



**HAL**  
open science

# Compromis entre traits d'histoire de vie et saisonnalité chez un primate hétérotherme

Julie Landes

► **To cite this version:**

Julie Landes. Compromis entre traits d'histoire de vie et saisonnalité chez un primate hétérotherme. Sciences du Vivant [q-bio]. Muséum National d'Histoire Naturelle, 2016. Français. NNT: . tel-01517166

**HAL Id: tel-01517166**

**<https://hal.science/tel-01517166v1>**

Submitted on 2 May 2017

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

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



Année 2016

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

**THESE**

**Pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

**Spécialité : Biologie évolutive**

**Présentée et soutenue publiquement par**

**Julie Landes**

**Le 29 janvier 2016**

---

**Compromis entre traits d'histoire de vie et saisonnalité  
chez un primate hétérotherme**

---

Sous la direction de : **Fabienne Aujard, Directrice de Recherche, Pierre-Yves Henry, Maître de Conférences, et Samuel Pavard, Maître de Conférences**

**JURY :**

<b>M. Alexandre Robert</b>	<b>Maître de Conférences, UMR 7204 MNHN-CNRS-UMPC, Paris, France</b>	<b>Président</b>
<b>Mme. Fabienne Aujard</b>	<b>Directrice de Recherche, UMR 7179 CNRS-MNHN, Brunoy, France</b>	<b>Directrice de Thèse</b>
<b>M. Pierre-Yves Henry</b>	<b>Maître de Conférences, UMR 7179 CNRS-MNHN, Brunoy, France</b>	<b>Co-Directeur de Thèse</b>
<b>M. Jean-Michel Gaillard</b>	<b>Directeur de Recherche, UMR 5558 CNRS, Villeurbanne, France</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Marco Festa-Bianchet</b>	<b>Professeur titulaire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Carlo-Giovanni Camarda</b>	<b>Chargé de Recherche, Institut National d'Etudes Démographiques, Paris, France</b>	<b>Examineur</b>



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants qui m'ont donné l'opportunité de travailler sur ce projet.

Merci à Samuel et Pierre-Yves pour leur patience, leur investissement et leur disponibilité. L'un comme l'autre, ils m'ont soutenue et guidée tout au long de cette thèse. Je les remercie pour leur confiance, malgré les revers que j'ai pu rencontrer au cours de ces trois ans. J'ai beaucoup apprécié travailler avec eux et les remercie pour avoir fait en sorte que cette collaboration se soit déroulée de la meilleure façon possible.

Merci à Bruno Simmen pour avoir accepté d'encadrer cette thèse pour ses débuts et pour avoir assisté à tous mes comités de thèse, et à Fabienne Aujard pour avoir accepté de prendre le relais en tant que directrice de cette thèse.

Je remercie également Thomas Tully et Loïc Desquilbet pour avoir accepté de faire partie de mon comité thèse et m'avoir fait bénéficier de leur expertise et de leurs conseils.

Je tiens à remercier Martine et Isabelle sans qui ce projet n'aurait pas pu voir le jour. Merci pour m'avoir permis de travailler sur un tel jeu de données, et par la suite pour leur aide et leurs conseils concernant les microcèbes et la base de données.

Je remercie tous les membres de l'UMR 7206, en particulier ceux de l'équipe d'Anthropologie Génétique, et ceux de l'UMR 7179, en particulier les membres de l'équipe Bioadapt basés à Brunoy, pour leur accueil et leur convivialité. Travailler dans ces deux équipes a vraiment été une expérience aussi enrichissante qu'agréable.

Je tenais tout particulièrement à remercier mes collègues de bureau qui m'ont accompagnée tout au long de cette thèse.

Côté Paris, un grand merci à Elise pour son enthousiasme et ses trouvailles musicales et à Nina pour son implication et ses anecdotes. Merci également à Romain, je ne compte plus le nombre de fois où tu m'as sauvée d'un code rebelle ; Bérénice notre sportive granivore ; Marie et ses histoires de terrain ; Goki et son calme à toute épreuve ; Christophe mon compagnon de voyage ; Valentin et tous les autres étudiants qui sont passés par le labo au cours de ces trois ans.

Côté Brunoy, je tiens à remercier en particulier Manon pour tous ces bons moments, que ce soit au bureau, aux filets ou en courant après les poules d'eau ; mais également à Nicolas le sportif de l'équipe, Thomas et ses envolées lyriques, Laureline l'aventurière du grand sud, Pauline et ses crevettes, Pauline et Julia qui ont contribué à ma bonne intégration dans l'équipe et les stagiaires qui ont participé à la bonne ambiance de l'équipe. Merci également à Fathia, Jérémy, Delphine et Lauréline pour leur aide précieuse et leurs conseils dans ma démarche expérimentale, ainsi qu'à Sandrine et Eric pour m'avoir accompagnée dans ma découverte des microcèbes.

Un grand merci à Christel et Mandy, les drôles de dames de Montpellier, pour ces conversations

pleins de fous rires et de bons souvenirs.

Je tiens également à remercier ma famille, en particulier mes parents pour m'avoir toujours encouragée et donné les moyens de réussir, et Aurélie et Jérémy pour ces parenthèses dans les périodes de travail et pour tous leurs encouragements. Enfin un grand merci à Thomas pour son soutien au quotidien et pour m'avoir aidée à surmonter ces derniers mois avec le sourire.

# Résumé

La théorie des traits d'histoire de vie vise à expliquer la diversité des cycles de vie entre espèces, et entre individus au sein d'une même espèce. Un des mécanismes centraux de diversification est la présence de compromis entre traits. Ces compromis sont essentiellement inférés à partir de corrélations entre traits observées dans des populations naturelles, complétées de validations expérimentales en conditions contrôlées. Cependant, peu d'études ont pu combiner des suivis démographiques et des suivis de caractéristiques individuelles à long terme. De plus, le lien entre les compromis et l'environnement est largement inconnu. La théorie des traits d'histoire de vie postulant que les ressources sont limitantes, la validité de la théorie peut être explorée en exposant les organismes à des ressources non-limitantes, comme c'est généralement le cas en captivité. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux facteurs influençant la mortalité et aux compromis entre traits d'histoire de vie chez un petit primate hétérotherme, le Microcèbe murin (*Microcebus murinus*), élevé en captivité. Nous avons étudié les déterminants des patrons de mortalité de 881 individus, grâce au suivi de la population sur une vingtaine d'années. L'étude de la mortalité de l'espèce a nécessité le développement de modèles de survie spécifiques, permettant la prise en compte de l'intégralité des individus disponibles (avec troncature et censure), les variations saisonnières de la mortalité, et les effets, proportionnels ou non, des facteurs de risque de mortalité au cours de la vie. Nous avons tout d'abord formulé et testé une nouvelle théorie du vieillissement, proposant que l'accumulation des dommages de l'organisme n'est pas constante chez les organismes saisonniers, mais plus importante lors des transitions physiologiques entre phénotypes saisonniers où les coûts s'accumulent. Une expérience d'accélération du rythme saisonnier valide cette théorie : la vitesse des transitions saisonnières est un des meilleurs prédicteurs du risque de mortalité, et de son évolution avec l'âge. Puis nous avons exploré les compromis entre allocation à la reproduction et survie adulte ultérieure. En captivité, où les ressources sont non limitantes et la mortalité extrinsèque faible, aucun compromis n'a été détecté entre l'effort reproducteur femelle, ou l'allocation maternelle au développement postnatal des juvéniles, et la mortalité adulte de la mère ou des petits. Les résultats sont même opposés à la théorie : plus une femelle s'est reproduite, plus ses chances de survie ultérieures étaient élevées. L'absence de coût de la reproduction femelle est également révélée à l'aide d'un marqueur de vieillissement : les télomères sont rallongés au cours de la période de reproduction (alors que, en cas de stress oxydatif accru, ils devraient raccourcir). Ces résultats suggèrent que la reproduction sans limitation de ressources (en captivité) n'induit pas de coût (compromis) sur la survie adulte femelle. Ce travail de thèse ouvre de nouvelles perspectives sur les mécanismes responsables du vieillissement des organismes et la dépendance des compromis entre traits d'histoire de vie aux conditions environnementales. Il met l'accent sur l'importance des pressions environnementales dans l'évolution des traits, une thématique en plein essor, pour affiner la théorie des traits d'histoire de vie.

**Mots clés :** compromis, traits d'histoire de vie, mortalité, vieillissement, saisonnalité, allocation, coût de la reproduction, début de vie, primate, captivité.



# Abstract

The life history theory aims at explaining the diversity of traits between species and between individuals from a same species. One of the main mechanisms of the diversification is the presence of trade-offs between traits. These trade-offs are mainly inferred from correlations between traits observed in natural populations and experimental validations under controlled conditions. However, few studies combine demographic monitoring and long-term follow-ups of individual characteristics. Moreover, the link between the trade-offs and the environment is largely unknown. The life history theory assume that resources are limited, and the validity of the theory can be explored by exposing organisms to unlimited resources, as it is usually the case in captivity. In this work, we studied the factors that influence mortality and the trade-offs between life history traits in a small heterothermic primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), raised in captivity. We investigated what determine the mortality trajectories over age of 881 individuals, thanks to the 18 years-long monitoring of the population. The study of mortality needed the development of complex and specific survival models, allowing the incorporation of all available individuals (with truncation and censoring), the seasonal variations of mortality, and the effects, proportional or not, of risk factors over the life. We first proposed and tested a new theory of aging that postulates that the damages accumulations of the organism is not constant in seasonal organisms, but is more important during physiologic seasonal transitions between seasonal phenotypes when costs accumulate. An experiment where seasonal rhythm has been accelerated validates this theory: the pace of seasonal transitions is a good predictor of mortality, and this evolution over age. Then, we explored the trade-offs between allocating to reproduction and subsequent survival. In captivity, where resources are unlimited and extrinsic mortality low, no trade-off was detected between female reproduction or allocation to the development of the offspring, and the mother's mortality or the offspring's adult mortality. The results are even opposite to the expectations from the theory: the more a female reproduces, the more it survives later in life. The absence of a cost of female reproduction is also revealed by a marker of physiological aging: telomeres elongated during the season of reproduction (in case of oxidative stress, they should shorten). These results suggest that reproduction with no resources limitation (in captivity) does not induce any cost (trade-off) on adult survival in females. This work opens new perspectives on mechanisms responsible for organisms' aging and the link between trade-offs between life history traits and environmental conditions. It emphasizes the importance of environmental pressures in the evolution of traits, an emerging thematic, to refine the life history theory.

**Key words:** trade-offs, life history traits, mortality, aging, seasonality, allocation, cost of reproduction, early-life, primate, captivity.





# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>2</b>
<b>Modèle biologique : Le microcèbe murin - Caractéristiques, population étudiée et base de données</b>	<b>5</b>
<b>Analyse des données de survie</b>	<b>15</b>
<b>1 Saisonnalité et mortalité</b>	<b>21</b>
Objectif et résumé . . . . .	21
1.1 Effet de l'accélération du rythme des saisons sur la mortalité et le vieillissement . . .	25
1.2 Effet du déséquilibre de longueur des saisons sur la mortalité et le vieillissement . . .	72
Discussion du Chapitre 1 . . . . .	88
Conclusion . . . . .	89
<b>2 Reproduction et mortalité</b>	<b>91</b>
Objectif et résumé . . . . .	91
2.1 Absence de coût de la reproduction en captivité . . . . .	93
2.2 Meilleure survie des bonnes reproductrices ? Exploration à l'aide d'un marqueur proximal de sénescence . . . . .	108
Conclusion . . . . .	116
<b>3 Conditions de début de vie et mortalité adulte</b>	<b>117</b>
Objectif et résumé . . . . .	117
Absence de compromis entre croissance et conditions de début de vie et mortalité adulte en captivité . . . . .	118
Conclusion . . . . .	133
<b>Discussion générale</b>	<b>134</b>
Captivité et compromis entre traits d'histoire de vie . . . . .	134
Saisonnalité et compromis entre traits d'histoire de vie . . . . .	136
Flexibilité saisonnière et compromis entre traits d'histoire de vie . . . . .	137
Coût de la reproduction et de la croissance . . . . .	137
<b>Références bibliographiques</b>	<b>139</b>



# Introduction

Certaines espèces vivent quelques heures alors que d'autres survivent des siècles. Certaines se reproduisent une fois au cours de leur vie et d'autres plusieurs fois par an, et ce pendant des années. Certaines se développent progressivement au cours du temps alors que d'autres ont une croissance discontinue. Les traits d'histoire de vie sont les traits biologiques qui déterminent les composants ultimes de la valeur sélective, à savoir la survie et la reproduction (p. ex. la croissance, l'âge à la maturité sexuelle, le succès reproducteur, la dispersion ; Michalakis *et al.* 2010).

La théorie des histoires de vie a été formulée pour expliquer la structuration de cette diversité des traits d'histoire de vie entre organismes. Les traits d'histoire de vie sont soumis à la sélection naturelle, sélection qui favorise les individus ayant des traits qui maximisent leur survie et/ou leur succès reproducteur. La sélection naturelle devrait donc entraîner l'évolution de "démons darwiniens", des organismes à la valeur sélective maximale capable de se reproduire dès leur naissance, de produire un nombre de descendants infini et de vivre éternellement (Law 1979). Cependant, de nombreuses contraintes rendent l'évolution de tels organismes impossible et imposent des compromis entre les différents traits d'histoire de vie (Cole 1954 ; Stearns 1989). Ces contraintes peuvent être physiologiques, dans le cas d'incompatibilités entre fonctions antagonistes par exemple. Elles peuvent également être génétiques ou environnementales. En effet, la majorité des organismes évoluent dans des environnements où les ressources sont limitantes, en termes de quantité et/ou de qualité. La diversité des traits d'histoire de vie résulte de compromis d'allocation des ressources disponibles entre les différents traits, comme formalisé par le Modèle en Y (Figure 1 ; van Noordwijk & de Jong 1986). Ces compromis se traduisent par des corrélations négatives entre traits.

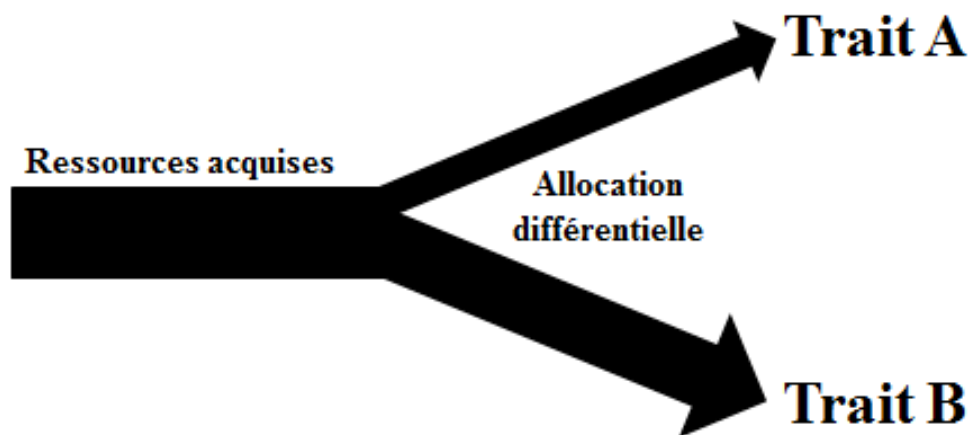


FIGURE 1 – Le modèle en Y d'allocation des ressources. Pour illustrer le Modèle en Y d'allocation des ressources, nous prendrons le cas simplifié où à partir des ressources disponibles, un individu peut allouer à deux traits d'histoire de vie A et B (p. ex. le nombre d'œufs et la réparation cellulaire). Les ressources acquises sont allouées préférentiellement à un des deux traits aux dépens de l'autre.

Ainsi, les espèces de mammifères et d'oiseaux se positionnent le long d'un gradient «lent-rapide» : les espèces à histoire de vie rapide sont de petite taille, grandissent rapidement, atteignent la maturité tôt, se reproduisent souvent, ont une longévité courte et vieillissent plus rapidement, relativement aux espèces à histoires de vie lente (Promislow & Harvey 1990 ; Ricklefs & Scheuerlein 2001 ; Jones *et al.* 2008).

Les compromis d'allocation entre traits d'histoire de vie se retrouvent également au niveau intra-spécifique. L'exemple le plus étudié est le coût de la reproduction. Ainsi, la production d'œufs est liée à une diminution de la longévité chez les drosophiles femelles (Maynard Smith 1958). Cela suggère que la reproduction est coûteuse en termes de maintien de l'organisme, et donc de survie. Ce coût de la reproduction (Partridge & Harvey 1985) est un concept central dans les théories de l'évolution de l'itéroparité et de la sénescence (Fabian & Flatt 2012), de l'investissement parental (Gross 2005), ou encore de la sélection sexuelle et de l'évolution du dimorphisme (Madsen & Shine 1994). L'étude de ces coûts de la reproduction est une thématique de recherche ancienne (p. ex. Maynard Smith 1958) mais toujours d'actualité (p. ex. Gélin *et al.* 2015).

