. R., THORBURN, D. et GUILLETTE JR, L. J., 2003. Protecting embryos from stress : corticosterone effects and the corticosterone response to capture and confinement during pregnancy in a live-bearing lizard (*Hoplodactylus maculatus*). *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 134, n° 3, p. 316–329.
- CREEL, S., 2001. Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology & Evolution*. Vol. 16, n° 9, p. 491–497.
- CREWS, D., 1974. Effects of group stability, male-male aggression, and male courtship behaviour on environmentally-induced ovarian recrudescence in the lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of Zoology*. Vol. 172, n° 4, p. 419–441.

- DE FRAIPONT, M., CLOBERT, J., JOHN-ALDER, H. et MEYLAN, S., 2000. Increased pre-natal maternal corticosterone promotes philopatry of offspring in common lizards *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology*. Vol. 69, n° 3, p. 404–413.
- DENARDO, D. F. et LICHT, P., 1993. Effects of corticosterone on social behavior of male lizards. *Hormones and Behavior*. Vol. 27, p. 184–199.
- DENARDO, D. F., 2005. Stress in captive reptiles. In : *Reptile Medicine and Surgery*. 2nd edition. Philadelphie, PA (USA) : Saunders. ISBN 978-0-7216-9327-9.
- DESAN, P. H., LOPEZ, K. H., AUSTIN, H. B. et JONES, R. E., 1992. Asymmetric metabolism of hypothalamic catecholamines alternates with side of ovulation in a lizard (*Anolis carolinensis*). *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 262, n° 1, p. 105–112.
- DESSAUER, H. C. et FOX, W., 1959. Changes in ovarian follicle composition with plasma levels of snakes during estrus. *The American Journal of Physiology*. Vol. 197, p. 360–366.
- DUNLAP, K. D. et SCHALL, J. J., 1995. Hormonal alterations and reproductive inhibition in male fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) infected with the malarial parasite *Plasmodium mexicanum*. *Physiological Zoology*. p. 608–621.
- FELLMANN, D., BUGNON, C., BRESSON, J. L., GOUGET, A., CARDOT, J., CLAVEQUIN, M. C. et HADJIYIASSEMIS, M., 1984. The CRF neuron : immunocytochemical study. *Peptides*. Vol. 5, p. 19–33.
- GANESH, C. B. et YAJURVEDI, H. N., 2002a. Stress inhibits seasonal and FSH-induced ovarian recrudescence in the lizard, *Mabuya carinata*. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 292, n° 7, p. 640–648.
- GANESH, C. B. et YAJURVEDI, H. N., 2002b. Corticotropin-Releasing Factor antagonist attenuates stress-induced inhibition of seasonal ovarian recrudescence in the lizard *Mabuya carinata*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 126, n° 2, p. 144–152.
- GAUTHIER, J., KLUGE, A. G. et ROWE, T., 1988. Amniote phylogeny and the importance of fossils. *Cladistics*. Vol. 4, p. 105–209.
- GIST, D. H., 2010. Hormones and the sex ducts and sex accessory structures of Reptiles. In : *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Londres (Angleterre) ; Burlington, MA et San Diego, CA (USA) : Academic Press. ISBN 978-0-12-374930-7.
- GREENBERG, N., CHEN, T. et CREWS, D., 1984. Social status, gonadal state, and the adrenal stress response in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Hormones and Behavior*. Vol. 18, p. 1–11.
- GREENBERG, N. et WINGFIELD, J. C., 1987. Stress and reproduction : reciprocal relationships. In : *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. New York, NY (USA) : Plenum Press. p. 461–503. ISBN 978-1-4612-9042-1.
- GUILLETTE JR, L. J., CREE, A. et ROONEY, A. A., 1995. Biology of stress : interaction with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In : *Health and welfare of captive reptiles*. Londres (Angleterre) : Chapman & Hall. ISBN 978-0-412-55080-5.

- GURAYA, S. S., 1989. *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds*. Berlin et Heidelberg (Allemagne) : Springer. Zoophysiology. ISBN 978-3-540-50416-0.
- HANKE, W. et KLOAS, W., 1995. Comparative aspects of regulation and function of the adrenal complex in different groups of vertebrates. *Hormone and Metabolic Research*. Vol. 27, n° 9, p. 389–397.
- HERMAN, C. A., 1977. Comparative effects of epinephrine and norepinephrine on plasma glucose and hematocrit levels in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 32, p. 321–329.
- HO, S.-M., KLEIS, S., MCPHERSON, R., HEISERMANN, G. J. et CALLARD, I. P., 1982. Regulation of vitellogenesis in Reptiles. *Herpetologica*. Vol. 38, n° 1, p. 40–50.
- HOUSSAY, B. A. et PENHOS, J. C., 1960. Pancreatic diabetes and hypophysectomy in the snake *Xenodon merremii*. *Acta Endocrinologica*. Vol. 35, p. 313–323.
- JACKSON, I. M. D., 1986. Phylogenetic distribution and significance of the hypothalamic releasing hormones. *American Zoologist*. Vol. 26, n° 4, p. 927–938.
- JANEIRO-CINQUINI, T. R. F., RIBOLLA, P. E. M., CAPURRO, M. de L. et WINTER, C. E., 1999. Vitellogenin and yolk protein processing in *Bothrops jararaca* (Wied), a tropical venomous snake. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 122B, n° 2, p. 189–198.
- JENNINGS, D. H., MOORE, M. C., KNAPP, R., MATTHEWS, L. et ORCHINIK, M., 2000. Plasma steroid-binding globulin mediation of differences in stress reactivity in alternative male phenotypes in tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 120, n° 3, p. 289–299.
- JESSOP, T. S., TUCKER, A. D., LIMPUS, C. J. et WHITTIER, J. M., 2003. Interactions between ecology, demography, capture stress, and profiles of corticosterone and glucose in a free-living population of australian freshwater crocodiles. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 132, n° 1, p. 161–170.
- JONES, S. M., 2010. Hormonal regulation of ovarian function in Reptiles. In : *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Londres (Angleterre); Burlington, MA et San Diego, CA (USA) : Academic Press. ISBN 978-0-12-374930-7.
- KUMAR, S., ROY, B. et RAI, U., 2010. Hormonal regulation of testicular functions in Reptiles. In : *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Londres (Angleterre); Burlington, MA et San Diego, CA (USA) : Academic Press. ISBN 978-0-12-374930-7.
- LANCE, V. A., CORT, T., MASUOKA, J., LAWSON, R. et SALTMAN, P., 1995. Unusually high zinc concentrations in snake plasma, with observations on plasma zinc concentrations in lizards, turtles and alligators. *Journal of Zoology*. Vol. 235, n° 4, p. 577–585.
- LANCE, V. A., 1984. Endocrinology of reproduction in male reptiles. In : *Symposia of the Zoological Society of London*. p. 357–383.