Un autre exemple de compromis est celui des effets des performances en début de vie (croissance, premières reproductions) sur les performances futures (reproduction, survie). Ces compromis se retrouvent chez de nombreuses espèces d'oiseaux, de mammifères ou encore de reptiles (Lemaître *et al.* 2015). Ces compromis peuvent être liés à la variation des performances reproductrices due aux différences de qualité des individus d'une population. Par exemple, seules les femelles chèvres des montagnes *Oreamnos americanus* de mauvaise qualité montrent des compromis entre reproductions présente et futures (Hamel *et al.* 2009).

Les compromis d'allocation entre les différents traits devraient dépendre des ressources disponibles pour l'organisme. Certaines études commencent à s'intéresser à l'effet d'un environnement fluctuant sur les compromis entre traits d'histoire de vie. La sélection naturelle favorise l'évolution de traits d'histoire de vie robustes aux changements environnementaux (« demographic buffering » ; Morris

& Doak 2004 ; Koons *et al.* 2009) chez certaines espèces. Cependant, chez d'autres espèces, en particulier celles qui possèdent une faible survie juvénile ou adulte, les traits démographiques varient en fonction des fluctuations des conditions environnementales (« demographic lability » ; Koons *et al.* 2009).

Comme nous l'avons vu, l'étude des compromis entre traits d'histoire de vie est une thématique dynamique et d'actualité. Cependant, les compromis sont essentiellement estimés à partir de mesures de corrélations phénotypiques ou génétiques entre traits (Michalakis *et al.* 2010). La majorité des études porte sur des populations naturelles (p. ex. Koivula *et al.* 2003 ; Mitchell *et al.* 2012), ce qui rend difficile les mesures de traits liés aux bases fonctionnelles des compromis, tels que la masse corporelle ou l'activité métabolique. De tels suivis de population sont rares. Les autres études sont faites en laboratoire et s'intéressent aux mécanismes et bases génétiques des compromis, sur des lignées sélectionnées et sur de courtes périodes. Peu de données qui combinent suivi démographique et mesures des caractéristiques ou performances individuelles sont disponibles, ce qui rend l'étude des mécanismes à l'origine des compromis difficile. Ces mécanismes, qu'ils soient génétiques, en lien avec l'acquisition et/ou l'allocation des ressources, ou liés aux contraintes biologiques, sont donc encore largement méconnus (Ricklefs & Wikelski 2002 ; Speakman 2008). Les fonctions biologiques elles-mêmes peuvent avoir des conséquences antagonistes les unes sur les autres. Par exemple, la reproduction peut compromettre les réponses immunitaires, et donc la survie (Harshman & Zera 2007). Une autre conséquence du manque de suivis sur le long terme est que la dimension temporelle des compromis entre traits d'histoire de vie est encore peu connue, la majorité des études s'intéressant à une portion de la vie donnée (p. ex. deux saisons de reproduction consécutives) ou à des instants précis de la vie des individus (p. ex. âge à la maturité et âge à la mort). Or, les compromis peuvent être âge-spécifiques (Nussey *et al.* 2009). Par exemple, les coûts des performances en début de vie peuvent avoir des répercussions à court et/ou long terme (Lemaître *et al.* 2015). Caractériser la mortalité tout au long de la vie en fonction des valeurs d'autres traits est nécessaire pour un jour parvenir à comprendre cette composante âge-spécifique des compromis entre traits d'histoire de vie.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié quelques déterminants majeurs de la mortalité au cours de la vie (en fonction de l'âge ; Chapitre 1). En particulier, nous nous sommes intéressés au lien entre saisonnalité et mortalité chez une espèce saisonnière présentant des différences d'activité physiologique marquées entre saisons (Chapitre 1). Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence les possibles compromis entre mortalité et allocation à la reproduction. De ces compromis ayant trait à la reproduction, nous avons envisagé deux perspectives : celle du reproducteur, au travers du compromis entre son effort reproducteur et sa survie future (Chapitre 2), et celle du descendant, au travers du compromis entre l'allocation parentale reçue et sa survie future (Chapitre 3). Un des paradigmes importants pour l'interprétation de nos résultats est que les données utilisées ont été obtenues en condition de captivité, c'est-à-dire sur des animaux protégés au maximum des contraintes environnementales supposément à l'origine des compromis entre traits d'histoire de vie, puisqu'ils reçoivent une nourriture en quantité non-limitante et sont protégés des principales causes de mortalité extrinsèque (prédation, parasitisme).

# **Modèle biologique : Le microcèbe murin**

## **Caractéristiques, population étudiée et base de données**

Afin d'étudier les déterminants de la mortalité et les compromis entre traits d'histoire de vie, nous avons utilisé les données de suivis d'une population captive de microcèbes murins.

### **Le microcèbe murin au sein des primates**

Le microcèbe murin (*Microcebus murinus*) est un primate appartenant à la famille des Cheirogaleidea (Mittermeier *et al.* 2008), l'une des cinq familles de lémuriens (les Lémuriformes ; Figure 2). Cette famille comprend des espèces nocturnes et arboricoles, de petite taille - les microcèbes font partie des espèces de primate les plus petites - et dont plusieurs espèces sont hétérothermes, c'est-à-dire qu'elles peuvent utiliser la torpeur ou l'hibernation (certaines espèces de la famille des Cheirogaleidae, les lémurs nains, sont les seules espèces de primate à hiberner ; Dausmann 2014). Les Lémuriformes se sont séparés des autres primates il y a environ 50 millions d'années (Martin 2000) et se placent en position basale au sein de la phylogénie des primates (Figure 2). Ils ont conservé des traits ancestraux pour les primates (p. ex. l'hétérothermie ; Lovegrove 2012).

Les primates se distinguent des autres Mammifères par leurs histoires de vie particulièrement lentes par rapport à d'autres espèces de même taille : ils présentent des âges de maturité élevés, une croissance lente, ont des portées de petites tailles, ont un temps entre deux reproductions relativement long, ou encore, montrent une longévité élevée (Figure 3 ; Charnov & Berrigan 1993 ; Ross 1998). Ces histoires de vies longues chez les primates ont été liées à leur taux métabolique faible par rapport aux espèces de Mammifères de masse comparable (Simmen *et al.* 2015). Le microcèbe est un des primates de plus petite taille. En accord avec le continuum lent-rapide, il présente également une histoire de vie plus rapide que les primates de plus grande taille, tout en restant plus lente que les autres Mammifères de même masse (Figure 3).

Bien qu'il existe 21 espèces de microcèbes (Blair *et al.* 2014), par la suite, la dénomination «microcèbe» désignera le microcèbe murin.

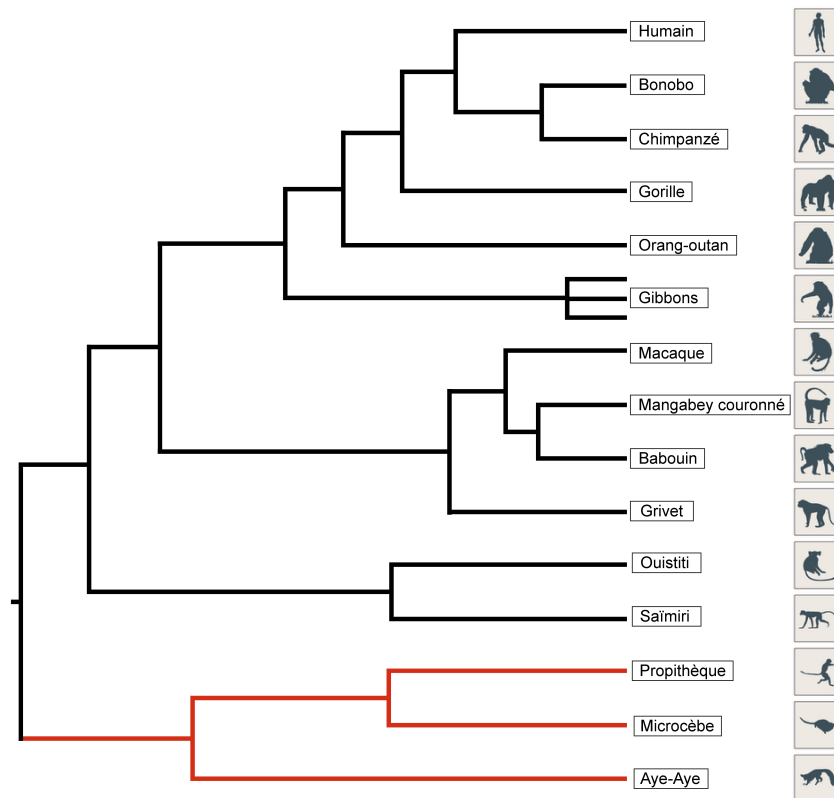


FIGURE 2 – Place du microcèbe dans l’arbre phylogénétique des primates. Les Lémuriformes, qui regroupent l’ensemble des espèces de lémuriens malgaches, sont indiqués en rouge. Figure modifiée d’après Rogers & Gibbs (2014).

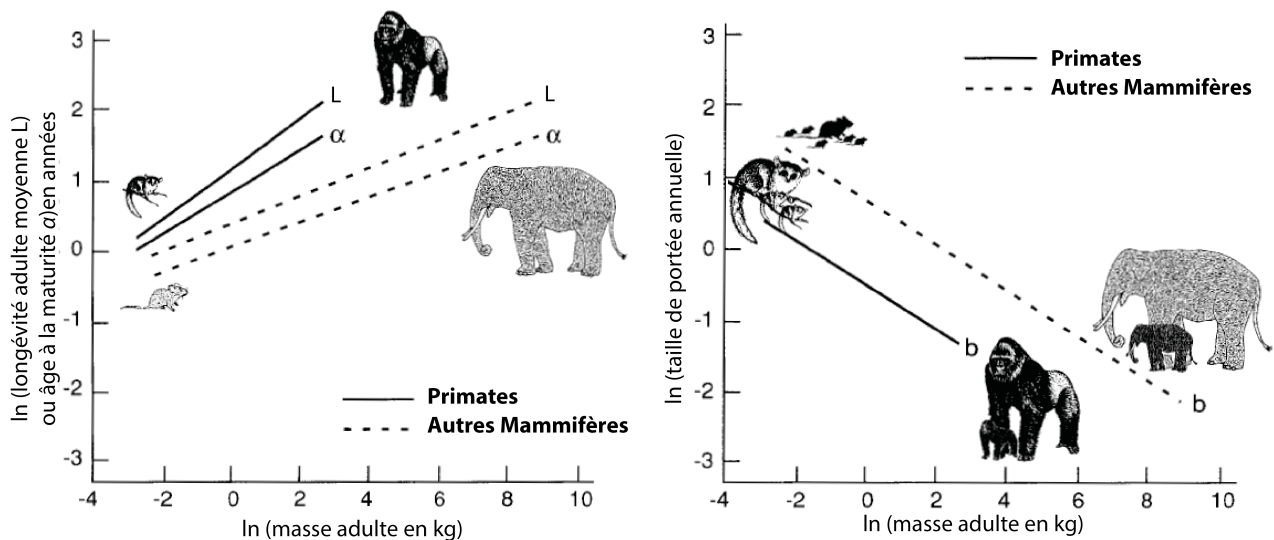


FIGURE 3 – Relation entre l’âge à la première reproduction (temps entre le sevrage et la première mise bas (notée  $\alpha$ ) ou la longévité moyenne (notée  $L$ ) et la masse à l’âge adulte (à gauche) ou entre la taille de portée (calculée en nombre de filles produites par an) et la masse à l’âge adulte (à droite). Les relations entre traits d’histoire de vie sont indiquées pour les primates (trait plein) et les autres Mammifères (pointillés) indépendamment. La place des gorilles (les plus grosses espèces de primates), des microcèbes (parmi les plus petits primates), des éléphants (les Mammifères les plus lourds) et des souris (parmi les Mammifères les plus petits) est indiquée. Figure modifiée d’après Charnov & Berrigan (1993).



## Généralités

Le microcèbe murin est présent dans les forêts sèches et épineuses de l'ouest et du sud de Madagascar (Figure 4). Cette espèce nocturne et arboricole se nourrit essentiellement de fruits et d'insectes, mais aussi de gommages végétales en période défavorable (Dammhahn & Kappeler 2008). Dans la nature, le microcèbe murin a une durée de vie de deux ans pour les mâles et de trois ans pour les femelles, et peut atteindre douze ans (Kraus *et al.* 2008). Dans cette espèce la maturité sexuelle est atteinte à neuf mois et les mâles comme les femelles peuvent se reproduire jusqu'à leur mort (absence d'arrêt des fonctions reproductrices aux grands âges ; Perret 2000 ; Mittermeier 2010).

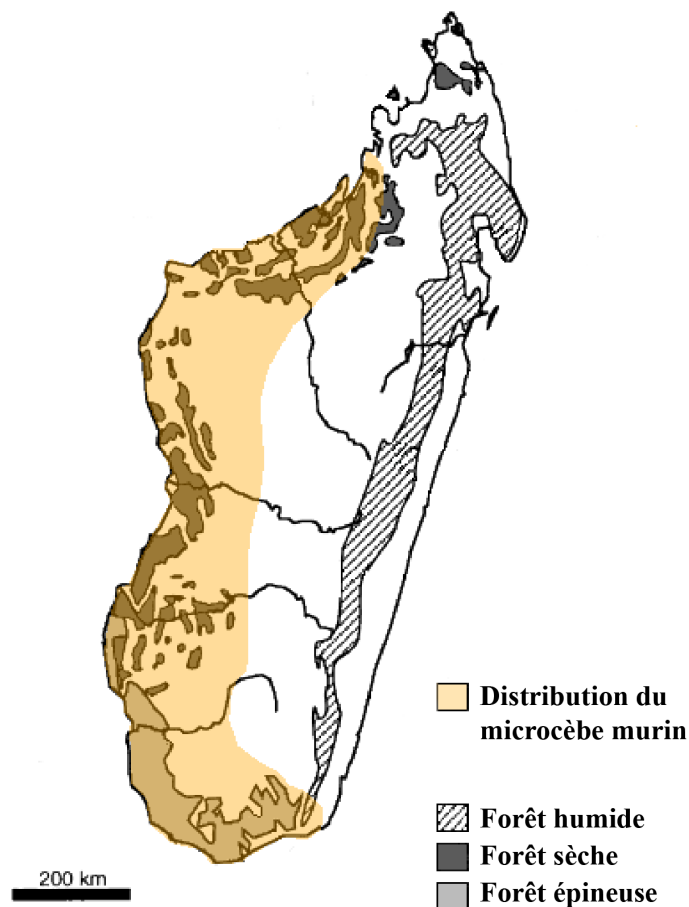


FIGURE 4 – Aire de répartition du microcèbe murin sur l'île de Madagascar. Le type de forêt est indiqué. Figure modifiée d'après Lahann *et al.* (2006) et Wright (1999).

Le microcèbe est une espèce solitaire pendant la période de reproduction, et lors de ses prospections alimentaires. Par contre, en période hivernale et lors de l'élevage des jeunes, les microcèbes peuvent se regrouper à plusieurs, pendant les phases de repos (Radespiel *et al.* 1998 ; Séguy & Perret 2005 ; Lutermann *et al.* 2010). Les femelles occupent des territoires fixes d'un à deux hectares environ, qu'elles peuvent partager avec d'autres femelles qui leur sont souvent apparentées (Kappeler 2000 ; Radespiel *et al.* 2001). Les regroupements d'individus ont pour but d'éviter les pertes de chaleur durant la journée (leur période d'inactivité). Les mâles, quant à eux, possèdent des territoires moins définis mais plus étendus que ceux des femelles.

## Saisonnalité

Dans les forêts tropicales sèches, les microcèbes sont soumis à un environnement très saisonnier, alternant entre une saison humide durant laquelle les ressources sont *a priori* abondantes, et une saison sèche contraignante par l'absence de nourriture et le déficit hydrique (Schmid & Speakman 2000 ; Schmid & Speakman 2009 ; Vuarin *et al.* 2015 ; Figure 5.A). La saison humide (été austral) dure quatre à six mois (selon les régions), de décembre à mars (Dammhahn & Kappeler 2008), et est caractérisée par une température élevée, de fortes précipitations et une forte abondance en ressources. Elle correspond à la période de reproduction du microcèbe. Les femelles se reproduisent une à deux fois par saison de reproduction et donnent naissance à un à trois petits par portée (Perret 2000). Pendant cette saison, le risque de mortalité est le plus élevé car les individus en reproduction sont particulièrement exposés à la prédation et au risque de transmission de pathogènes. La mortalité est également élevée à cause de la compétition entre individus de même sexe et des coûts directs de la reproduction (Kraus *et al.* 2008).

L'autre période de l'année, la saison sèche (hiver austral), dure entre six et huit mois, d'avril à novembre, et se caractérise par des températures basses et des épisodes de sécheresse responsables d'un appauvrissement du milieu en eau et nourriture (Schmid & Speakman 2000 ; Dammhahn & Kappeler 2008 ; Schmid & Speakman 2009 ; Vuarin *et al.* 2015). Afin de survivre aux restrictions caloriques et hydriques imposées par la saison sèche, les microcèbes utilisent deux mécanismes d'économie d'énergie complémentaires : le stockage de graisses et la torpeur journalière (Schmid 2001 ; Vuarin *et al.* 2013a). Les microcèbes stockent de l'énergie sous forme de graisse en fin de saison humide, alors que la nourriture est encore abondante. Leur masse augmente d'environ 30%, passant de 60g à 90g (dans le cas des femelles ; les mâles grossissent moins et plus tardivement ; Figure 5.B et C ; Schmid 1999). Au cours de la saison sèche, les microcèbes utilisent également la torpeur journalière (p. ex. Aujard & Vasseur 2001 ; Canale *et al.* 2011 ; Vuarin *et al.* 2013a), un état d'hypométabolisme et d'hypothermie contrôlée et temporaire très répandu chez les mammifères (Geiser 2013). Les épisodes de torpeur durent quelques heures, contrairement à l'hibernation qui dure de plusieurs jours à plusieurs semaines (Ruf & Geiser 2014). L'utilisation de la torpeur s'accompagne d'une activité locomotrice réduite, et donc d'une moindre exposition à la prédation, et est associée à une diminution de la mortalité pendant la saison défavorable (Liow *et al.* 2009). La torpeur a également été associée à une meilleure maintenance de l'organisme et à un vieillissement ralenti (Turbill *et al.* 2013 ; Giroud *et al.* 2014 ; voir Chapitre 1.2).

Pour les mâles comme pour les femelles, le stockage de graisses, la régression de l'activité reproductrice et l'entrée en torpeur sont déclenchés par l'équinoxe d'automne, autrement dit, par des jours plus courts que les nuits (Perret & Aujard 2001a ; Perret & Aujard 2001b). Cependant, les femelles grossissent plus et plus tôt que les mâles (Figure 5.B), et elles restent majoritairement inactives tout au long de la saison sèche, alors que la plupart des mâles maintiennent une activité de recherche de nourriture pendant cette période (Schmid & Kappeler 1998 ; mais voir Vuarin *et al.* 2015).

Le passage vers un état reproducteur et l'initiation des modifications physiologiques associées dépendent de la photopériode, mais de manière très différente en fonction du sexe. La reproduction femelle (période d'œstrus de un à trois jours) est déclenchée par l'équinoxe de printemps (c.-à-d.

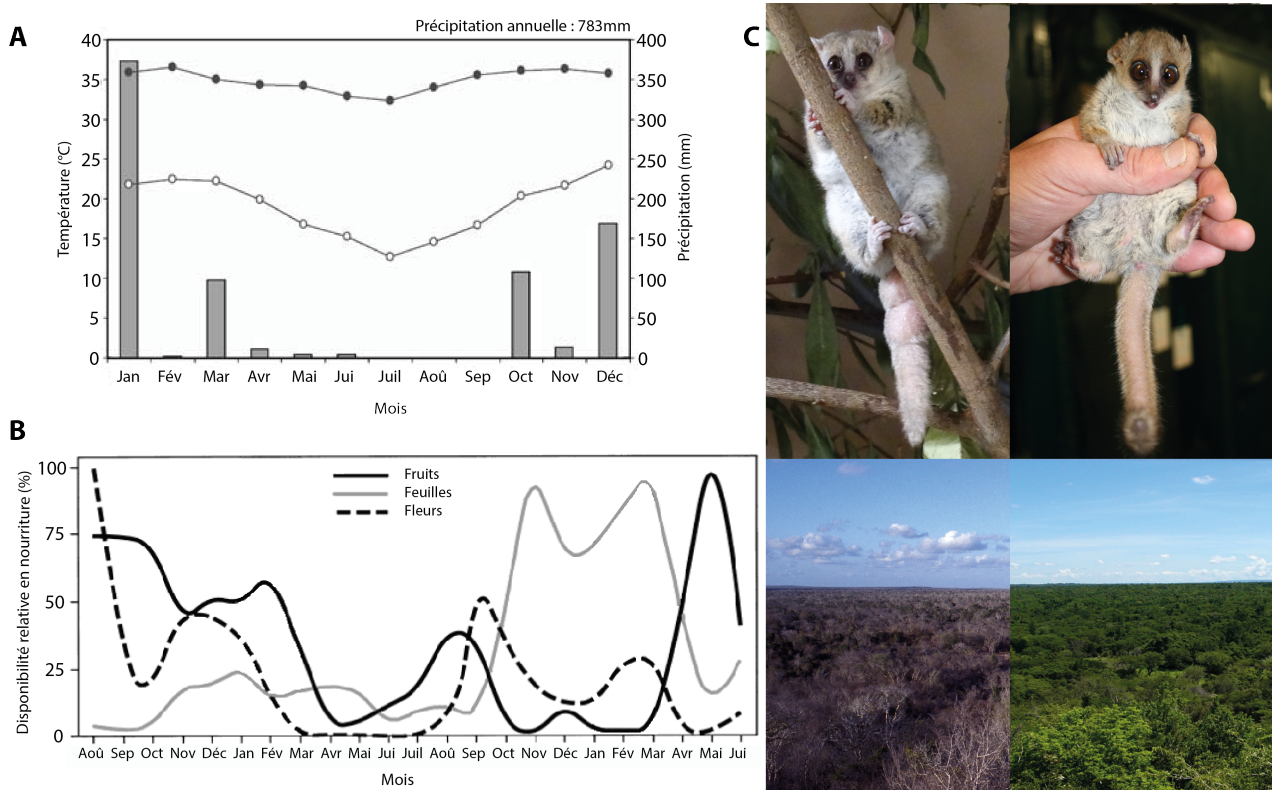


FIGURE 5 – (A) Précipitations mensuelles (barres) et températures mensuelles moyennes, maximales (ronds pleins) et minimales (ronds vides) à la station de recherche de Kirindi (dans une forêt tropicale sèche de l’ouest de Madagascar, habitat naturel du microcèbe murin) en 2005. (B) Rythmes saisonniers de la masse et de l’activité de reproduction des microcèbes murins mâles (pointillés) et femelles (trait plein). Tous les individus montrent un arrêt des fonctions de reproduction pendant la saison sèche. Les femelles ont un important engraissement automnal et utilisent la torpeur journalière pendant la saison sèche. Les mâles, en revanche, engraisent plus tard et sur une plus longue période, au cours de la saison sèche, en prévision de la saison de reproduction suivante. Figures modifiées d’après Dammhahn & Kappeler (2008) (A) et Génin (2007) (B). (C) Illustrations de microcèbes murins en saison sèche (en haut à gauche) et humide (en haut à droite). En saison humide, les individus ont peu de graisse et leurs fonctions reproductrices sont actives. En saison sèche, les microcèbes stockent de la graisse (en particulier dans leur queue) et leurs fonctions reproductrices sont inactives. Crédit photo : Eric Gueton. Illustrations de la forêt sèche malgache de Kirindi en saison sèche(en bas gauche) et humide (en bas à droite). Crédit photo : Mélanie Dammhahn.

lorsque les jours deviennent plus longs que 12h ; Perret & Aujard 2001b). Concernant les mâles, après quatre à cinq mois passés en saison sèche (période de jours courts), ils deviennent réfractaires à la photopériode et l’inhibition saisonnière des fonctions reproductrices par la photopériode hivernale est levée.

## Reproduction

En fin de saison sèche, les mâles s'activent sexuellement, en anticipation à l'activation des fonctions reproductrices des femelles. En début de saison humide, les femelles ont une période d'oestrus de quelques heures au cours de laquelle elles s'accouplent avec plusieurs mâles (système polygynique et polyandrique, Eberle & Kappeler 2004a ; Huchard *et al.* 2012). En général, les premiers mâles à s'accoupler avec une femelle seront les pères des petits, sachant que tous les petits d'une même portée n'ont pas forcément le même père (Andrès *et al.* 2003 ; Eberle & Kappeler 2004b ; Eberle *et al.* 2007). Pour maximiser leur succès de fécondation, les mâles gardent la femelle, de manière à minimiser ses opportunités d'accouplement avec d'autres mâles. La forte compétition spermatique se traduit d'ailleurs par la production de bouchons vaginaux, constitués de spermatozoïdes et cellules épithéliales femelles, ce qui empêche probablement les accouplements ultérieurs avec d'autres mâles (Andrès *et al.* 2003 ; Eberle *et al.* 2007). Après la période d'oestrus, les mâles quittent le territoire de la femelle, en recherche d'autres femelles réceptives. Ils ne prodiguent aucun soin parental aux petits. La gestation dure deux mois et est suivie par 40 jours de lactation pendant laquelle les petits sont dépendants de la mère (Perret 2000 ; Canale *et al.* 2012). Après le sevrage, les jeunes mâles dispersent plus loin que les jeunes femelles qui sont plus philopatriques et restent à proximité du territoire maternel (Radespiel *et al.* 2001). Ces différences de comportement de dispersion sont souvent observées chez les espèces polygynes (Leturque & Rousset 2004) et ont été liées à un biais d'allocation parental en faveur des mâles répandu parmi les primates (Johnson 1988). C'est le cas chez le microcèbe où la mère prodigue plus de soins parentaux aux jeunes mâles. En cas de danger, par exemple, la mère mettra ses petits mâles à l'abri en priorité. La présence de petits mâles dans une portée stimule les comportements maternels, et la survie et la croissance des portées comprenant des mâles sont supérieures à celles des portées exclusivement composées de femelles (Perret & Colas 1997). Le contexte social de la mère influence également le sexe-ratio de sa portée, les femelles regroupées produisant en moyenne plus de petits mâles que les femelles isolées (Perret & Colas 1997 ; Perret 2005).

## Une espèce modèle pour l'étude du vieillissement

Dans la nature, comme pour de nombreuses espèces sauvages, il est difficile d'observer des individus âgés. Cependant, des études en laboratoire et d'autres plus rares en milieu naturel ont permis de décrire de nombreux mécanismes liés au vieillissement du microcèbe. Le microcèbe est devenu une espèce modèle pour l'étude du vieillissement (Fischer & Austad 2011 ; Languille *et al.* 2012). Vis-à-vis des autres espèces modèles, telles que *Drosophila melanogaster* ou *Mus musculus*, le microcèbe possède l'avantage d'être phylogénétiquement proche de l'Homme avec lequel il partage de nombreux traits génétiques, physiologiques et anatomiques et des pathologies liées au vieillissement (p. ex. le microcèbe présente des maladies similaires à celle d'Alzheimer chez les humains). Par rapport aux autres espèces de primates non-humains, il montre une espérance de vie relativement courte, même en captivité (cinq à six ans) et atteint la maturité sexuelle dès neuf mois. Cela permet une observation rapide des mécanismes de vieillissement. Ces avantages contribuent au fait que nous connaissons de mieux en mieux les modifications physiologiques, morphologiques (Figure

6.A), neurologiques, endocriniennes ou encore comportementales (pour n'en citer que cinq) liées au vieillissement chez cette espèce (voir Perret & Aujard 2006 et Languille *et al.* 2012 pour des revues). Par exemple, le vieillissement entraîne chez cette espèce des perturbations des rythmes biologiques circadiens (de l'activité locomotrice et de la température interne) et saisonniers avec une diminution de l'engraissement automnal et de l'hypométabolisme en saison sèche (Figure 6.B).

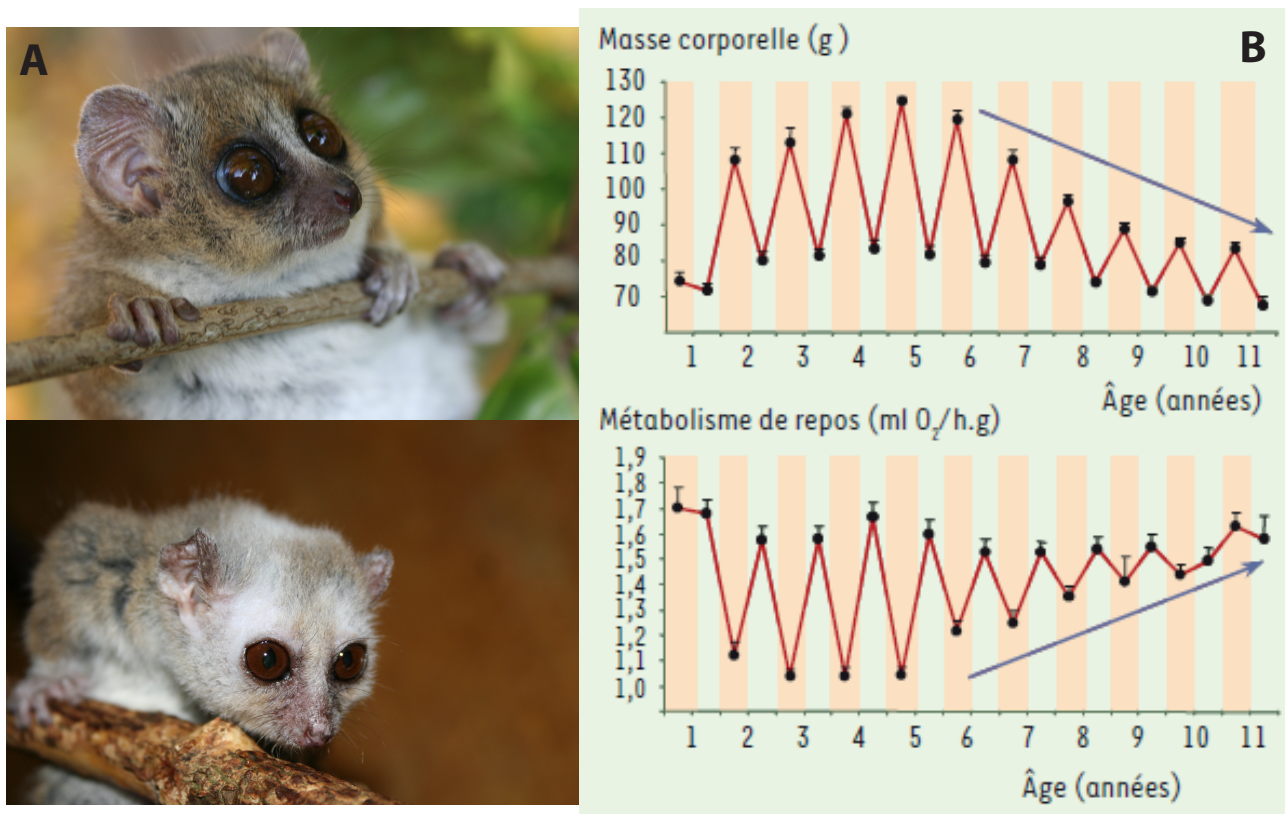


FIGURE 6 – Exemples de modifications morphologiques et physiologiques liées à l'âge chez le microcèbe murin. (A) Evolution morphologique de la face avec l'âge. Les individus âgés (en bas) montrent un raccourcissement du museau et des oreilles, un épaississement des bordures des oreilles et un blanchiment du pelage par rapport aux jeunes (en haut). Crédit photo : Eric Gueton. (B) Evolution de la masse corporelle et du métabolisme de repos avec l'âge. Les fluctuations de masse et d'activité métabolique sont très marquées au début de la vie des microcèbes mais diminuent au fur et à mesure qu'ils vieillissent. Figures modifiées d'après Perret & Aujard (2006).

## Population étudiée et base de données

### Présentation générale de l'élevage

Le site de Brunoy (France, Muséum National d'Histoire Naturelle) accueille depuis 1967 un élevage de microcèbes murins fondé à partir d'une trentaine d'individus issus de plusieurs populations du sud de Madagascar. Entre 1967 et 1972, 191 individus (49 mâles et 142 femelles) ont été capturés et importés en France. Après cette période, la colonie a été maintenue uniquement grâce à la reproduction des individus fondateurs et de leurs descendants. En 1975, M. Perret a fondé la colonie de microcèbes telle que maintenue à ce jour (et d'où sont issues les données analysées) à partir de 9

mâles et 22 femelles issus de la population de l'époque. Un nombre inconnu de mâles supplémentaires a également été utilisé ponctuellement au cours des quelques années suivantes pour la reproduction. Depuis les années 1990, la colonie a été maintenue à 400-500 individus. Cet élevage est agréé par les services compétents (élevage #E91-114-1, Direction Départementale de la Protection des Populations de l'Essone, France).

Tous les individus actuellement en vie, et tous ceux inclus dans nos analyses, descendent de cinq femelles fondatrices (et d'un nombre inconnu de mâles à cause du système de reproduction polyandrique), correspondant à environ 30 générations. A partir des cinq femelles fondatrices, six lignées maternelles ont émergé (une des cinq lignées s'est séparée en deux sous-lignées tôt dans l'histoire de l'élevage, qui peuvent être considérées comme deux lignées distinctes pour notre population d'étude). Malgré le fait que les accouplements aient été attentivement planifiés pour maximiser la variance génétique (en choisissant des individus de lignées maternelles différentes) et pour minimiser la consanguinité (en évitant les accouplements entre frères et sœurs ou entre mères et fils par exemple), la dérive génétique peut avoir joué sur la composition génétique de la population. Néanmoins, la seule étude de la diversité génétique de la colonie a révélé un niveau d'homozygotie et une variance génétique à des sites polymorphiques amplifiés aléatoirement similaires à ce qui est observé en populations naturelles (Neveu *et al.* 1998). Cette grande variance génétique peut avoir été générée à la fondation de la colonie par l'admixture de populations structurées génétiquement, et aurait été maintenue, du moins en partie, grâce à la gestion de la mise à la reproduction.