LELOUP, P., 1976. Méthode simple pour calculer approximativement et comparativement les matières de réserves des serpents vivants. *Acta Zoologica et Pathologica*. Vol. Antverpiensa, n° 64, p. 91–93.

LEVI, L., 1971. *Society, Stress and Disease - The psychosocial environment and psychosomatic diseases*. Londres (Angleterre) : Oxford University Press. ISBN 978-0-19-264416-9.

LICHT, P., DENVER, R. J. et PAVGI, S., 1989. Temperature dependence of in vitro pituitary, testis, and thyroid secretion in a turtle, *Pseudemys scripta*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 76, p. 274–285.

LICHT, P., FARMER, S. W., GALLO, A. B. et PAPKOFF, H., 1979. Pituitary gonadotropins in snakes. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 39, n° 1, p. 34–52.

LICHT, P. et PORTER, D. A., 1987. Role of gonadotropin-releasing hormone in regulation of gonadotropin secretion from amphibian and reptilian pituitaries. In : *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. New York, NY (USA) : Plenum Press. p. 61–85. ISBN 978-1-4612-9042-1.

LICHT, P. et REES MIDGLEY, JR., A., 1976. In-vitro binding of radioiodinated human Follicle-Stimulating Hormone to reptilian and avian gonads : radioligand studies with mammalian hormones. *Biology of Reproduction*. Vol. 15, p. 195–205.

LICHT, P. et REES MIDGLEY, JR., A., 1977. Autoradiographic localization of binding sites for human Follicle-Stimulating Hormone in reptilian testes and ovaries. *Biology of Reproduction*. Vol. 16, p. 117–121.

LICHT, P., 1967. Environmental control of annual testicular cycles in the lizard *Anolis carolinensis* - I. Interaction of light and temperature in the initiation of testicular recrudescence. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 165, n° 3, p. 505–516.

LICHT, P., 1974. Luteinizing Hormone (LH) in the reptilian pituitary gland. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 22, p. 463–469.

LICHT, P., 1995. Reproductive physiology of reptiles and amphibians. In : *Conservation of endangered species in captivity : an interdisciplinary approach*. New York, NY (USA) : State University of New York Press. p. 169–186. ISBN 978-0-7914-1911-3.

LILLYWHITE, H. B., 2014. *How snakes work : structure, function and behavior of the world's snakes*. New York, NY (USA) : Oxford University Press. ISBN 978-0-19-538037-8.

LOMBARDI, J., 1998. *Comparative Vertebrate Reproduction*. Boston, MA (USA) : Springer. ISBN 978-1-4613-7240-0.

LORIOUX, S., LISSE, H. et LOURDAIS, O., 2013. Dedicated mothers : predation risk and physical burden do not alter thermoregulatory behaviour of pregnant vipers. *Animal Behaviour*. Vol. 86, n° 2, p. 401–408.

LOURDAIS, O., BONNET, X. et DOUGHTY, P., 2002. Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 292, n° 5, p. 487–493.