## Conditions d'élevage

Les microcèbes de la colonie ont été élevés dans les conditions les plus favorables possibles à leur croissance, survie, reproduction et équilibre social. Les salles d'élevage sont maintenues dans un environnement à température constante de 23 à 25°C (ce qui correspond à la zone thermoneutre des microcèbes, plage thermique où leur métabolisme de repos est le plus faible) et à humidité contrôlée (55% en moyenne). L'eau et la nourriture sont disponibles *ad libitum* tout au long de l'année (fruits, mixture lactée et insectes ; Figure 7), avec toutefois une restriction calorique temporaire pour les individus tendant à l'obésité (Giroud *et al.* 2008). Les microcèbes sont gardés dans des groupes de même sexe constitués de un à cinq individus par cage (Figure 7).



FIGURE 7 – Microcèbes dans leur nichoir (à gauche) et mangeant la mixture lactée qui constitue une partie de leur alimentation en captivité (à droite). Crédit photo : Eric Gueton.

Les changements physiologiques liés à l'alternance des saisons, tels que le développement de l'appareil reproducteur avant la période de reproduction ou l'usage de la torpeur, sont induits par les changements photopériodiques (Génin & Perret 2000 ; Perret & Aujard 2001b). En captivité, la saisonnalité est induite soit par les changements naturels de longueurs des jours/nuits de Paris (12,5% des individus), soit par une manipulation artificielle de la photopériode (87,5% des individus). Pour les individus exposés à la lumière naturelle, les dates des équinoxes d'automne et de printemps où la longueur du jour passe au-dessous ou au-dessus de 12h, sont les dates de changement de saison. Les individus sous lumière artificielle sont exposés à l'alternance de périodes de jours longs (périodes "LD" de l'anglais "Long Day"; 14h de lumière par jour) et de périodes de jours courts (périodes "SD" de "Short Day"; 10h de lumière par jour). Ce régime photopériodique reproduit l'alternance des saisons humides et sèches à Madagascar et les passages d'une photopériode à l'autre induit les changements saisonniers de masse, d'activité métabolique, ou encore l'activation ou désactivation de la reproduction. L'éclairage artificiel est assuré par des lampes fluorescentes froides (250-380lux). Les changements de longueur de jour sont brusques, sans transition, mais les microcèbes ne répondent aux changements de photopériode que lorsque la longueur du jour passe la limite de 12h (Perret & Aujard 2001b). Par conséquent, les individus exposés à ces changements brusques de photopériode montrent les mêmes transitions physiologiques que s'ils étaient exposés à une transition progressive. Au début de chaque saison de reproduction (période LD), des mâles et des femelles sont sélectionnés par la gestionnaire de l'élevage et regroupés dans des cages par groupes de deux à trois mâles et deux à trois femelles. Ces groupes hétérosexués sont maintenus deux à quatre semaines, jusqu'à la fin de la période d'œstrus des femelles. Les œstrus durent quelques heures au cours desquelles ont lieu les accouplements. Les mâles sont ensuite replacés dans des groupes de mâles. Au bout d'un mois à un mois et demi, un examen par palpation de l'abdomen permet d'identifier les femelles gestantes. Ces femelles gestantes sont alors isolées dans des cages individuelles, et ce pour toute la période allant de la fin de gestation jusqu'au retrait des petits (vers l'âge de 3 mois), bien au-delà du sevrage (vers 40 jours *post-partum*). Elles sont ensuite remises en groupes monosexués. Les jeunes sont regroupés le temps de leur première saison SD avant d'être attribués à des groupes d'adultes de même sexe.

## **Base de données**

Entre 1988 et le 31 décembre 2012, la date de fin de suivi pour nos études, tous les individus de l'élevage ont été suivis tout au long de leur vie (2046 individus enregistrés). Ce suivi inclut, entre autres, les informations relatives à l'identité des individus (identifiant, sexe, filiation maternelle), les dates de naissance et de décès, les circonstances de décès, les événements de reproduction des femelles (avec les caractéristiques de chaque portée) et la généalogie maternelle. Les transferts vers d'autres colonies captives ou vers des lots expérimentaux particuliers sont également reportés. La masse a été mesurée tout au long de la vie : à la naissance, à 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 et 60 jours, puis toutes les trois à quatre semaines.

Cette base de données très riche n'a jamais fait l'objet d'une analyse exhaustive auparavant. Une première étape du travail effectué au cours de cette thèse a été de vérifier les données disponibles et de les formater en vue d'analyses de suivis démographiques. Une partie des critères de vérification de la

base de données et la démarche d'identification des individus à exclure des données pour les analyses est présentée en « Supplementary Methods » dans le Chapitre 1.1.

Ces données uniques permettent d'avoir à la fois le suivi démographique détaillé de la population et des informations précises sur les caractéristiques et performances de chaque individu. Cette base de données est une occasion exceptionnelle d'étudier les compromis entre traits d'histoire de vie en combinant des données habituellement fournies par les approches expérimentales et démographiques, dans le cas d'une population captive. De plus, la biologie de l'espèce est particulièrement bien connue, notamment sa physiologie et sa chronobiologie, ce qui nous permettra de replacer nos résultats dans un contexte biologique précis.



# Analyse des données de survie

Pour analyser les données de suivi des microcèbes de la colonie captive et étudier les effets de la saisonnalité, de la reproduction et des conditions de début de vie sur leur mortalité, nous avons dû avoir recours à des méthodes statistiques relativement complexes, à la hauteur de la complexité des déterminants de la mortalité chez les microcèbes. Dans cette partie, nous exposons les principales caractéristiques (hypothèses d'application, paramétrisation) des modèles statistiques utilisés justifiant leur adéquation aux données de mortalité à analyser.

L'«analyse de l'histoire des événements», par la suite désignée par le terme plus spécifique d'«analyse de survie», est l'étude du délai de la survenue d'un événement d'intérêt, que ce soit la mort, l'apparition d'une maladie, le mariage, ou la panne d'une machine (Klein & Moeschberger 2003 ; Aalen *et al.* 2008 ; voir Encadré 1 pour une description des fonctions principales utilisées). Ces méthodes statistiques sont utilisées dans de nombreuses disciplines telles que la médecine, la démographie, la biologie, la sociologie ou encore l'industrie.

Ces méthodes permettent d'analyser des durées de survie d'individus sur une **période de suivi définie, qui ne correspond pas forcément à la totalité de leur vie**. La date d'origine correspond à la date d'entrée des individus suivis dans l'étude. Cela peut être leur date de naissance, celle du début d'une maladie, ou simplement une date arbitraire de première observation. Chaque individu peut avoir une date d'origine différente, par exemple des dates de naissance différentes. Dans le cas où un individu entre dans l'étude alors qu'il a survécu jusque-là, sa durée de vie est dite « tronquée à gauche ». La troncature indique que l'événement d'intérêt n'a pas eu lieu sur la vie de l'individu avant son entrée dans l'étude. Il n'est par ailleurs pas rare que l'étude soit stoppée avant que l'événement d'intérêt ait lieu. La date de fin du suivi individuel peut donc correspondre soit à la date d'occurrence de l'événement (dans notre cas, la mort naturelle), soit à la dernière date d'observation. Dans ce dernier cas, la durée de vie est dite « censurée à droite » (Figure 8). C'est également le cas de suivis ayant été interrompus avant la date de fin d'étude et avant la survenue de l'événement, par exemple lorsqu'un individu sort de l'élevage pour être intégré dans un autre élevage, ou dans un dispositif expérimental susceptible d'altérer son histoire de vie. Les méthodes simples d'analyse de durée de survie, telles que les tests de différence de longévités, ne permettent pas de prendre en compte ces censures et/ou troncatures. En absence de censure, cela oblige à ne travailler que sur les histoires de vie complètes (jusqu'à la mort). Lorsqu'une part importante d'individus est encore en vie à la fin de l'étude, cela biaise négativement les estimations de survie, et induit un biais temporel négatif (plus on

Deux concepts centraux sont à la base des analyses de survie : la fonction de survie et la fonction de force de mortalité (aussi appelée taux d'aléa ; Klein & Moeschberger 2003 ; Aalen *et al.* 2008).

La fonction de survie est la probabilité qu'un individu soit toujours vivant à l'âge  $t$  :

$$S(t) = Pr(T > t)$$

où  $T$  est l'âge à la mort.

La fonction de force de mortalité (« mortality hazard » en anglais) est une mesure de la propension à mourir en fonction de l'âge de l'individu (Lee & Go 1997). Plus précisément, il s'agit de la probabilité de mourir entre  $t$  et  $t+\Delta t$  (c.-à-d. dans l'intervalle de temps  $\Delta t$ ) sachant que l'individu a survécu jusqu'à l'âge  $t$  :

$$h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} P(t \leq T < t + \Delta t \mid T \geq t).$$

Le taux de hasard cumulé est l'intégrale de la force de mortalité :

$$H(t) = \int_0^t h(u) du$$

et peut être mis en relation avec la fonction de survie :

$$S(t) = e^{-H(t)}.$$

### Encadré 1 – Fonction de survie et fonction de force de mortalité

s'approche de la fin de l'étude, plus les individus semblent mourir jeunes). Il se pourrait également que, à âge égal, les individus encore en vie à la fin de leur suivi aient une qualité intrinsèque meilleure (dits 'robustes') que ceux déjà morts. Les exclure des données entraîne une sur-représentation des individus les plus fragiles, et un biais négatif sur l'estimation de la probabilité de survie. Les analyses de survie avec censure/troncature permettent donc d'éviter au maximum des biais d'échantillonnage liés à une évolution de la mortalité avec l'âge (ou le temps, ou des différences de qualité intrinsèque), tout en maximisant la puissance statistique, puisque l'intégralité des individus est utilisée (Leung *et al.* 1997).

Ces méthodes sont donc les plus adaptées à l'analyse des suivis longitudinaux des microcèbes de la colonie captive. Notre événement d'intérêt est la mort de causes naturelle, et donc liée au vieillissement des individus (par la suite, l'événement d'intérêt sera donc désigné comme la mort des individus). Tous les individus ont été suivis depuis leur naissance jusqu'à leur mort (naturelle ou non) ou une date de dernière observation en cas de transfert ou si elle correspond à l'arrêt du suivi par exemple (voir Modèle biologique). Les dates de morts considérées comme non naturelles et celle de dernière observation sont des dates de censures : 51% des individus suivis ont dû être censurés. Les exclure de l'étude aurait diminué de moitié la taille d'échantillon, avec un risque fort de générer des biais d'estimation de la mortalité.

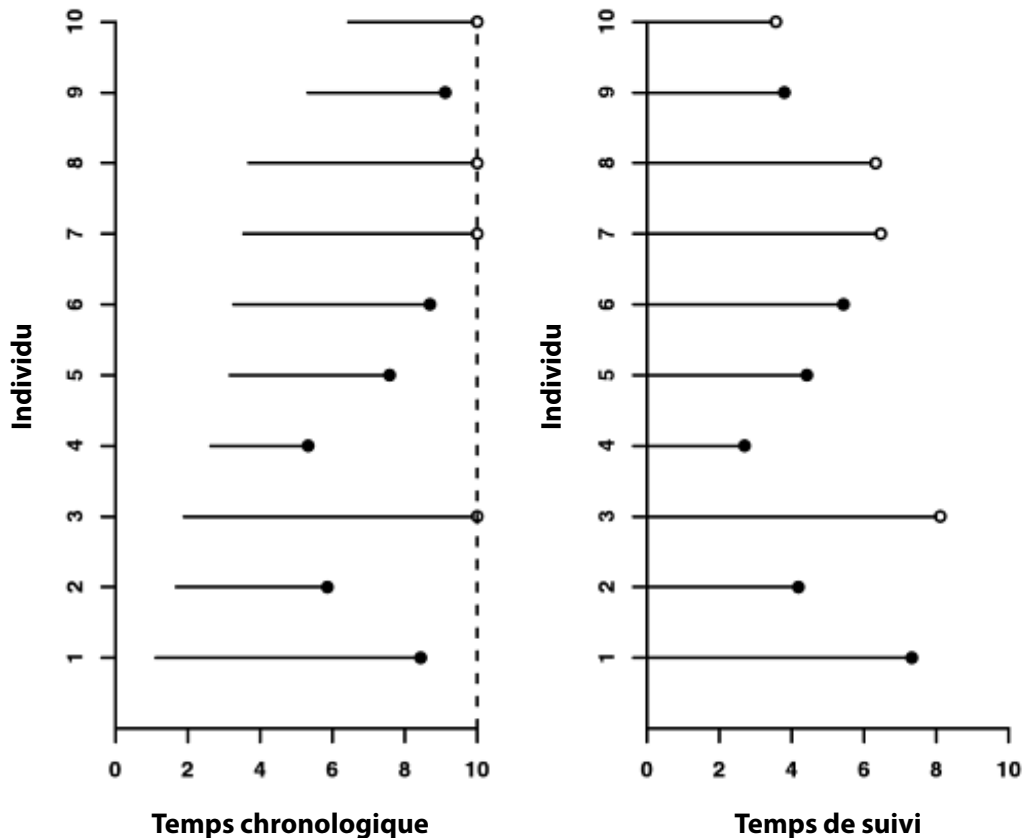


FIGURE 8 – Exemple du suivi de 10 individus. Les périodes d’observations sont placées dans le temps chronologique (à gauche) et à l’échelle de la durée de l’étude où le temps 0 correspond au début de chaque suivi. Les ronds pleins indiquent les événements et les cercles vides les censures. La ligne verticale en pointillés correspond à la date de fin du suivi. Figure adaptée d’après Aalen *et al.* (2008).

Un autre avantage de ces méthodes est qu’elles nous permettent de prendre en compte la **périodicité de la mortalité individuelle liées à la saisonnalité** des microcèbes. En effet, les individus exposés à différents régimes photopériodiques entrent et sortent des saisons à des âges différents. Nous avons donc utilisé des modèles dits « time-varying », c’est-à-dire qui permettent de faire varier dans le temps l’effet de la saison sur la mortalité. Pour cela, nous avons découpé les durées de vie de chaque individu de sorte que les dates de début et de fin des saisons correspondent respectivement à des dates de troncation et de censure (s’ils entrent ou sortent d’une saison, c’est que les individus sont toujours vivants). Le temps passé dans chaque saison représentera ainsi une durée de vie analysée indépendamment des autres.

## Modèle de survie non-paramétrique

L'estimation de la fonction de survie de Kaplan-Meier (KM) est non-paramétrique et permet d'estimer la fonction de survie à partir des données brutes. Cette méthode repose sur l'hypothèse que survivre après un temps  $t$ , c'est être en vie juste avant  $t$  et ne pas mourir au temps  $t$ . La méthode de KM estime la probabilité de mourir pour chaque intervalle de temps (c.-à-d. entre chaque date de mort d'un individu), en supposant que la force de mortalité est constante sur les intervalles.

Le grand avantage de l'estimation de KM est de représenter la survie réelle des individus, sans faire d'hypothèse sur la forme du patron de mortalité. Elle permet également de tester les effets de variables bivariées sur la survie (comme le sexe). Cependant, à notre connaissance, les tests existants ne sont pas applicables à des données tronquées. D'autre part, cette méthode ne permet pas de prendre en compte la périodicité de la survie des microcèbes due à leur saisonnalité. Enfin, nous avons besoin d'autres méthodes qui nous permettent de déterminer les effets de plusieurs facteurs d'intérêt (dont des variables continues) et de variables d'ajustement sur la mortalité.

Cette méthode n'a donc été utilisée que pour explorer de manière préliminaire les patrons de mortalité avec le temps ou l'âge, et entre groupes d'individus, et pour évaluer l'adéquation des patrons modélisés à l'aide de méthodes paramétriques (présentées ci-après) aux patrons observés sur les données brutes.

## Modèles semi-paramétriques de Cox

Les modèles semi-paramétriques de Cox (Klein & Moeschberger 2003) permettent de décrire les trajectoires de survie au cours de la vie des microcèbes et d'analyser la manière dont des variables explicatives modifient leur mortalité. C'est la principale méthode que nous avons utilisée pour modéliser l'effet de la saisonnalité, de la reproduction et des conditions de début de vie sur la mortalité des microcèbes.

Les modèles de Cox sont les modèles les plus utilisés en analyse de survie. L'utilisation d'une méthode semi-paramétrique permet de ne pas contraindre la forme de la force de mortalité de base (« baseline mortality hazard » en anglais), ce qui permet d'analyser la mortalité sans définir les trajectoires de mortalité avec l'âge. Les modèles de Cox reposent sur l'hypothèse que les effets des différentes covariables sur la force de mortalité sont proportionnels (hypothèse de PH, de « Proportional Hazards » en anglais). La fonction de force de mortalité est définie telle que :

$$h(t | x) = h_0(t) \cdot e^{\beta x}$$

où  $h_0(t)$  est la force de mortalité de base (dont la distribution n'est pas définie),  $t$  le temps jusqu'à la mort ou à la censure et  $\beta$  le paramètre qui quantifie l'association entre la covariable  $x$  et le temps jusqu'à la mort.

Il est possible que les effets de certaines covariables ne soient pas proportionnels mais dépendent de l'âge des individus. Dans ce cas, les modèles de Cox ne vérifient pas l'hypothèse de PH et il est nécessaire d'utiliser des modèles paramétriques.

## Modèles de survie paramétriques

Les modèles de survie paramétriques (Klein & Moeschberger 2003) nous ont permis d'identifier la fonction décrivant au mieux la trajectoire de la mortalité avec l'âge. Ils nous ont également été nécessaires pour caractériser les effets de la saisonnalité, de la reproduction et des conditions de début de vie sur la mortalité des microcèbes lorsque leurs effets dépendaient de l'âge des individus.

Les modèles de survie paramétriques posent l'hypothèse que la force de mortalité de base suit une distribution donnée. Dans nos analyses, nous avons testé les distributions de Gompertz, Weibull, Lognormal, Loglogistic (Klein & Moeschberger 2003). Ces distributions décrivent les trajectoires de mortalité de plusieurs espèces de mammifères (p. ex. Ricklefs & Scheuerlein 2001 ; Gaillard *et al.* 2004 ; Bronikowski *et al.* 2011).

Contrairement aux modèles de Cox qui postulent que les covariables ont le même effet au cours du temps (i.e. indique uniquement si des individus meurent plus ou moins selon les valeurs des covariables), les modèles paramétriques nous permettent de prendre en compte les interactions de ces effets avec le temps. Ils peuvent supposer l'hypothèse de PH (modèles PH ; versions paramétriques des modèles de Cox) ou permettre aux effets des covariables sur la mortalité de varier avec le temps (modèles AFT de « accelerated failure time models » en anglais). La comparaison des modèles PH et AFT permet donc de déterminer si une covariable a un effet proportionnel sur la mortalité, ou si cet effet évolue avec l'âge (exemple Figure 9).

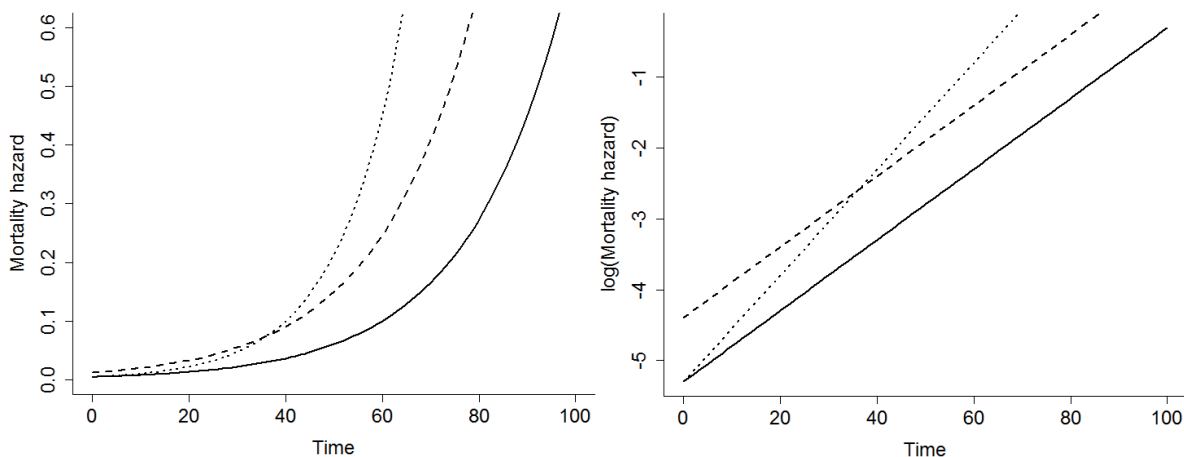


FIGURE 9 – Exemple d'une fonction de force de mortalité suivant une distribution de Gompertz (plein) et deux modifications de cette fonction, soit dans le cas d'un effet PH (tirets ; modification du paramètre de forme) ou d'un effet AFT (pointillés ; modification du paramètre d'échelle).

Une des difficultés de modélisation des données de mortalité chez les microcèbes rencontrée au cours de cette thèse est qu'il n'existe aucun modèle de survie capable de combiner une périodicité de la survie (effet des saisons), des variables aux effets proportionnels sur la survie (p. ex. effet de cohorte), et d'autres responsables d'une accélération de la sénescence (p. ex. effet du rythme de la saisonnalité). Nous avons donc dû construire un modèle de survie (dénommé 'modèle PH-AFT', Encadré 2) périodique, qui prend en compte des variables avec un effet proportionnel (comme les variables d'ajustement), et d'autres pouvant varier avec le temps. Cette approche statistique originale a été développée en collaboration avec C. G. Camarda (Chargé de recherche, Institut National d'Etudes

Démographiques). Notre modèle a été validé à l'aide de simulations (résultats non présentés). Au-delà de permettre la meilleure adéquation aux données, ce modèle PH-AFT a également l'intérêt d'avoir une puissance statistique maximale.

Le modèle PH-AFT est présenté ici dans le cas d'une force de mortalité de base suivant une distribution de Gompertz : Dans le cas d'un modèle PH :

$$h(t | z) = a.e^{b.t}.e^{\alpha'z}$$

Dans le cas d'un modèle AFT :

$$h(t | x) = e^{\beta'x}.a.e^{b.t.e^{\beta'x}}$$

où  $a$  et  $b$  sont les paramètres de forme et d'échelle de la distribution de Gompertz,  $t$  est le temps à la mort ou à la censure, et  $\alpha'z$  et  $\beta'x$  sont les paramètres des modèles PH et AFT respectivement (avec  $\alpha$  et  $\beta$  les coefficients correspondant aux valeurs des covariables  $z$  et  $x$ ). Afin de pouvoir incorporer dans un même modèle des effets de covariables à effet proportionnel et variant au cours du temps, nous avons combiné les deux fonctions. Dans ce nouveau modèle, la force de mortalité est définie par :

$$h(t | x, z) = a.e^{b.t.e^{\beta'x}}.e^{\alpha'z}.e^{\beta'x}$$

La fonction de vraisemblance correspondant pour des données tronquées à gauche et censurées à droite est :

$$L(\beta, \alpha, \theta) = \prod_{i=1}^n \frac{h(Y_i | x, z)^{\delta_i} \cdot S(Y_i | x, z)}{S(W_i | x, z)}$$

où  $\theta$  représente les paramètres de la distribution choisie ( $a$  et  $b$  pour Gompertz),  $Y_i$  et  $W_i$  sont les temps correspondant à la censure et la troncation pour la  $i^{\text{ème}}$  observation respectivement, et  $\delta_i$  indique si la mort est observée ( $\delta_i=1$ ) ou pas ( $\delta_i=0$ ).

Pour notre modèle PH-AFT, la fonction de vraisemblance peut donc s'écrire :

$$L(\beta, \alpha, \theta) = \prod_{i=1}^n \frac{[h_0(Y_i^a, \theta) \cdot e^{\beta'x} \cdot e^{\alpha'z}]^{\delta_i} \cdot [S_0(Y_i^a, \theta)]^{e^{\alpha'z}}}{[S_0(W_i^a, \theta)]^{e^{\alpha'z}}}$$

avec  $Y_i^a = Y_i.e^{\beta'x}$  et  $W_i^a = W_i.e^{\beta'x}$ .

## Encadré 2 – Modèle PH-AFT

Malgré les avantages des modèles paramétriques, nous aurons tendance à favoriser les modèles de Cox dans le cas où nous cherchons uniquement les effets de covariables sur la mortalité, sans s'intéresser à la forme de la fonction de force de mortalité de base. Les modèles de Cox sont plus flexibles et plus puissants que les modèles paramétriques. De plus, les modèles paramétriques peuvent rencontrer des difficultés pour caractériser la forme de la fonction de force de mortalité ou des problèmes de convergence. C'est pourquoi les modèles paramétriques ne seront utilisés que pour caractériser la fonction de force de mortalité des microcèbes et en cas de non-proportionnalité des effets des covariables.

# Chapitre 1

## Saisonnalité et mortalité

### Objectif et résumé

L'objectif de ce premier chapitre est d'étudier le lien entre l'alternance des saisons et la mortalité chez une espèce saisonnière. Le microcèbe murin est une espèce saisonnière dont la mortalité fluctue en fonction des saisons (voir Modèle biologique). Pourtant, le patron de mortalité de cette espèce n'a jamais été décrit précisément (Kraus *et al.* 2008 ; Languille *et al.* 2012), et les effets de l'âge, du sexe et de la saison sur la mortalité n'ont pas encore été analysés conjointement. Après avoir décrit la mortalité des microcèbes de la colonie captive, nous avons étudié l'influence du rythme d'alternance des saisons et celle du déséquilibre de longueur des saisons sur leur mortalité. Cela nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, que les transitions physiologiques entre saisons sont coûteuses et représentent un risque de mortalité majeur pour les espèces saisonnières.

Ce premier chapitre s'articule autour de trois étapes : (i) la caractérisation de la mortalité par âge, par sexe et par saison du microcèbe murin en captivité ; (ii) l'étude de l'effet de l'accélération du rythme des saisons sur la mortalité et le vieillissement ; (iii) l'étude de l'effet du déséquilibre de longueur des saisons sur la mortalité et le vieillissement.

(i) Caractérisation de la mortalité par âge, par sexe et par saison du microcèbe murin en captivité.

Dans cette partie, nous avons utilisé les données disponibles concernant les individus suivant un régime photopériodique de deux saisons de six mois par an, proche de celui observé *in natura*, afin de caractériser la mortalité par âge, par sexe et par saison du microcèbe murin en captivité sous des conditions normales de saisonnalité. Ce travail est présenté dans les 'Supplementary Methods 5.1' du Chapitre 1.1. A notre connaissance, il s'agit de la description la plus fine de la trajectoire de mortalité d'un organisme saisonnier.

Nous avons montré que la mortalité des mâles et des femelles augmente avec l'âge selon une loi de Gompertz ( $h(t) = a.e^{b.t}$  avec  $a = 1,2.10^{-4}$  et  $b = 1,2.10^{-3}$  où  $h(t)$  est le risque de mourir à l'âge  $t$ ). Nous montrons également que, comme *in natura*, la mortalité des individus en captivité est plus importante en saison de jours longs (période de reproduction, LD) qu'en saison de jours courts

(période d'inactivité, SD). Ces résultats sont en accord avec une précédente analyse de la mortalité des microcèbes de la colonie captive, basée sur l'analyse des longévités, (Languille *et al.* 2012), et avec les observations *in natura* de nombreuses espèces (Kraus *et al.* 2008 ; p. ex. Gogarten *et al.* 2012 pour d'autres espèces de primates). En milieu naturel, les fluctuations de la mortalité sont liées à trois principaux phénomènes : la fluctuation de la disponibilité des ressources entre saisons (induisant un potentiel effet de dépendance à la densité), les coûts liés à la reproduction saisonnière, et les variations de pression de prédation et de transmission de pathogènes. Dans le cadre de la colonie captive, l'apport de nourriture est *ad libitum*, la reproduction est contrôlée (et sans coût, voir Chapitre 2), la prédation est absente, la pression parasitaire est absente ou contrôlée, et la compétition intra-spécifique est minimisée par une révision régulière des associations d'individus par cage. Les autres conditions abiotiques d'élevage (température, humidité) sont maintenues constantes, dans la gamme la plus favorable à l'espèce. Les fluctuations de la mortalité entre les saisons sont donc uniquement dues à la persistance en captivité de changements physiologiques et comportementaux dépendant de la photopériode et résultant de l'adaptation de l'espèce à son environnement saisonnier (voir Modèle biologique).

Ces fluctuations saisonnières de la mortalité sont sexe-spécifiques. Les femelles montrent des variations saisonnières de la mortalité plus larges que les mâles : elles meurent moins en SD que les mâles, mais plus en LD (Languille *et al.* 2012). Ces résultats contrastent avec les observations faites en milieu naturel où les mâles survivent moins en saison LD que les femelles, et où la mortalité en SD n'est pas sexe-spécifique (Kraus *et al.* 2008). Cela peut s'expliquer par le fait qu'en captivité, les mâles sont exposés au seul coût énergétique de la reproduction, sans l'exposition aux sources de mortalité extrinsèques liées à la compétition mâle-mâle pour l'accès aux femelles (particulièrement élevées chez les espèces polygynandriques comme le microcèbe murin).

Finalement, nous avons testé et montré que l'amplitude de ces variations saisonnières est proportionnelle au niveau de la mortalité par âge : plus les individus vieillissent, plus l'amplitude des variations saisonnières de la mortalité augmente. Ces résultats étaient attendus car plusieurs études ont montré que les mécanismes physiologiques liés à la maintenance et la réparation de l'organisme sénescent avec l'âge des individus (p. ex. moins bonne régulation de la température interne et de la torpeur avec l'âge ; Terrien *et al.* 2008). Nos résultats quantifient pour la première fois les conséquences de cette sénescence physiologique sur la sénescence actuarielle de l'organisme.

Ce travail de caractérisation du patron de mortalité de référence pour le microcèbe murin en captivité sera publié en annexe de l'article correspondant au Chapitre 1.1. Nous tenons à ce qu'il soit publié car il servira de référence pour les travaux futurs sur l'espèce, et sera à disposition pour de futures analyses de démographie comparative.

(ii) Effet de l'accélération du rythme des saisons sur la mortalité et le vieillissement.

Ce travail est dans la continuité, mais également un hommage, au travail initié dès les années 1990 par Martine Perret. En effet, ses travaux précurseurs dans le domaine de la chronobiologie ont montré qu'une accélération du rythme saisonnier implémenté en laboratoire (c.-à-d. une augmentation de la



fréquence des changements saisonniers) conduit à une émergence précoce des phénotypes liés à l'âge (Perret 1997, puis Aujard *et al.* 2001 ; Cayetanot *et al.* 2005). Elle montre en outre que les individus accélérés avec sur-représentation du temps passé en saison LD (alternance de trois mois de SD et cinq mois de LD) ont un âge médian au décès significativement plus précoce que les individus non-accelérés (exposés à l'alternance de six mois de SD et six mois de LD).

Dans cette partie, nous avons entrepris de caractériser plus finement les effets de l'accélération des rythmes saisonniers sur la mortalité, en incluant la totalité des individus de la colonie, y compris ceux encore vivants (et après application de critères de sélection objectifs). Ce travail fait l'objet d'une publication soumise au journal *Nature*.

Plus précisément, nous avons émis l'hypothèse que les transitions saisonnières sont des épisodes de reconfigurations physiologiques majeures conduisant à l'accumulation de dommages et des dérégulations potentielles entre fonctions physiologiques. De ce fait, ces transitions saisonnières auraient un coût ultime en termes de mortalité. Nous avons testé cette hypothèse en analysant la mortalité de 729 individus soumis à une large gamme de rythmes saisonniers (de deux à cinq saisons par an). Nous montrons que la mortalité est une fonction linéaire du rythme saisonnier. Par exemple, les individus soumis à un rythme de trois saisons par an, au lieu de deux, voient leur mortalité multipliée par trois à quatre. En revanche, l'espérance du nombre de saisons vécues reste constante, quelle que soit l'accélération du rythme saisonnier. Ces résultats montrent que l'accélération des rythmes saisonniers désynchronise l'âge biologique (le nombre de saisons vécues) de l'âge chronologique (le temps vécu), et entraîne une accélération du vieillissement. De plus, nous montrons que l'accélération de la fréquence des saisons accélère le vieillissement de l'organisme tout au long de la vie des femelles, mais que cet effet s'érode chez les mâles aux grands âges (après la demi-vie). Or cette érosion corrèle avec la diminution de la capacité des mâles accélérés à opérer des changements de masse entre les saisons (Supplementary Methods 7) alors que les femelles ne sont pas sujettes à ce déclin. L'amplitude des changements de masse opérés lors des transitions semble donc être un indicateur important du coût des transitions en termes de mortalité. Les transitions physiologiques saisonnières représentent donc un risque de mortalité majeur pour les espèces saisonnières et la vitesse de la sénescence de la mortalité dépend du rythme saisonnier chez le microcèbe en captivité.

(iii) Effet du déséquilibre de longueur des saisons sur la mortalité et le vieillissement.