- LOURDAIS, O., BONNET, X., SHINE, R., DENARDO, D. F., NAULLEAU, G. et GUILLON, M., 2002. Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment : a longitudinal study of a viviparous snake. *Journal of Animal Ecology*. Vol. 71, n° 3, p. 470–479.
- LOURDAIS, O., BONNET, X., SHINE, R. et TAYLOR, E. N., 2003. When does a reproducing female viper (*Vipera aspis*) ‘decide’ on her litter size? *Journal of Zoology*. Vol. 259, n° 02, p. 123–129.
- LOURDAIS, O., SHINE, R., BONNET, X., GUILLON, M. et NAULLEAU, G., 2004. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*. Vol. 104, n° 3, p. 551–560.
- LUTTERSCHMIDT, D. I., LEMASTER, M. P. et MASON, R. T., 2004. Effects of melatonin on the behavioral and hormonal responses of red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*) to exogenous corticosterone. *Hormones and Behavior*. Vol. 46, n° 5, p. 692–702.
- MADSEN, T. et SHINE, R., 1993. Determinants of mating success in male adders, *Vipera berus*. *Animal Behaviour*. Vol. 45, n° 3, p. 491–499.
- MAHMOUD, I. Y., GUILLETTE JR, L. J. et MCASEY, M. E., 1989. Stress-induced changes in serum testosterone, estradiol-17 β and progesterone in the turtle, *Chelydra serpentina*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular and Integrative Physiology*. Vol. 93A, n° 2, p. 423–427.
- MANCERA, J. M., AVALOS, M. D. L, PEREZ-FIGARES, J. M. et FERNANDEZ-LLEBREZ, P., 1991. The distribution of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons and nerve fibers in the brain of the snake, *Natrix maura*. *Cell and Tissue Research*. Vol. 264, n° 3, p. 539–548.
- MASSON, G. R. et GUILLETTE JR, L. J., 1985. FSH-induced gonadal development in juvenile lizards, *Eumeces obsoletus*. *The Journal of Experimental Zoology*. Vol. 236, p. 343–351.
- MBANGKOLLO, D. et DEROOS, R., 1983. Comparative effects of epinephrine, norepinephrine, and a gentle handling stress on plasma lactate, glucose, and hematocrit levels in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 49, p. 167–175.
- MEYLAN, S. et CLOBERT, J., 2004. Maternal effects on offspring locomotion : influence of density and corticosterone elevation in the lizard, *Lacerta vivipara*. *Physiological and Biochemical Zoology*. Vol. 77, n° 3, p. 450–458.
- MEYLAN, S., DE FRAIPONT, M. et CLOBERT, J., 2004. Maternal size and stress and offspring philopatry: an experimental study in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Écoscience*. Vol. 11, n° 1, p. 123–129.
- MICHEL, C. L., PASTORE, J.-H. et BONNET, X., 2013. Impact of cool versus warm temperatures on gestation in the aspic viper (*Vipera aspis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular and Integrative Physiology*. Vol. 165A, n° 3, p. 338–342.
- MOORE, I. T., GREENE, M. J., LERNER, D. T., ASHER, C. E., KROHMER, R. W., HESS, D. L., WHITTIER, J. et MASON, R. T., 2005. Physiological evidence for reproductive

suppression in the introduced population of brown tree snakes (*Boiga irregularis*) on Guam. *Biological Conservation*. Vol. 121, n° 1, p. 91–98.

MOORE, I. T., GREENE, M. J. et MASON, R. T., 2001. Environmental and seasonal adaptations of the adrenocortical and gonadal responses to capture stress in two populations of the male garter snake, *Thamnophis sirtalis*. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 289, n° 2, p. 99–108.

MOORE, I. T. et JESSOP, T. S., 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior*. Vol. 43, n° 1, p. 39–47.

MOORE, I. T., LERNER, J. P., LERNER, D. T. et MASON, R. T., 2000. Relationships between annual cycles of testosterone, corticosterone, and body condition in male red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis concinnus*. *Physiological and Biochemical Zoology*. Vol. 73, n° 3, p. 307–312.

MOORE, I. T. et MASON, R. T., 2001. Behavioral and hormonal responses to corticosterone in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. *Physiology and Behavior*. Vol. 72, n° 5, p. 669–674.

MUNCK, A., 1971. Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance. *Perspectives in Biology and Medicine*. Vol. 14, n° 2, p. 265–289.

NAULLEAU, G., BONNET, X., VACHER-VALLAS, M., SHINE, R. et LOURDAIS, O., 1999. Does less-than-annual production of offspring by female vipers (*Vipera aspis*) mean less-than-annual mating? *Journal of Herpetology*. Vol. 33, n° 4, p. 688–691.

NAULLEAU, G. et BONNET, X., 1996. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. *Oecologia*. Vol. 107, n° 3, p. 301–306.

NAULLEAU, G., FLEURY, F. et BOISSIN, J., 1987. Annual cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male aspic viper *Vipera aspis* (L.), (Reptilia, Viperidae), in relation to the sexual cycle and hibernation. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 65, n° 2, p. 254–263.

NAULLEAU, G. et FLEURY, F., 1990. Changes in plasma progesterone in female *Vipera aspis* (L.) (Reptilia, Viperidae) during the sexual cycle in pregnant and non-pregnant females. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 78, n° 3, p. 433–443.

NAULLEAU, G., 1965. La biologie et le comportement prédateur de *Vipera aspis* au laboratoire et dans la nature. *Bulletin de Biologie de France et de Belgique*. Vol. 99, p. 395–524.

NAULLEAU, G., 1970. La reproduction de *Vipera aspis* en captivité dans des conditions artificielles. *Journal of Herpetology*. Vol. 4, n° 3/4, p. 113–121.

NAULLEAU, G., 1973. Les Serpents de France. *Revue française d'aquariologie herpétologie*. N° Hors-sujet.

NIJAGAL, B. S. et YAJURVEDI, H. N., 1999. Influence of corticosterone on FSH-induced ovarian recrudescence in the lizard *Mabuya carinata*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 115, p. 364–369.

NORRIS, D. O. et CARR, J. A. (éd.), 2013. *Vertebrate endocrinology*. 5th Edition. Londres (Angleterre); Waltham, MA et San Diego, CA (USA) : Academic Press. ISBN 978-0-12-394815-1.

PIEAU, C., DORIZZI, M. et RICHARD-MERCIER, N., 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 55, n° 6-7, p. 887–900.

POTTIER, G., 2003. *Guide des reptiles & amphibiens de Midi-Pyrénées*. France : Nature Midi-Pyrénées. ISBN 978-2-9515717-2-3.

POTTINGER, T. G., 1999. The impact of stress on animal reproductive activities. In : *Stress physiology in animals*. Sheffield (Angleterre) : Sheffield Academic Press. p. 130–177. ISBN 978-0-8493-9741-7.

PREEST, M. R., CREE, A. et TYRRELL, C. L., 2005. ACTH-induced stress response during pregnancy in a viviparous gecko: no observed effect on offspring quality. *Journal of Experimental Zoology - Part A : Comparative Experimental Biology*. Vol. 303A, n° 9, p. 823–835.