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer les conséquences d'un déséquilibre saisonnier en faveur de la saison de reproduction, c'est-à-dire d'un rythme saisonnier où les saisons LD sont plus longues que les saisons SD. La saison SD correspond à la saison d'inactivité pour les microcèbes qui utilisent des mécanismes d'économie d'énergie et de maintenance de l'organisme (utilisation de la torpeur et engraissement). Nous avons émis l'hypothèse qu'une diminution du temps passé en SD entraînerait une diminution du temps disponible à la maintenance et à la réparation de l'organisme, ce qui se traduirait par une mortalité plus importante. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons analysé la mortalité des individus utilisés pour l'étude du Chapitre 1.1 qui sont exposés à des rythmes saisonniers équilibrés, auxquels ont été ajoutés 152 individus exposés à des rythmes sai-

sonniers déséquilibrés. Contrairement à notre attendu, cette étude démontre qu'une accélération du rythme saisonnier, accompagnée d'un déséquilibre saisonnier (réduction du temps passé en période de repos relativement à la période de reproduction), n'induit pas de risque de mortalité supplémentaire. De fait, dans cette analyse, les individus avec accélération et déséquilibre saisonnier ont une mortalité qui semblerait plus faible que les individus accélérés, et même que les individus références. Ce très faible risque de mortalité chez les individus accélérés et en déséquilibre saisonnier n'a pas d'explication évidente. Nous avons ré-évalué les biais que nous aurions pu induire lors de la sélection des individus (Discussion), mais aucun biais ne nous est apparu.

Ce résultat est d'autant plus surprenant qu'il va à l'encontre des résultats de Perret (1997), qui avait comparé la survie d'individus de référence avec des individus accélérés et en déséquilibre saisonnier à partir des données de longévité. Cette étude montrait que l'accélération avec déséquilibre induisait une mortalité plus élevée que chez les individus de références.

Il s'avère que les modèles utilisés ne permettent peut-être pas formellement de prendre en compte le déséquilibre saisonnier. Les graphiques diagnostiques des modèles testés montrent des écarts importants à la linéarité des covariables explicatives. Les informations données par les modèles sélectionnés s'avèrent en outre instables (coefficients des variables différents au niveau de leur sens, amplitude et significativité entre les meilleurs modèles). Cette partie présente néanmoins l'intérêt de nous permettre de discuter les limites de nos données ainsi que celles des procédures statistiques utilisées. Par exemple, nous discutons les problèmes liés à l'utilisation des modèles de Cox (voir partie Analyses des données de survie) dans le cas de l'analyse, non pas de l'action d'un état variable dans le temps sur la mortalité (ce pour quoi les modèles de Cox « time-varying » ont été développés), ni de l'effet de la fréquence de ces changements d'état sur la mortalité (comme dans le cas de l'accélération des rythmes saisonniers, voir Chapitre 1.1), mais des effets combinés de la fréquence et de l'irrégularité des changements d'état sur la mortalité (cette analyse). Ces modèles sont adaptés pour prendre en compte la saisonnalité (quel que soit le rythme saisonnier, et donc adaptés pour l'analyse des groupes Référence et Accéléré), mais ils ne peuvent peut-être pas intégrer formellement le fait que pour les accélérés avec déséquilibre saisonnier, le temps passé dans chaque saison est différent. Le résultat difficile à expliquer que nous obtenons est peut-être le résultat de ce manque d'ajustement du modèle au processus biologique à modéliser. Le développement d'un modèle adapté, et/ou un examen du biais induit à l'aide de simulations, serait à envisager, afin d'évaluer la robustesse des conclusions préliminaires sur cette étude.

## 1.1 Effet de l'accélération du rythme des saisons sur la mortalité et le vieillissement

Cet article est actuellement soumis au journal Nature :

### **Seasonal transitions : a major mortality risk for seasonal species**

Julie LANDES<sup>1,2</sup>, Pierre-Yves HENRY<sup>2</sup>, Isabelle HARDY<sup>2</sup>, Carlo-Giovanni CAMARDA<sup>3</sup>, Martine PERRET<sup>2</sup>, Samuel PAVARD<sup>1</sup>

1- Eco-Anthropologie et Ethnobiologie, UMR 7206 CNRS, MNHN, Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75005 Paris, France ; 2- Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Sorbonne Universités, CNRS, MNHN, 91800 Brunoy, France ; 3- Mortalité, santé, épidémiologie, UR 05 INED, 75980 Paris, France

Ageing results from the accumulation of multifactorial damages over the life of an organism (López-Otín *et al.* 2013). How these damages distribute in time and explain the non-monotonous increase of mortality with age is unknown (Jones *et al.* 2014). In seasonal species, the transitions between seasons are critical periods of massive, simultaneous modifications of physiological functions (Ruf *et al.* 2012). During favourable seasons, organisms use the plentiful resources to reproduce, whereas metabolism is down-regulated during the rest of the year to maximize the chances of survival. We hypothesize that these recurrent episodes of physiological reconfiguration come at the cost of an accumulation of organismal damages and misregulations, which in turn compromise survival prospects. We thus tested whether captive small primates exposed to an experimentally increased frequency of transitions die faster than individuals living under natural seasonality. We show that the number of seasons lived is independent of the pace of seasonal alternation, whereas the mortality of individuals compelled to perform one additional seasonal transition per year is increased 3 to 4 fold. Accelerating the frequency of seasonal transitions also leads to faster ageing throughout the lifespan in females, whereas the mortality of males stabilizes after mid-life. The erosion of ageing in males matches the reduction in their physiological responsiveness to seasonal transitions over time (i.e., reduced autumnal fattening), whereas females maintain large, seasonal body mass fluctuations throughout their life. Together, these results demonstrate that physiological transitions between periods of high and low metabolic activities represent a major mortality risk in seasonal organisms : the pace of ageing depends on the pace of seasonality.

Ageing is a deterioration of physiological functions leading to an increase of mortality with age (Vaupel *et al.* 1998 ; Lopez-Otin 2013). Ageing patterns are very diverse across the tree of life (Jones *et al.* 2014) and lifespan ranges from days to centuries. To apprehend the biological processes responsible for this diversity, it is necessary to understand when deteriorations occur during an organism's life and which internal and environmental constraints cause these deteriorations.

In seasonal organisms, transitions between physiological states are driven by the variations of resources availability and/or climatic constraints between seasons (Gwinner 1986 ; Ruf *et al.* 2012). Organisms shift between a resilience hypometabolic state during the unfavourable season, and a fully active reproductive state during the favourable season. Reproduction timing is selected so that the burst of metabolic expenditure imposed by reproduction matches with the annual peak(s) of resource availability. The rest of the time, behaviour and physiology are modulated so that biological maintenance is secured, and chances of survival until the next reproductive opportunity are maximized. Transitions between seasons compel therefore an extensive remodelling of organismal biology, with simultaneous, pleiotropic activations and deactivations of most physiological functions. But are these transitions costly for the organism ?

In complex, organic and inorganic dynamic systems, transitions between inactive and active states indeed lead to the accumulation of irreparable damages and systems' ageing (Escobar & Meeker 2006). For instance, computers or cars have a high risk of breaking-down at starting-up or switching-off. In species exhibiting complex life cycles, mortality aggregates at each transition between development stages (Horvitz & Tuljapurkar 2008). We hypothesize that, in seasonal species, damages would peak at the transition between seasons. Seasonal physiological transitions may be costly through the accumulation of unrepaired DNA, cellular and organismal damages (López-Otín *et al.* 2013), and imperfect seasonal regulations between competing functions (e.g. reproduction versus energy-saving processes ; Ricklefs & Wikelski 2002). An indirect evidence of the cost of these misregulated transitions, and its potential role in ageing, is that circannual rhythms desynchronize between biological functions in old individuals (known as 'desynchronization syndrome' ; Brock 1991). Here, we hypothesize that seasonal transitions between drastically different metabolic states increase mortality, together with the metabolic load that accumulates as the organism chronologically ages (i.e. the consensual main biological mechanism for ageing ; Selman *et al.* 2012).

To test for this transition-based theory of ageing, we analysed the mortality over age of captive grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*) artificially exposed to different speeds of alternation between seasons (hereafter called seasonal rhythm), ranging from two to five seasons per year. The grey mouse lemur is a small primate living in a highly seasonal habitat, the dry tropical forests of Madagascar, where the environment alternates between abundance of resources during the wet season and pronounced food and water shortage during the dry season (about six months each ; see Supplementary Methods 1). During the dry season, mouse lemurs mainly remain inactive in their shelter and drastically reduce their metabolic needs by daily torpor use (Schmid 2001 ; Vuarin *et al.* 2013a). They also fatten at the end of the wet season and consume this stocked energy to survive the unfavorable caloric and hydric restrictions of the dry season (Génin & Perret 2000). These seasonal metabolic and behavioural changes are synchronized by the change in day length between long-day wet seasons and short-day dry seasons. More precisely, exposure to short day length induces inactivity and an endocrine shift to temporary, controlled hypometabolism and hypothermia (Ruf & Geiser 2014), as well as fat-based metabolism. By contrast, long days induce the endocrine return to permanent normothermia, regular locomotor activity, and reproduction.

In captivity, the natural photoperiodic regimen is reproduced by alternating six months of long

days (hereafter called LD periods ; 14 hours of light per day) and six months of short days (hereafter called SD periods ; 10 hours of light per day ; Perret 1997). This alternation triggers similar metabolic and behavioural changes than those observed in natura, although food and water were provided ad libitum all year long. It has been previously shown that experimental reductions of the duration of LD and SD seasons, i.e. accelerated seasonal rhythms, induce an earlier emergence of age-related phenotypes, such as morphological modifications or circadian rhythm disorders (Aujard *et al.* 2001 ; Cayetanot *et al.* 2005), but the effects on mortality trajectories over age are still unknown (Perret 1997).

We analysed a 19-year dataset of monitoring of a captive grey mouse lemur colony, containing individuals exposed to a natural (N = 576 reference individuals ; 3984 seasons) or an accelerated seasonal rhythm (N = 153 accelerated individuals ; 1146 seasons ; see Supplementary Methods 2 and 3). Only fully grown and sexually mature individuals were considered. Reference individuals were maintained throughout their life under a natural-like seasonal rhythm of two 6-month seasons per year (LD/SD durations ratio :  $1.00 \pm 0.04$ ). Accelerated individuals were kept under seasonal rhythms ranging from 3 to 5 seasons per year (Figure 1.1), with similar durations of LD and SD seasons (LD/SD :  $1.12 \pm 0.09$ ). The effect of seasonal rhythm on mortality through age, for each season and sex, was analysed with semi and fully parametric time-varying event history analyses that allowed accounting for the periodicity of mortality due to seasonality (see Supplementary Methods 4 and 5).

We found that acceleration of seasonal rhythm linearly increases mortality (see Supplementary Methods 5). When exposed to an additional season per year, females and males exhibit a risk of death respectively 3 and 4 times higher than reference individuals (Figure 1.2). This leads to a decrease in the remaining life expectancy of young adults from 4.1 to 2.8 years for females and from 4.8 to 3.3 years for males. Strikingly, the expected numbers of seasons lived by reference and accelerated individuals are about the same : 8 seasons for females and 10 for males. The number of lived seasons is therefore a better predictor of mortality than chronological age. We also found that increased mortality of accelerated individuals does not occur in one specific season, which would have been expected, for example, if increased mortality was the product of an increased frequency of reproductive events (see Supplementary Methods 5, and 6 for robustness to the incorporation of reproduction into the analysis). The deleterious effect of seasonal rhythm on mortality results therefore from an increased frequency of damaging transitions between seasons.

Accelerated mouse lemurs age faster : they exhibit earlier apparition of biomarkers of physiological ageing (Aujard *et al.* 2001 ; Cayetanot *et al.* 2005), leading to earlier death (our results). One of the physiological changes arising between seasons is large fluctuations of body mass, body mass nearly doubling between LD and SD seasons. But the ability of male lemurs to fatten before SD periods declines as they age (see Supplementary Methods 7 and Hämäläinen *et al.* 2014) and this decline is much faster in accelerated than in reference males. Past 3.5 years old, accelerated males exhibit little seasonal body mass variations (see Supplementary Methods 7), what strikingly coincides with the reduction of sensitivity of mortality to seasonal acceleration (Figure 1.2). By contrast females' body mass continues to seasonally fluctuate throughout their life, and the mortality of accelerated females continues to increase proportionally to the number of seasons lived per year. This difference between

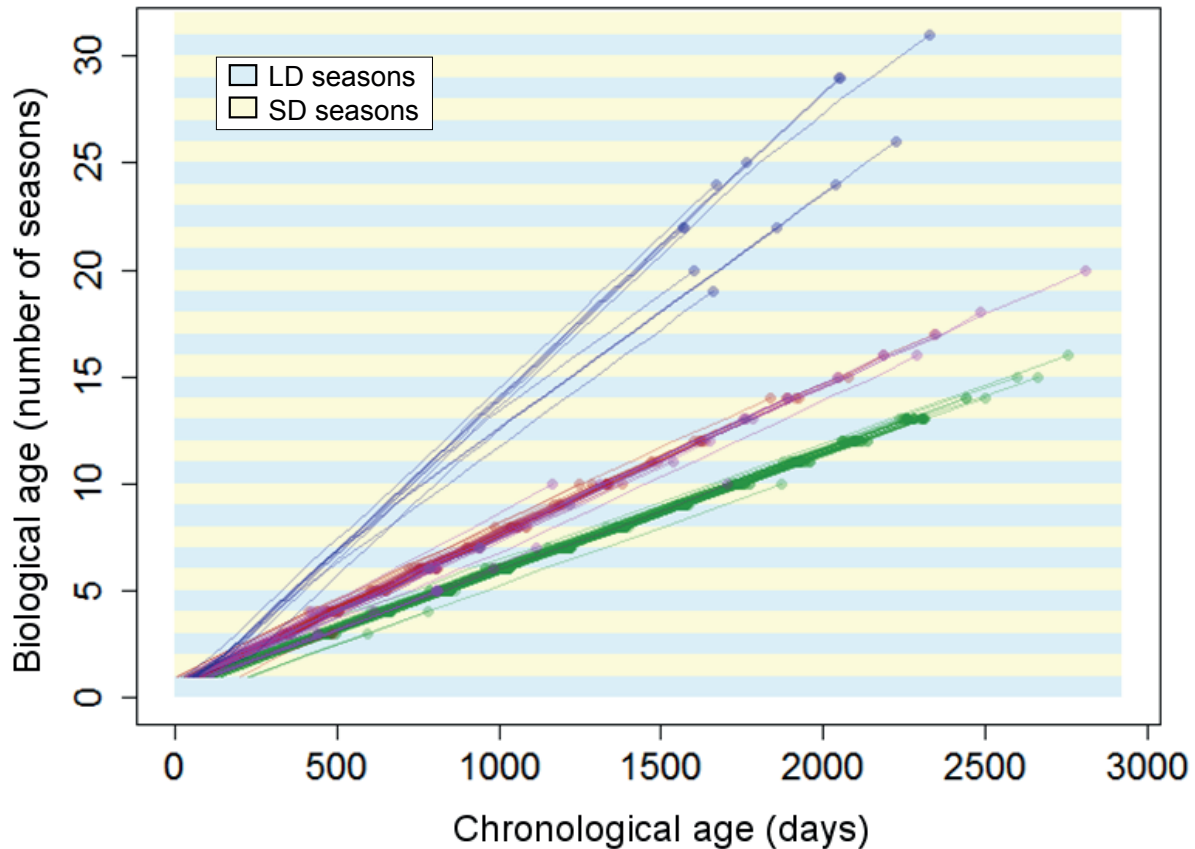


FIGURE 1.1 – **Link between chronological age (in number of days) and biological age (in number of seasons) according to seasonal rhythm.** Biological age equals chronological age in reference individuals (in green, 2 seasons per year), whereas biological age increases faster than chronological age in experimentally accelerated individuals (2 to 3 seasons per year in purple and brown ; 4 to 5 seasons per year in blue ; see Supplementary Methods 3). Each line corresponds to the trajectory of a single individual across the different seasons. Each dot represents the last season lived by a given individual whether it is dead or censored at this age (see Supplementary Methods 2).

sexes in mortality and body mass life-long patterns further supports our hypothesis of a major role of seasonal transitions in shaping mortality trajectories.

To conclude, in mouse lemurs, biological age depends both on the number of transitions they experienced and on the number of years they have lived, what supports our transition-based theory of ageing. We demonstrate for the first time the fundamental role played by sudden transitions between metabolic states in ageing, and that organisms can age not only gradually, but also suddenly, over short periods of time. This questions the view of ageing as a continuous accumulation of damages and emphasizes the role of metabolic transitions in desynchronizing the biological and chronological ages of an organism : at a same age, individuals that underwent large metabolic fluctuations are biologically older than individuals with stable, regular metabolic output. The actual proximate (physiological) mechanisms responsible for this cost of seasonal transitions remain to be identified.

In nature, the strength of seasonality mainly varies according to latitude (Ricklefs & Wikelski 2002 ; Hut *et al.* 2013). At high latitudes, individuals are constrained to reproduce during a very short period (about three months), while individuals from tropical latitudes have the possibility to repro-

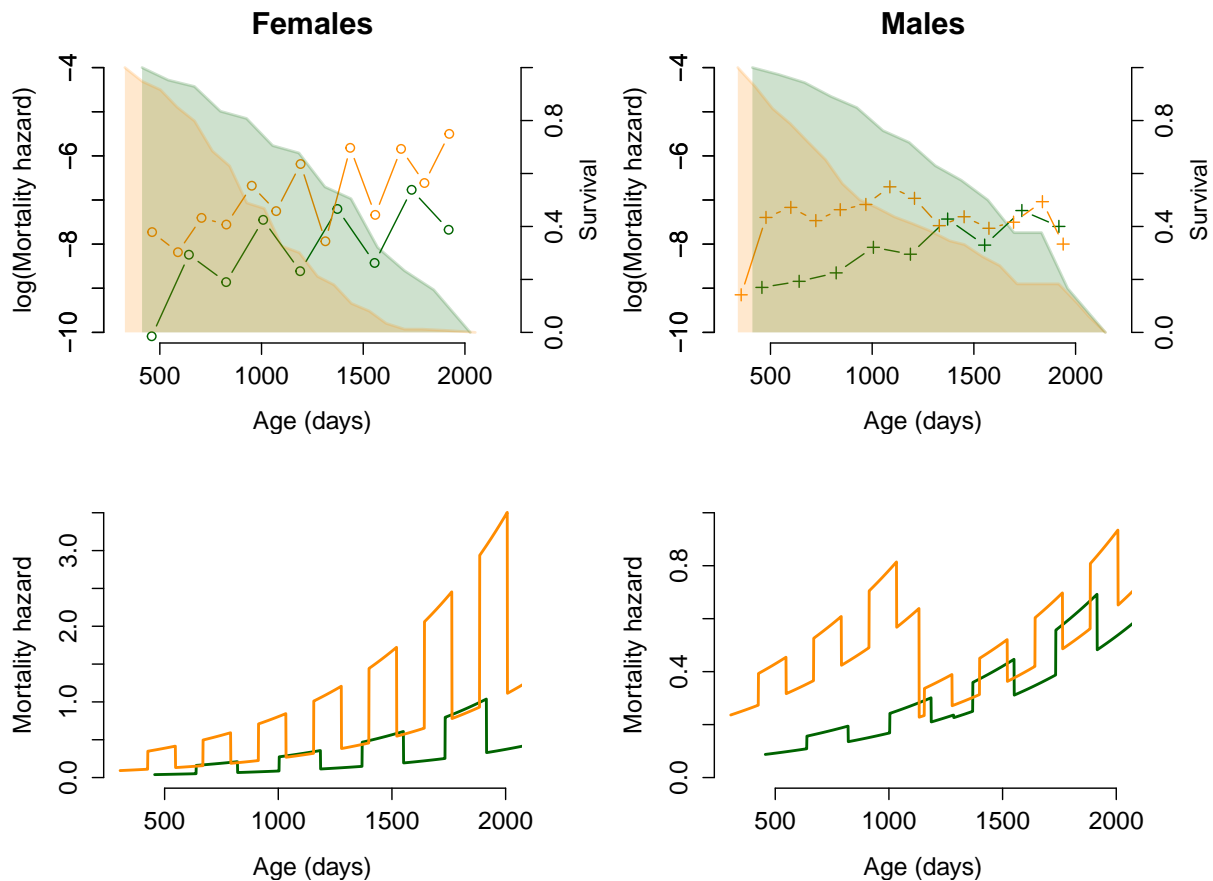


FIGURE 1.2 – **Effect of seasonal rhythm acceleration on mortality trajectories over age for males and females.** (A) Mortality hazard (measure of the proneness to failure as a function of the age of an individual) on a logarithmic scale by age, for females (left) and males (right), estimated by the respective selected Cox models (see Supplementary Methods 5), for a reference individual (in green) and an accelerated individual exposed to an additional season per year (in orange). The Cox models control for period and cohort effects, and take into account the effects of season and seasonal rhythm on mortality. For males, the selected model is a piecewise Cox model, with an effect of seasonal rhythm on mortality that changes after 1285 days (3.5 years) of age. Each point corresponds to the middle of a season. The corresponding survival curves are represented by coloured areas. (B) Mortality hazard by age estimated from the selected Gompertz-shaped parametric models (see Supplementary Methods 5) for females (left) and males (right). These models consist in the parametric versions of the selected Cox models. In both sexes, accelerated individuals die earlier than reference individuals. In females, seasonal rhythm acceleration leads to a high, regular increase in mortality hazard throughout the life. In males, this increase is also observed at the beginning of adult life until 3.5 years of age. Then the effect of the acceleration decreases and reaches mortality levels close to those observed for reference individuals.

duce upon a longer period (more than 6 months), or even continuously throughout the year (Tieleman *et al.* 2006). And indeed, in birds, individuals from the tropics live longer than temperate conspecifics and congeners (Møller 2007; Wiersma *et al.* 2007). Following our transition-based theory of ageing, the relaxed seasonal rhythm of the tropics would impose weaker seasonal physiological transitions, resulting in the observed decreased rate of ageing and lower mortality.

## METHODS

### Animal model

The grey mouse lemur is a small Malagasy primate adapted to highly seasonal environment. In its natural habitat, a year is divided in two seasons. The wet season, a period of abundant resources, corresponds to the period of reproduction. By contrast, during the dry season, mouse lemurs rely on fat storage and torpor use to cope with resources scarcity. Physiological and behavioural seasonal changes (such as sexual function, body weight, food intake, locomotor activity, social behaviour and endocrine functions ; Languille *et al.* 2012) are triggered by photoperiodic changes (below or above 12 hrs day length). In captivity, physiological seasonality can be compelled by photoperiodic manipulations.

The grey mouse lemur's lifespan is about 2-3 years in the wild and about 5 years in captivity (Kraus *et al.* 2008 ; Languille *et al.* 2012). It survives better during the unfavourable season than during the favourable season. In this species, biological ageing is characterized by a decrease in the ability to adjust physiologically to photoperiodic changes. The amplitude of metabolic performance and body mass change between seasons decreases over age in males (Hämäläinen *et al.* 2014).

### Experimental manipulations

We used monitoring data from a captive grey mouse lemur colony under natural-like photoperiodic conditions, and data from several experiments performed with individuals from the same colony. 576 individuals (278 males, 298 females) were exposed to the alternation of 6 months of LD and SD periods, a rhythm similar to the natural conditions in Madagascar. The 153 others individuals (77 males, 76 females) were experimentally exposed to accelerated seasonal rhythms throughout their life to characterize the effect of acceleration on physiological ageing (see Figure 1.1 ; Perret 1997 ; Aujard *et al.* 2001, Cayetanot *et al.* 2005). For all individuals, information about their seasonal rhythm (dates of season changes), survival and body mass were recorded, as well as reproductive history for females. All individuals were maintained under similar captive conditions (*ad libitum* food availability, temperature, humidity).

### Statistical analyses

We used event history analysis (i.e. survival models) to describe the effects of variables of interest on age-specific mortality. These variables were : (i) sex, season and their interaction ; (ii) variables describing photoperiodic regimen, i.e. the mean seasonal rhythm and the short-term deviations of an individual's seasonal rhythm from its mean due to colony management ; (iii) the interactions between all the previous variables ; (iv) adjustment variables (period and cohort effects, inter-individual heterogeneity, heterogeneity between litters due to maternal effect, and maternal lineage effects).

Mortality of reference individuals were preliminary characterized to identify the factors that affect mortality in the case of captive individuals experiencing a natural-like seasonal cycle. We then analysed all the individuals (reference and accelerated) to study specifically the effect of accelerated seasonal rhythm on mortality.



We first used semi-parametric Cox models, which have the flexibility to analyse mortality without modelling the age trajectories of mortality. Cox models assume proportionality of the effect of explanatory variables on mortality over age. Although this hypothesis was systematically tested, we also examined model relaxing this assumption by incorporating interactions between the variables of interest and age at entrance in the seasons. When such interaction was detected, we used Cox piecewise models to further explore this age-dependent effect.

Parametric equivalents of the best Cox models were also built to examine the shape of baseline mortality hazard with age, and to verify whether results still holds when assuming continuous parametrically-shaped increase of mortality with age.

Methods and results are fully detailed in the **Supplementary Methods**.

## SUPPLEMENTARY METHODS

1.	<i>Microcebus murinus</i> , seasonality and torpor use .....	14
2.	Data .....	15
2.1.	The colony of captive lemurs, seasonality and captive conditions.....	15
2.3.	Data selection .....	17
2.4.	Natural death and censoring .....	17
3.	Experimental design and subsets .....	18
3.1.	Subset 1 – Reference individuals.....	18
3.2.	Subset 2 – Reference and accelerated individuals.....	19
4.	Description of covariates .....	19
4.1.	Season and sex ( <i>Season</i> , <i>Sex</i> ) .....	19
4.2.	Seasonal rhythm .....	20
4.3.	Adjustment covariates .....	21
	Inter-individual heterogeneity ( <i>Frailty</i> ).....	21
	Maternal effect ( <i>MatId</i> ) and maternal lineage ( <i>Lineage</i> ).....	21
	Years of birth and of observation.....	22
5.	Statistical method and analyses .....	23
5.1	Preliminary analysis for calibration of reference survival models .....	23
	Methods.....	23
	Results.....	25
5.2	Analysis of the effect of seasonal acceleration on mortality .....	27
	Methods.....	27
	Results.....	28
6.	Female reproduction .....	31
7.	Seasonal rhythm and body mass trajectories .....	32

## 1. *Microcebus murinus*, seasonality and torpor use

The grey mouse lemur (*Microcebus murinus*; Cheirogaleidae) is a small Strepsirhine primate endemic to Madagascar. This species is nocturnal and arboreal and its diet consists in fruits, insects and vegetal gums (Dammhahn & Kappeler 2008). In the wild, the grey mouse lemur has a lifespan of 2 years for males and 3 years for females, and can reach 12 years (Kraus *et al.* 2008). The grey mouse lemur is a polygynandrous species, females mate with several males during their oestrus (Eberle & Kappeler 2004a; 2004b), and dominant males can mate with several females (in association with strong sperm competition; Eberle *et al.* 2007). Females reproduce 1 to 2 times per reproductive season and give birth to 1 to 3 pups per reproductive event. Gestation lasts 2 months and is followed by 30 to 40 days of lactation. Sexual maturity is reached at 9 months (Mittermeier 2010).

The grey mouse lemur inhabits western and southern dry forests of Madagascar where the year is divided into 2 seasons characterized by different climatic conditions. The wet season, hot and rainy, lasts about 4 to 6 months, mainly from December to March (Dammhahn & Kappeler 2008). This season is a period of resources' abundance and corresponds to the period of reproduction. During the wet season, mortality risk is the highest because reproductively active individuals are exposed to predation, increased risk of parasite transmission, intra-sexual competition and the direct costs of reproduction (Kraus *et al.* 2008). The dry season lasts about 6 to 8 months, from April to November and is characterized by low temperatures and drought episodes responsible for drastic food and water scarcity. To survive the unfavourable caloric and hydric restrictions of the dry season, grey mouse lemurs rely on two complementary energy saving mechanisms: fat storage and torpor use (Schmid, 2001; Vuarin *et al.* 2013). At the end of the wet season, body mass increases by about 30%, rising from about 60g to 90g (for females; males fatten less and later; Schmid 1999). Grey mouse lemurs also use daily torpor, a state of temporary, controlled hypometabolism and hypothermia often found in resting endothermic animals. Daily torpor episodes last a few hours per day, unlike hibernation that lasts for several days or weeks (Geiser 2013). Torpor use also reduced locomotor activity, thus exposure to predators, and is associated with a decreased mortality during the unfavourable season (see also Liow *et al.* 2009). Daily torpor has also been linked to improved somatic maintenance and slowed biological ageing (Turbill *et al.* 2013; Giroud *et al.* 2014).

In both sexes, fattening, sexual rest and torpor use are triggered by 'autumnal' equinox, i.e. when days become shorter than nights (Perret & Aujard 2001a and 2001b). However, females

fatten earlier and more than males, and they remain virtually inactive throughout the short-day period, whereas most males maintain some foraging activity (Schmid & Kappeler 1998). The trigger of the seasonal physiological shift to reproductive state differs between sexes. Female reproduction (one-to-three-day oestrus) is activated by the ‘spring’ equinox (i.e. days longer than 12hrs long; Perret & Aujard 2001a). At the opposite, the sexual endocrine schedule of males is becomes refractory to photoperiod after 4-5 months of short days, when the reproductive system spontaneously activates (testes growth).

## 2. Data

### 2.1. The colony of captive lemurs, seasonality and captive conditions

A captive colony of grey mouse lemurs was set in Brunoy (France) 45 years ago. Between 1967 and 1972, 191 individuals (49 males and 142 females) were collected in southern forests of Madagascar and imported in France. After initial stocking, the captive colony did not receive any external individual, and was maintained only thanks to reproduction of founders and their descent. From this stock, in 1975, M. Perret founded the colony that is still active nowadays (and produced present data), with 22 females and 9 males. Supplementary males were temporarily used in the first years, but the exact, initial male effective size is not known. All individuals currently alive, and included in our analyses, descend from 5 founding females (and an unknown number of males because the polyandrous mating system). From the 5 female founders, 6 maternal lineages emerged (one of the 5 initial lineage split early and can be considered as 2 lineages for our population). Although mating were carefully planned to maximize genetic variance (by choosing the most distant mates according to maternal lineages) and to minimize inbreeding (by avoiding sister-brother and mother-offspring encounters), genetic drift must still have occurred. Nonetheless, the only study of genetic diversity of the colony revealed a similar level of homozygosity and genetic variance at randomly amplified polymorphic sites as in natural populations (Neveu *et al.* 1998). This high level of genetic variance may have been generated at foundation, by admixture between genetically distinct populations, and would have been partly maintained afterward thanks to careful breeding management.

Since the 90s, the colony has constantly maintained between 400 and 500 individuals. This breeding facility received the necessary authorization (currently registered as breeding facility

#E91-114-1 by the Departmental Veterinary Service of Essonne, France). Since 1988, major demographic events of all individuals have been systematically monitored (including dates of birth and death, monthly body mass, female reproductive output, maternal genealogy). This monitoring produced the presently analysed database (stopped for analysis on January 1<sup>st</sup> of 2013, with right censoring for all individuals alive at that date). Transfers to other colonies, accidental death and definitive attribution to specific experimental designs have also been reported systematically, allowing to right censor individuals in survival analyses.

In captivity, seasonality is induced either by the change in the day-length of Paris (12.5%) or by artificial photoperiod length manipulation (87.5%). For individuals under the light of Paris, season switches are recorded at the equinoxes when day length passes below or above a threshold of 12 hours per day. Individuals under artificial light are submitted to an alternation of long days (hereafter called LD; 14hrs of light per day) and short days (hereafter called SD; 10hrs of light per day) to mimic the alternation of wet and dry seasons, and to induce seasonal changes in fat storage and metabolic activity (see “*Microcebus murinus*, seasonality and torpor use” section). Artificial light is provided by cool fluorescent lamps (250-380lux). Although day length shifts briskly, captive grey mouse lemurs show physiological changes only when day length passes above or below the threshold of 12 hours (Perret and Aujard, 2001a). As a consequence, individuals under artificial light exhibit physiological transitions similar those exposed to a progressive day length transition.

Thanks to photoperiodic manipulation, it is possible to shorten the seasonal cycle duration of the mouse lemurs. However, it cannot be elongated. When the captive grey mouse lemurs are exposed to the alternation of too long seasons or kept under a same season, perturbations of physiological rhythms are observed (Perret & Aujard 2001a; Pifferi *et al.* 2015). After more than 6 months in the same period, individuals escaped from the influence of light signal and follow an endogenous rhythm of activation and inactivation of reproductive activity. We thus focused on the increase of the frequency of seasonal changes.

Except for the change in daily exposure to light, all individuals were maintained under constant average ambient temperature (23-25°C) and humidity (55%). Food and water were available *ad libitum* independently to the season (fruits, milky mixture and insects; Giroud *et al.* 2008). Animals were kept in monosexual groups of one to five individuals per cage apart during periods of mating, when heterosexual groups were formed for 2 to 4 weeks.

### 2.3. Data selection

Of the 2046 individuals (1056 males and 990 females) that composed the colony, 729 were retained for the present analyses (355 males and 374 females; details in Figure SM1). Exclusion was mainly due to four factors. First, because information was not systematically incorporated into the dataset before 1988, all the 72 recorded individuals born before this date were omitted. Second, 87 individuals had unknown dates at birth, death, seasonal transitions, or unknown maternal lineage and were excluded. Third, we kept only individuals exposed to the photoperiodic regimen required for our analysis. We omitted the individuals that shifted between different photoperiodic regimen during their life and those that have experienced at least one too long or too short season (due to transfers or experiments). 214 individuals were also omitted because they lived under an unbalanced seasonal length between the LD and SD seasons (regimen established for colony management reasons in order to accelerate the offspring production).

Finally, because we were primarily interested in analysis adult survival, we retained only fully grown and sexually mature individuals. It had been shown that main body size growth lasts until about 1-year old in this species, which corresponds to their second LD season (Castanet *et al.*, 2004). We retained therefore only the individuals alive at the entrance in their second SD period (hereafter denoted 'SD<sub>2</sub>') and were on average 14-month old.

All individuals were born during the second half of a LD period, except for 47 individuals that were excluded from our analyses (Figure SM1). All individuals did not enter their first SD season (SD<sub>1</sub>) at the same age (3 months on average). Age at entrance into the first SD<sub>1</sub> period was tested for a potential effect on mortality at later ages in all further analyses but has no effect (result not shown); which was expected as only individuals still alive in SD<sub>2</sub> were incorporated in the analyses.