RAGE, J. C., 1987. Evolutionary biology and morphology: fossil history. In : *Snakes : Ecology and Evolutionary Biology*. New York, NY (USA) : Macmillan Inc. p. 51–76. ISBN 978-1-930665-15-6.

ROBERT, K. A., VLECK, C. et BRONIKOWSKI, A. M., 2009. The effects of maternal corticosterone levels on offspring behavior in fast- and slow-growth garter snakes (*Thamnophis elegans*). *Hormones and Behavior*. Vol. 55, n° 1, p. 24–32.

ROMERO, L. M. et WIKELSKI, M., 2006. Diurnal and nocturnal differences in hypothalamic–pituitary–adrenal axis function in Galápagos marine iguanas. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 145, n° 2, p. 177–181.

ROMERO, L. M., 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 128, n° 1, p. 1–24.

SAINT GIRONS, H., 1957. Le cycle sexuel chez *Vipera aspis* (L.) dans l'ouest de la France. *Bulletin de Biologie de France et de Belgique*. N° 91, p. 284–350.

SAINT GIRONS, H., 1979. Les cycles alimentaires des vipères européennes dans des conditions semi-naturelles. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. Vol. 19, p. 125–134.

SAINT GIRONS, H., 1980. Modifications sélectives du régime des vipères (Reptilia, Viperidae) lors de la croissance. *Amphibia-Reptilia*. Vol. 1, p. 127–136.

SAPOLSKY, R. M., ROMERO, L. M. et MUNCK, A. U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses ? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*. Vol. 21, n° 1, p. 55–89.

SELYE, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agent. *Nature*. p. 32.

SELYE, H., 1951. The General Adaptation Syndrome and the diseases of adaptation. *American Journal of Medicine*. p. 549-555.

- SERBAN, G. (éd.), 1976. *Psychopathology of Human Adaptation*. Boston, MA (USA) : Springer US. ISBN 978-1-4684-2240-5.
- SHILLIGER, L., GÉRARD, P., HUSSARD, N., ROSSELLE, S. et SAVARIN, P., 2001. *Atlas de la Terrariophilie - Les Serpents*. France : Animalia Editions. ISBN 978-2-9517895-3-1.
- SHINE, R. et GUILLETTE JR, L. J., 1988. The evolution of viviparity in reptiles : a physiological model and its ecological consequences. *Journal of Theoretical Biology*. Vol. 132, p. 43–50.
- SIEGEL, D. S. et SEVER, D. M., 2008a. Seasonal variation in the oviduct of female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia : Squamata) : An ultrastructural investigation. *Journal of Morphology*. Vol. 269, n° 8, p. 980-997.
- SIEGEL, D. S. et SEVER, D. M., 2008b. Sperm aggregations in female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia : Squamata) : A histological and ultrastructural investigation. *Journal of Morphology*. Vol. 269, n° 2, p. 189-206.
- SKOCZYLAS, R. et SIDORKIEWICZ, E., 1974. Studies on the blood sugar level in the grass snake (*Natrix natrix* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular and Integrative Physiology*. Vol. 48A, p. 439–456.
- SUMMERS, C. H., 2002. Social interaction over time, implications for stress responsiveness. *Integrative and Comparative Biology*. Vol. 42, n° 3, p. 591–599.
- TAYLOR, E. N. et DENARDO, D. F., 2010. Hormones and reproductive cycles in snakes. In : *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Londres (Angleterre) ; Burlington, MA et San Diego, CA (USA) : Academic Press. ISBN 978-0-12-374930-7.
- THIBAUT, C. et LEVASSEUR, M.-C., 1973. Conservation et survie prolongée des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles des Vertébrés. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. Vol. 13, n° 2, p. 267–284.
- TOKARZ, R. R. et SUMMERS, C. H., 2010. Stress and Reproduction in Reptiles. In : *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Londres (Angleterre) ; Burlington, MA et San Diego, CA (USA) : Academic Press. ISBN 978-0-12-374930-7.
- TOKARZ, R. R., 1987. Effects of corticosterone treatment on male aggressive behavior in a lizard (*Anolis sagrei*). *Hormones and Behavior*. Vol. 21, p. 358–370.
- TSUI, H. W. et LICHT, P., 1977. Gonadotropin regulation of in vitro androgen production by reptilian testes. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 31, p. 422–434.
- ULLER, T., MEYLAN, S., DE FRAIPONT, M. et CLOBERT, J., 2005. Is sexual dimorphism affected by the combined action of prenatal stress and sex ratio ? *Journal of Experimental Zoology - Part A : Comparative Experimental Biology*. Vol. 303A, n° 12, p. 1110–1114.
- VACHER-VALLAS, M., BONNET, X. et NAULLEAU, G., 1999. Relations entre les comportements sexuels et les accouplements chez *Vipera aspis* : étude en milieu naturel. *Revue d'Ecologie*. Vol. 54, n° 4, p. 375–391.

WARNER, D. A. et SHINE, R., 2008. Determinants of dispersal distance in free-ranging juvenile lizards. *Ethology*. Vol. 114, n° 4, p. 361–368.

WHITTIER, J. M., MASON, R. T. et CREWS, D., 1987. Plasma steroid hormone levels of female red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*: relationship to mating and gestation. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 67, n° 1, p. 33–43.

WINGFIELD, J. C. et SAPOLSKY, R. M., 2003. Reproduction and resistance to stress : when and how. *Journal of neuroendocrinology*. Vol. 15, n° 8, p. 711–724.

WRIGHT, A. et JONES, I. C., 1957. The adrenal gland in lizards and snakes. *Journal of Endocrinology*. Vol. 15, p. 83–99.

YAJURVEDI, H. N. et MENON, S., 2005. Influence of stress on gonadotrophin induced testicular recrudescence in the lizard *Mabuya Carinata*. *Journal of Experimental Zoology - Part A : Comparative Experimental Biology*. Vol. 303A, n° 7, p. 534–540.

YAJURVEDI, H. N. et NIJAGAL, B. S., 2000. Corticosterone inhibits normal and FSH-induced testicular recrudescence in the lizard, *Mabuya carinata*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 120, n° 3, p. 283–288.

ZUG, G. R., VITT, L. J. et CALDWELL, J. P., 2001. *Herpetology : an introductory biology of Amphibians and Reptiles*. 2nd edition. Londres (Angleterre); San Diego CA (USA) : Academic Press. ISBN 978-0-12-782622-6.

ANNEXES

Annexe 1 : Body Condition Index pour les vipères de l'élevage, à la mise à la reproduction (mai 2015)

Animal	Sexe	BCI	Masse (g)	Masse Théorique (g)	Longueur (cm)
36V	F	0,76	258,7	341,23	77,5
56V	F	0,61	204	334,67	77
60V	F	0,83	236,5	285,18	73
71V	F	0,67	205,7	309,26	75
121V	F	1,13	260,8	230,50	68
32-07	F	0,95	203,8	215,58	66,5
32-10	F	0,94	199,1	210,75	66
32-11	F	0,68	145,7	215,58	66,5
56-05	F	1,02	114,3	112,25	53,5
NN0	F	1,15	210,3	183,30	63
NN0-01	F	0,98	113,5	115,43	54
NN0-05	F	0,79	144	183,30	63
NN0-10	F	0,88	119,5	135,76	57
83V	M	0,58	107,2	183,30	63
32-03	M	0,52	61,8	118,67	54,5
32-05	M	0,52	87,1	166,39	61
32-06	M	0,44	75,8	170,52	61,5
37-06	M	0,60	129,8	215,58	66,5
NN0-04	M	0,56	84,7	150,56	59

Rappel :

$$\text{BCI} = \text{M} / \text{TM}$$

M : masse de l'animal étudié (en g)

TM : masse théorique de l'animal étudié en fonction de sa longueur corporelle

$$\text{avec TM} = (\text{L} / \text{l})^3 * \text{m}$$

L : longueur corporelle de l'animal étudié (en cm)

l : longueur moyenne des nouveau-nés de l'espèce étudiée (en cm)

m : masse corporelle moyenne des nouveau-nés de l'espèce étudiée (en g)

avec (calculées sur le total des naissances observées) :

- masse moyenne d'un vipéreau : 6,5 g
- longueur moyenne d'un vipéreau : 20,7 cm

Annexe 2 : Résultats bruts des mesures de glycémie
(en g/L, résultats obtenus par coulométrie au glucomètre)

Animal	Sexe	Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
		PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	0,360	0,550	0,270	0,350		
56V	F	0,260	0,740	0,520	0,730	0,330	0,640
60V	F	0,380	0,750	0,310	0,550	0,350	0,700
71V	F	0,280	0,490	0,470	0,660		
121V	F	0,340	0,560	0,230	0,490	0,100	0,360
32-07	F	0,540	0,980	0,100	0,270	0,230	0,510
32-10	F	0,220	0,320				
32-11	F	0,230	0,550	0,300	0,580	0,260	0,490
56-05	F	0,100	0,100				
NN0	F	0,410	1,220	0,370	0,710	0,270	0,570
NN0-01	F	0,270	0,590	0,300	0,470	0,230	0,470
NN0-05	F	0,370	0,850	0,230	0,610	0,220	0,530
NN0-10	F	0,310	0,750	0,410	1,000	0,530	0,790
RBI_1	F	0,470	0,750	0,430	0,690	0,410	0,530
RBI_2	F	1,220	1,220	0,420	0,700	0,710	0,820
RBI_3	F			0,550	0,670	0,380	0,600
RBI_4	F					0,490	0,600
RBI_5	F			0,470	0,770	0,690	1,010
RBI_6	F					0,750	1,150
RBI_7	F					0,480	0,740
RBI_8	F			0,330	0,540	0,450	0,740
RBI_9	F						
32-03	M	0,570	1,620	0,330	0,840		
32-05	M	0,290	1,170	0,530	0,740		
32-06	M	0,440	0,830				
37-06	M	0,730	0,570	0,290	0,530		
83V	M	0,320	1,140	0,740	ECHEC		
NN0-04	M			0,3000	0,9800		

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

Annexe 3 : Résultats bruts des mesures de glycémie
(en g/L, résultats obtenus par spectrophotométrie)

Animal	Sexe	Accouplement Vitellogenèse		Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
		PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	0,637	0,678	0,270	0,365	0,184	0,242		
56V	F	0,274	0,439	0,267	0,567	0,355	0,502	0,301	0,540
60V	F	0,350	0,514	0,324	0,585	0,243	0,346	0,273	0,488
71V	F	0,237	0,305	0,246	0,365	0,347	0,813		
121V	F	0,560	0,613	0,266	0,399	0,139	0,345	0,066	0,258
32-07	F	0,258	0,390	0,471	0,660	0,170	0,285	0,203	0,447
32-10	F	0,458	0,683	0,156	0,191				
32-11	F	0,336	0,449	0,191	0,346	0,204	0,409	0,210	0,388
56-05	F	0,270	0,278	0,027	0,058				
NN0	F	0,254	0,378	0,342	0,844	0,291	0,517	0,244	0,443
NN0-01	F	0,362	0,375	0,203	0,259	0,235	0,351	0,195	0,398
NN0-05	F	0,471	0,515	0,258	0,570	0,201	0,456	0,200	0,432
NN0-10	F	0,310	0,534	0,241	0,531	0,300	0,540	0,144	0,401
RBI_1	F			0,332	0,525	0,287	0,477	0,316	0,425
RBI_2	F			0,788	0,798	0,311	0,480	0,422	0,556
RBI_3	F					0,382	0,473	0,306	0,473
RBI_4	F							0,352	0,418
RBI_5	F					0,338	0,507	0,504	0,583
RBI_6	F							0,485	0,595
RBI_7	F							0,378	0,537
RBI_8	F					0,236	0,373	0,321	0,516
RBI_9	F							0,315	0,726
32-03	M	0,131	0,324	0,375	0,997	0,245	0,540		
32-05	M	0,637	0,644	0,243	0,722	0,360	0,507		
32-06	M	0,309	0,459	0,294	0,564				
37-06	M	0,138	0,454	0,721	0,471	0,181	0,367		
83V	M	0,301	0,598	0,324	0,731	0,551	0,728		
NN0-04	M	0,150	0,314			0,195	0,676		

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

Annexe 4 : Résultats bruts des mesures de corticostéronémie
(en ng/mL, résultats obtenus par RIA)

		Accouplement Vitellogenèse		Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
Animal	Sexe	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	158,796	156,686	29,088	207,276	12,917	240,624		
56V	F	10,198	113,251	6,818	121,913	15,842	197,746	115,920	249,528
60V	F	21,641	156,948	75,007	209,710	32,789	209,909	32,650	291,432
71V	F	37,723	261,864	21,149	214,730	46,697	156,101		
121V	F	240,984	346,824	130,387	226,135	196,788	343,968	300,216	482,280
32-07	F	25,769	89,522	36,199	161,666	2,035	46,104	45,929	129,199
32-10	F	458,928	165,522	327,000	376,704				
32-11	F	58,447	185,789	4,512	69,103	64,056	110,918	64,207	151,135
56-05	F	66,912	67,666	160,116	363,024				
NN0	F	15,898	118,774	20,407	112,375	16,574	153,569	10,999	134,947
NN0-01	F	72,182	126,737	24,530	104,002	53,710	119,501	94,447	369,340
NN0-05	F	7,654	59,988	23,690	171,535	35,453	141,602	33,749	139,466
NN0-10	F	81,322	146,095	8,482	106,678	108,391	279,480	51,134	172,330
RBI_1	F			23,026	161,275	42,382	174,437	3,869	47,755
RBI_2	F			78,852	243,360	50,527	218,765	42,043	181,646
RBI_3	F					74,417	238,601	148,070	339,464
RBI_4	F							37,020	220,644
RBI_5	F					25,579	239,064	50,765	276,744
RBI_6	F							171,557	311,832
RBI_7	F							23,844	90,862
RBI_8	F					59,093	177,984	46,418	394,872
RBI_9	F							108,410	221,830
32-03	M	26,978	115,478	20,407	224,045	21,103	125,755		
32-05	M	251,040	378,072	8,609	249,936	71,378	210,442		
32-06	M	47,870	103,858	44,006	158,590				
37-06	M	50,822	186,546	52,651	175,061	192,576	446,736		
83V	M	53,928	218,705	31,483	176,868	38,438	153,569		
NN0-04	M	126,737	230,626			93,233	275,976		

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

Annexe 5 : Résultats bruts des mesures de protidémie totale
(en g/L, résultats obtenus par spectrophotométrie)

		Accouplement Vitellogenèse		Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
Animal	Sexe	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	62,00	65,65	47,00	49,80	41,73	39,18		
56V	F	58,20	68,44	70,60	68,50	52,69	57,64	51,21	54,41
60V	F	32,00	49,33	30,00	49,36	40,50	46,80	42,18	44,90
71V	F	48,71	52,92	35,59	34,86	35,14	65,63		
121V	F	56,00	56,50	36,43	37,85	29,57	41,00	41,50	41,35
32-07	F	71,00	64,33	62,79	62,57	48,64	47,18	51,00	51,31
32-10	F	49,40	48,82	31,74	34,26				
32-11	F	68,80	68,94	67,58	71,69	49,15	53,06	49,76	50,82
56-05	F	48,69	39,43	37,65	38,80				
NN0	F	63,46	63,23	54,80	56,31	48,69	53,14	47,33	50,25
NN0-01	F	53,77	54,19	62,63	33,84	63,43	59,81	61,54	68,53
NN0-05	F	51,18	57,60	48,58	51,69	53,14	53,63	54,35	56,06
NN0-10	F	68,00	65,25	37,05	42,67	38,73	38,40	16,17	42,43
RBI_1	F			29,36	32,47	31,85	32,12	35,28	39,48
RBI_2	F			21,71	21,53	26,75	29,65	27,20	30,89
RBI_3	F					28,20	30,50	33,00	38,25
RBI_4	F							36,78	41,80
RBI_5	F					26,06	27,67	31,20	32,33
RBI_6	F							35,60	36,46
RBI_7	F							32,80	34,80
RBI_8	F					25,69	26,86	36,00	36,33
RBI_9	F							29,25	63,86
32-03	M	44,50	46,38	37,40	39,67	42,40	46,06		
32-05	M	54,67	52,80	46,50	48,64	41,33	43,00		
32-06	M	41,14	39,00	37,68	41,33				
37-06	M	44,73	43,20	41,00	42,64	39,71	42,95		
83V	M	35,14	40,88	36,75	42,35	41,20	41,60		
NN0-04	M	41,54	38,63			52,38	53,67		

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

Annexe 6 : Résultats bruts des mesures de calcémie
(en $\mu\text{mol/L}$, résultats obtenus par spectrophotométrie)

Animal	Sexe	Accouplement Vitellogenèse		Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
		PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	16,667	11,765	7,520	7,500	6,818	8,488		
56V	F	2,780	3,300	2,720	0,650	2,025	1,950	2,871	2,876
60V	F	2,360	1,920	0,000	1,718	1,225	1,940	2,788	2,865
71V	F	5,788	11,754	2,276	1,629	1,564	4,550		
121V	F	5,262	2,250	3,043	3,115	0,964	2,217	2,450	2,857
32-07	F	10,300	4,733	6,129	6,407	2,293	1,664	2,981	2,876
32-10	F	10,000	10,964	2,258	2,400				
32-11	F	2,533	2,118	2,337	2,477	1,685	1,969	2,753	2,806
56-05	F	1,523	0,000	1,935	0,320				
NN0	F	4,869	5,031	3,040	3,000	2,308	2,336	3,111	3,300
NN0-01	F	9,208	7,369	16,313	3,096	2,700	2,869	2,863	2,747
NN0-05	F	2,065	5,700	3,019	2,885	1,821	1,969	2,894	2,888
NN0-10	F	10,000	0,825	2,790	2,967	1,227	1,170	0,900	2,529
RBI_1	F			1,843	2,206	1,362	0,600	2,520	2,748
RBI_2	F			1,624	1,518	1,225	1,818	2,420	2,533
RBI_3	F					1,320	0,850	2,275	2,719
RBI_4	F							2,191	2,360
RBI_5	F					1,763	2,100	2,500	2,367
RBI_6	F							3,010	2,723
RBI_7	F							2,320	2,660
RBI_8	F					1,575	1,971	2,647	2,783
RBI_9	F							2,250	4,071
32-03	M	1,775	1,985	1,660	1,000	1,960	2,118		
32-05	M	1,933	1,733	1,750	2,164	2,017	2,050		
32-06	M	0,171	0,000	1,200	1,900				
37-06	M	1,336	0,000	1,550	1,929	1,553	1,942		
83V	M	0,129	2,063	1,706	2,029	1,720	1,920		
NN0-04	M	1,846	1,950			1,685	2,383		

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

Annexe 7 : Résultats bruts des mesures de cholestérolémie
(en mmol/L, résultats obtenus par spectrophotométrie)

Animal	Sexe	Accouplement Vitellogénèse		Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
		PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	15,033	15,882	10,620	11,010	12,845	12,247		
56V	F	19,020	22,050	23,160	22,700	17,306	22,479	19,029	20,234
60V	F	6,820	12,667	7,800	10,091	8,150	10,240	9,424	9,387
71V	F	6,118	5,631	4,097	3,886	3,900	7,123		
121V	F	16,246	15,450	9,064	8,838	6,386	8,700	6,183	6,691
32-07	F	12,533	12,100	12,000	11,464	12,086	11,727	12,263	12,414
32-10	F	13,500	13,582	4,942	5,274				
32-11	F	19,840	20,141	17,416	18,600	15,531	15,488	13,871	14,047
56-05	F	9,600	8,314	5,775	6,000				
NN0	F	15,923	15,762	14,900	14,631	14,838	15,021	15,644	16,256
NN0-01	F	14,100	14,344	16,913	8,472	14,421	13,294	11,709	12,316
NN0-05	F	13,624	16,460	13,297	13,846	13,221	13,106	14,682	14,794
NN0-10	F	14,680	12,750	6,255	6,717	9,518	9,240	3,117	8,143
RBI_1	F			7,157	7,712	10,615	10,800	10,488	12,387
RBI_2	F			2,629	2,541	6,825	6,971	6,320	6,711
RBI_3	F					7,580	7,875	8,825	10,050
RBI_4	F							5,557	5,940
RBI_5	F					11,081	11,200	10,840	10,933
RBI_6	F							5,430	5,469
RBI_7	F							8,680	9,020
RBI_8	F					6,769	6,700	10,376	10,883
RBI_9	F							5,600	12,279
32-03	M	8,375	8,908	5,400	5,400	5,940	5,665		
32-05	M	5,633	5,253	3,525	3,257	1,650	1,650		
32-06	M	6,343	6,150	6,144	6,433				
37-06	M	7,991	7,440	4,700	4,650	1,941	2,068		
83V	M	5,443	5,888	6,581	7,288	5,960	6,060		
NN0-04	M	10,985	10,144			4,638	4,750		

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

Annexe 8 : Résultats bruts des mesures de triglycémie
(en mmol/L, résultats obtenus par spectrophotométrie)

Animal	Sexe	Accouplement Vitellogenèse		Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
		PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	15,633	18,329	4,300	4,590	0,791	0,741		
56V	F	4,140	4,688	4,020	4,000	1,444	1,607	3,086	3,228
60V	F	0,660	1,333	0,800	1,118	2,950	3,160	0,547	0,581
71V	F	4,094	7,323	1,117	1,029	0,193	0,254		
121V	F	11,415	9,500	0,793	0,785	0,064	0,133	0,067	0,078
32-07	F	7,000	5,033	3,857	3,236	2,400	2,318	1,481	1,510
32-10	F	8,560	8,100	0,205	0,221				
32-11	F	1,840	1,906	3,363	3,754	1,177	1,200	0,918	0,900
56-05	F	5,515	4,886	0,915	0,960				
NN0	F	3,023	3,069	2,760	2,631	3,346	3,557	2,044	2,063
NN0-01	F	9,000	10,444	6,638	3,408	6,171	5,719	4,731	4,611
NN0-05	F	4,976	5,200	1,510	1,569	3,471	3,356	3,688	3,619
NN0-10	F	15,460	10,088	2,145	2,217	1,173	1,140	1,233	3,214
RBI_1	F			0,471	0,494	0,415	0,424	3,744	4,335
RBI_2	F			0,406	0,388	0,250	0,265	0,200	0,222
RBI_3	F					0,260	0,300	0,250	0,281
RBI_4	F							0,417	0,460
RBI_5	F					0,431	0,433	0,420	0,467
RBI_6	F							0,360	0,438
RBI_7	F							0,600	0,640
RBI_8	F					0,206	0,214	0,371	0,383
RBI_9	F							0,325	4,693
32-03	M	0,250	0,323	0,260	0,333	0,420	0,494		
32-05	M	0,300	0,267	0,275	0,364	0,150	0,183		
32-06	M	0,171	0,300	0,504	0,517				
37-06	M	0,191	0,180	0,425	0,429	0,159	0,158		
83V	M	0,214	0,225	0,675	0,847	0,280	0,360		
NN0-04	M	0,531	0,469			0,277	0,317		

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

Annexe 9 : Résultats bruts des mesures de testostéronémie
(en ng/mL, résultats obtenus par RIA)

Animal	Sexe	Accouplement Vitellogenèse		Ovulation Fécondation		Gestation	
		PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
32-03	M	0,250	0,250	0,250	0,250	3,124	2,398
32-05	M	0,250	0,250	0,250	0,250	0,674	0,714
32-06	M	0,250	0,250	0,250	0,250		
37-06	M	4,539	3,778	0,250	0,250	0,250	0,250
83V	M	4,211	3,616	0,250	0,250	0,922	0,913
NN0-04	M	0,250	0,250			0,250	0,250

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

M : mâle

Annexe 10 : Résultats bruts des mesures de progestéronémie
(en ng/mL, résultats obtenus par RIA)

Animal	Sexe	Accouplement Vitellogenèse		Ovulation Fécondation		Gestation		Post-partum	
		PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2	PS1	PS2
36V	F	7,303	6,710	1,353	11,524	0,025	19,122		
56V	F	0,468	7,914	0,286	13,713	0,025	19,355	5,408	11,259
60V	F	1,066	4,629	1,852	6,183	0,025	5,328	0,025	8,509
71V	F	2,855	17,836	7,296	18,749	15,153	15,972		
121V	F	19,107	25,343	14,496	14,608	14,428	23,850	2,742	8,652
32-07	F	0,457	1,972	1,804	2,998	0,025	1,059	0,642	2,931
32-10	F	17,488	8,512	13,444	19,267				
32-11	F	1,184	4,702	0,025	1,321	0,751	0,310	1,718	2,416
56-05	F	1,689	1,648	1,531	10,389				
NN0	F	1,934	5,688	1,252	4,371	0,025	3,436	0,361	2,946
NN0-01	F	3,824	3,422	0,151	2,293	0,025	2,391	1,913	22,629
NN0-05	F	0,422	1,869	0,721	3,938	0,025	4,051	0,550	2,461
NN0-10	F	3,669	8,729	6,263	13,148	21,377	46,240	1,404	5,777
RBI_1	F			44,145	30,592	12,271	18,968	0,190	2,156
RBI_2	F			9,529	15,597	21,641	14,831	1,895	5,312
RBI_3	F					19,775	23,216	7,436	13,944
RBI_4	F							2,862	17,406
RBI_5	F					14,729	22,408	1,911	12,232
RBI_6	F							3,556	6,889
RBI_7	F							1,228	2,983
RBI_8	F					59,275	36,256	1,934	16,045
RBI_9	F							0,336	1,809

Légende :

PS1 : prise de sang à t0

PS2 : prise de sang à t30, après stress

F : femelle (**gras : femelle reproductrice**)

M : mâle

LABIDALLE Chloé Alizé Rachel

IMPACT D'UN STRESS AIGU SUR LA REPRODUCTION DE LA VIPERE ASPIC *Vipera aspis*

Les vipères aspic, serpents venimeux présents en France, subissent régulièrement des stress aigus, en captivité (manipulations) et dans leur milieu naturel (prédation). Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer l'effet d'un stress aigu sur les hormones sexuelles et sur certains métabolites marqueurs de la reproduction.

Ce travail a été réalisé sur vingt-deux animaux, et valide tout d'abord le glucomètre portable pour la mesure de la glycémie chez cette espèce. Ensuite, nous avons évalué l'effet du stress sur quatre périodes différentes : accouplement/vitellogenèse, ovulation, gestation et postpartum (pour les femelles). Il est montré qu'un stress aigu n'a pas d'effet sur les taux de métabolites marqueurs de la reproduction (calcium, protéines totales, cholestérol, triglycérides), ni sur le taux de testostérone, mais entraîne une augmentation du taux de progestérone.

Mots-clés : reptile ; serpent ; vipère ; stress ; corticostérone ; glucose ; reproduction ; capital-breeding ; vitellogenèse ; gestation ; hormones sexuelles ; testostérone ; progestérone

IMPACT OF AN ACUTE STRESS ON THE REPRODUCTION IN THE ASPIC VIPER *Vipera aspis*

The aspic vipers, venomous snakes found in France, often undergo acute stress in captivity (manipulations) and in their natural environment (predation). The objectives of this work were to evaluate the impact of an acute stress on sex hormones and on some markers of reproduction (metabolites).

This work used twenty-two animals and, in the first place, validates the use of a portable glucometer for blood glucose tests in this species. Then, we evaluated the impact of stress during four different periods: mating/vitellogenesis, ovulation, pregnancy and postpartum (females only). It is shown that acute stress has no effect on the rates of the studied markers (calcium, total protein, cholesterol, triglycerides), nor on testosterone levels, but increases progesterone levels.

Key words : reptilian ; snake ; viper ; stress ; corticosterone ; glucose ; reproduction ; capital-breeding ; vitellogenesis ; gestation ; sex hormones ; testosterone ; progesterone