In total, only 36% of the recorded individuals were used in this study.

### 2.4. Natural death and censoring

Among the 729 individuals included in our analyses, 258 (35%) experienced a natural death, while the other 471 are right censored (Table SM1), i.e. they were alive at the end of the study (on 1<sup>st</sup> January 2013), have been transferred to another laboratory or escaped at a known date,

or died from ‘unnatural’ causes (euthanasia for an experiment requiring to sacrifice the individual or dead during anaesthesia or another experimental procedure). This proportion of recorded natural death provides enough power to use survival analysis (see Klein & Moeschberger 2003 for examples). Available data consist in individual dates of birth and natural death or exclusion (censoring), as well as the dates at which each individual change season. The accuracy of these dates is  $\pm 2$  days, as animals are monitored every day in the week, and not during the weekend.

### **3. Experimental design and subsets**

The dataset incorporated individuals exposed to different seasonal rhythms (i.e. the speed of the alternation between the seasons). These differences arise from two sources: colony management and experimental manipulations of the photoperiodic regimen. We used this variance to construct two different subsets of individuals according to experienced photoperiodic regimen (Table SM2). The analysis of each subset was conducted independently and answered a precise question.

#### **3.1. Subset 1 – Reference individuals**

Subset 1 was designed to characterize the factors that affect mortality and its trajectory over age in captive grey mouse lemurs under a constant, natural-like seasonal rhythm. To do this, we selected 576 individuals (Table SM2) that followed an alternation of about 6 months of LD and 6 months of SD throughout their life more or less 3 weeks (Figure 1) that correspond to variance in seasonal switch dates due to temporary group- or individual-specific deviations in season length. The date of the switch between seasons can vary by a few days because of management constraints or for specific experiments that required delaying or advancing the season shift. All individuals were raised under artificial light, except for 133 individuals exposed to the natural photoperiod of Paris (France). Kaplan-Meier estimation of survival with age (Klein & Moeschberger 2003) of reference individuals’ survival evolution with age is represented in Figure SM2.

### 3.2. Subset 2 – Reference and accelerated individuals

Subset 2 is designed to analyse the effect of accelerated seasonal rhythm on mortality. It includes reference individuals from Subset 1 and 153 individuals (Table SM2) that have been raised under a seasonal rhythm larger than 2 seasons per year and up to 5.2 seasons per year (Figure 1). Variance in seasonal rhythm in these additional individuals came from three experimental procedures aiming at investigating the effect of an acceleration of seasonal rhythm on physiological performances of captive grey mouse lemurs (Perret & Aujard 2001a, Aujard *et al.* 2001, Cayetanot *et al.* 2005).

First 107 individuals (50 males and 57 females) were raised under the alternation of 20 weeks of LD and 20 weeks of SD (2.6 seasons per year) from LD<sub>1</sub> their last observation (64 from natural death and 43 censored).

Second, in an exploratory experiment, 34 individuals were maintained at various seasonal rhythm ranging from 2 to 3 seasons per year (15 males and 19 females; 18 natural deaths and 16 censored).

Third, 12 males were exposed to an alternation of 10 weeks of LD and 10 weeks of SD (5.2 seasons per year) or 13 weeks of LD and 13 weeks of SD (4 seasons per year), from SD<sub>1</sub> to death (9 from natural death and 3 censored). All these males entered the analysis at age 1500 days. Indeed before this age, sacrifices were made for the needs of the experiments but we have no information about the physiological criteria that has led to the selection of the euthanized animals.

For each photoperiodic regimen, Kaplan-Meier estimations of individuals' survival evolution with age are represented in Figure SM2.

## 4. Description of covariates

### 4.1. Season and sex (*Season, Sex*)

Mortality rates are higher during LD than during SD periods both in the wild and in captivity (Kraus *et al.* 2008; Languille *et al.* 2012) and season type must be incorporated into the analysis. However, because they live different seasonal rhythms, individuals from the colony



will enter and exit seasons at different ages and season must be entered as a binary time-varying covariate (*Season*, being either LD or SD; with LD as reference) into all survival models. To do this, each season  $n$  experienced by each individual  $i$  was analysed as an independent observation, left-truncated at age  $x(i,n)$  (because individuals are alive at the beginning of a period) and right-censored at age  $x(i,n+1)$  if they survive throughout the period. Overall, the 729 individuals of our dataset lived a total of 3696 seasons.

Mortality also depends on sex as captive males grey mouse lemurs live on average longer than females (Languille *et al.* 2012) (*Sex*; with Females as reference). We also suspect an interaction between *Sex* and *Season* since females die more than males during LD periods (Languille *et al.* 2012).

## 4.2. Seasonal rhythm

We were primarily interested in investigating the effect of seasonal rhythm on mortality between individuals exhibiting large differences in seasonal rhythm overall their life. But we also wanted to control for potential variations in seasonal rhythm occurring within an individual life. To do this, two metrics capturing short and long term variation in seasonal rhythm were defined:

- *Instantaneous seasonal rhythm* [*Inst.SR*( $i,n$ ), in number of seasons per year] is the seasonal rhythm experienced by individual  $i$  at the  $n^{\text{th}}$  season during the last cycle of two seasons, such that:

$$\text{Inst.SR}(i,n) = \frac{2}{x(i,n) - x(i,n-2)}$$

where  $x(i,n)$  is the age of individual  $i$  at entrance in season  $n$ . *Inst.SR*( $i,n$ ) captures the potential variations in seasonal rhythm occurring within an individual life (discussed above in 3.1). Because of the selection of cases operated, variation of each season length cannot be larger than 3 weeks. *Inst.SR* is therefore designed to capture the effect of short term variation in seasonal rhythm on mortality.

- *Mean seasonal rhythm* [*Mean.SR*( $i,n$ ), in number of seasons per year] is the mean seasonal rhythm experienced by individual  $i$  from entrance to its first SD period ( $\text{SD}_1$ ) to season  $n$ , such that:

$$Mean.SR(i, n) = \frac{1}{n(i)} \sum_{s=1}^{s=n(i)} Inst.SR(i, n)$$

*Mean.SR(i, n)* should capture the long term effects on mortality that the seasonal rhythm averaged over an individual's life until season  $n$ .

Early in life, *Inst.SR* is similar to *Mean.SR*. As individuals grow old however, the seasonal rhythm experienced during the last two seasons (*Inst.SR*) may differ from the averaged seasonal rhythm they experienced since their entrance in  $SD_2$  (*Mean.SR*). In order to decorrelate *Inst.SR* and *Mean.SR*, we used  $\Delta.SR = Mean.SR - Inst.SR$  instead of *Inst.SR* in the following analysis (Figure SM3). We thus expect *Mean.SR* to capture the potential effect of large differences in seasonal rhythm, and  $\Delta.SR$  to control for potential short-term deviation of an individual seasonal rhythm from its mean.

Other metrics capturing seasonal rhythm have also been tested (e.g. last two seasonal lengths and mean seasonal length) but performed worse into the following analysis according to AIC-based model comparisons (results not shown).

### 4.3. Adjustment covariates

#### Inter-individual heterogeneity (*Frailty*)

In a population, individuals of a same age can have different chances of surviving depending on intrinsic properties (e.g. Aubry *et al.* 2010). The frailest individuals have more risks of dying early than the robust ones. Thus, a frailty covariate was defined as the identity of each individual and incorporated into the following analysis as a random effect.

#### Maternal effect (*MatId*) and maternal lineage (Lineage)

Mothers transmit genetic and epigenetic characters to their offspring that affect their risk and causes of mortality (Perret & Colas 1997). To account for this non-independence of the mortality risk between offspring of a given female, identity of an individual's mother (mother effect) was used as a random effect to account for maternally-driven differences in propensity to die. Because the species is polyandrous, the identity of the fathers is unknown. Hence, the similar source of heterogeneity, but of paternal origin, could not be accounted for. Captive lemurs descend from 6 maternal lineages. Models were also adjusted for potential differences

in mortality between maternal lineages (fixed effect with ‘505ADBE’ as reference lineage). Again, because the species is polyandrous, paternal lineage is unknown

#### Years of birth and of observation

The first birth, and thus season, incorporated into the dataset was recorded in 1994 (and not 1988 because of previous data selection; Figure SM4 upper panel). Changes in colony management occurred over this 18-year study (like evolution of housing conditions in agreement with changes in animal care standards, or changes in animal keepers), and may have affected individuals’ mortality. Because some of these changes were contemporary of changes in seasonal rhythm (e.g. after 2006 all new individuals were exposed to a 6/6 mo seasonal rhythm), the starting model for survival analyses must therefore control for effects of the year of birth (cohort effect) and of the year of observation (i.e. when an individual enters a season). However, a model assuming that all years, and all cohorts, are fully independent (i.e. 18-level factorial effect each) would not be parsimonious, and would lead to problem of computation convergence and a loss of a statistical power. To overcome these modelling problems, we used a method to identify objectively the existence of clusters of years with similar relative risks of death. Cox regressions were used to estimate relative risks of death separately for each year of birth, and for each year of observation (with Subset 2 individuals; Figure SM4 lower panel). Years were then clustered according to the magnitude of year-specific coefficients from the regression (using ‘pam’ function of ‘cluster’ package for ‘R’; Maechler *et al.* 2013; RCore Team 2013). In both cases the most parsimonious clustering solution identified three groups of years. These three groups of years defined the clustered variables for the effects of year of birth (*YearBirth*) and year of observation (*YearObs*). Data selection (from 2046 to 729 individuals) has led to an under-representation of some years. In ‘Good’ years (green dots on Figure SM4 lower panel) no death was even recorded. Except for one ‘Good’ year of birth (1995) when only one birth was recorded (for a reference individual), both reference and accelerated individuals are represented in each cluster of years of birth and observation (Figure SM4 upper panel).

## 5. Statistical method and analyses

Event history analysis (i.e. survival analysis) where used to analyse the effects of the covariates of interest on age-specific mortality hazard. Mortality hazard, also known as the force of mortality in demography, is a measure of the proneness to failure as a function of the age of the individual (the failure being here individual's death; Lee & Go 1997). These statistical techniques allow (i) using all available data, including censored and truncated data; (ii) accounting for the periodicity of individuals' mortality due to seasonality.

### 5.1 Preliminary analysis for calibration of reference survival models

#### Methods

We used Subset 1 to characterize mortality in individuals experiencing a 6/6 mo rhythm, to estimate the influence of factors that are expected to affect mortality (i.e. *Sex* and *Season*) and to control for those that could potentially affect mortality ( $\Delta$ .SR and other adjustment variables). The effect of *Mean.SR* on mortality was also considered, although we did not expect to find any effect of this covariate on mortality because all individuals from Subset 1 were exposed to little variance in *Mean.SR*.

**Semi-parametric Cox proportional hazard models** – Cox analyses are flexible models that do not constrain the distribution of the baseline hazard, and so, allows analysing mortality without modelling the age trajectories of mortality of the studied organism. The drawback of this method is that Cox model assumes that the effect of a covariate is proportional to the baseline mortality level at all ages (i.e. proportional hazard model). The hazard function is modeled as  $h(t|x) = h_0(t) \cdot e^{\beta x}$ , with  $h_0(t)$  the mortality hazard baseline of unspecified distribution,  $t$  the time at death or censoring and  $\beta$  the parameter quantifying the association between covariate  $x$  and time at death. Survival can be expressed as  $S(t) = e^{-\int_0^t h(t)dt} \cdot e^{\beta x}$ , where the cumulative mortality hazard is  $H(t) = \int_0^t h(t)dt \cdot e^{\beta x}$ .

We considered all possible models incorporating (i)  $\Delta$ .SR and *Mean.SR*; (ii) *Sex* and *Season* and (iii) all their possible 2x2 interactions (*Sex*\* $\Delta$ .SR, *Sex*\**Mean.SR*, *Season*\* $\Delta$ .SR, *Season*\**Mean.SR*, *Sex*\**Season*). (iv) The potential 2x2 interactions with the age at the beginning of the seasons  $x(n)$  were also considered (i.e.,  $\Delta$ .SR\* $x(n)$ , *Mean.SR*\* $x(n)$ , *Sex*\* $x(n)$  and *Season*\* $x(n)$ ). This allowed us to detect whether the effect of these variable vary with the

individual age at seasonal entrance. Finally, (v) the five adjustment variables (*YearBirth*, *YearObs*, *Frailty*, *MatId* and *Lineage*) were incorporated to control for potential cohort and period effects, as well as, for eventual sub-structures of our population between individuals, sibships, and maternal lineages.

Because interactions incorporated *de facto* the additive components of the two variables interacting, this set gathered 26527 different models. All these models were run using the ‘cph’ function of the ‘rms’ package in ‘R’, more stable to the incorporation of random variables as *Frailty* or *MatId* than the ‘coxph’ function of the ‘survival’ package. Cox models assume PH. Thus, Cox models that do not verify this hypothesis cannot be interpreted. We checked the respect of the PH hypothesis for each covariate and each computed model by testing if the corresponding residuals are relatively constant over age (using the ‘cox.zph’ function from the ‘R’ package ‘survival’).

Model selection was based on Akaike’s Information Criterion (AIC; Burnham & Anderson 1998). Models were ranked according to their AIC value, the model exhibiting the lowest AIC corresponding to the best model. The best model realizes the best fit to the data relative to the number of parameters it included. Models with a  $\Delta AIC$  (i.e. the difference between their AIC and the AIC of the best model) higher than 2 were considered as receiving little statistical support. Models with a  $\Delta AIC$  lower than 2 were considered as receiving an equal statistical support than the best model. Their covariates may therefore be relevant to describe variations in mortality hazard.

To determine whether the covariates incorporated into the highest ranked models are really relevant to describe mortality hazard, we first calculated the AIC weight  $w_i$  of each model  $i$ , such that  $w_i = e^{-0.5\Delta AIC_i} / \sum_{k=1}^N e^{-0.5\Delta AIC_k}$  with  $N$  being the total number of models tested. AIC weight  $w_i$  gives the weight of evidence in favour of model  $i$ . For each covariate we then calculate the Cumulative AIC weights which is the sum of the AIC weights of all models that included its effect ( $\Sigma w_i$ ; Burnham & Anderson 1998). This value allows identifying the covariates which are overrepresented within the high-ranked models. The covariates incorporated in the highest ranked models were then compared with the covariates exhibiting the highest  $\Sigma w_i$ . Comparing the evidence ratio, i.e. the ratio of the  $w_i$ , of all the models tested, allows quantifying the differences in statistical support between models. In the case of an effective model selection, a small number of models are better than all the others.

Once the selected model identified, analyse of the residuals allowed us to control the good fit of the model to the data. The distribution of the Schoenfeld residuals over age allows detecting eventual deviation from the PH hypothesis for each covariate. The distribution of the martingale residuals plotted against the values of the continuous covariates check for their linearity. The diagnostic plots corresponding were represented for the selected Cox models (see below).

**Parametric PH and AFT models** – Parametric equivalent (in term of covariates incorporated) of the selected Cox models ( $\Delta AIC < 2$ ) were then considered (i) to identify the statistical model that best describe the shape of the baseline mortality hazard with age, and (ii) to test whether covariates have a proportional effect over age (‘proportional hazard’; hereafter ‘PH’) or an effect that varies with age (‘accelerated failure time’; hereafter ‘AFT’). Several distributions (Gompertz, Weibull, Lognormal, Loglogistic; Klein & Moeschberger 2003) were tested to describe the baseline hazard function ( $h_0$ ). These distributions have been previously shown to well describe mortality trajectories in several mammal species (e.g. Ricklefs & Scheuerlein 2001; Bronikowski *et al.* 2011). PH and AFT models were fitted using respectively the ‘phreg’ and ‘aftreg’ functions implemented in the ‘R’ package ‘eha’.

## Results

**Semi-parametric Cox proportional hazard models** – Over the 26527 cox models considered, 15484 (58%) fail to converge, all including either individual frailty (12168, 92 % of the models including frailty) or *MatId* (9400, 71% of the models including *MatId*). All 11043 models that converged respect the proportionality hypothesis (p-value>0.05).

Cumulative AIC weights show that four effects are overrepresented within the high-ranked models (Figure SM5.A):  $\Delta.SR$ ,  $Sex*Season$ ,  $YearBirth$ ,  $YearObs$ . All these covariates and the  $Sex*Season$  interaction are also incorporated within the six selected models ( $\Delta AIC < 2$ ; Table SM3). Incorporating the 3x3 interaction  $\Delta.SR*Sex*Season$  do not improve the model’s AIC. We further discuss the results from the most parsimonious among the lowest AIC models (‘cox1’ of Table SM3; diagnosis plots in Figure SM5.C and B).

Mortality hazard strongly differs between sexes and seasons ( $Sex*Season$  effect; Table SM3). Both females and males mortality is higher in LD than in SD (Figure SM6.C). However, fluctuations are more accentuated in females who exhibit a risk of mortality 1.5 times larger than males during LD ( $=1/e^{-0.421}$ ) and 1.6 times lower than males during SD periods ( $=e^{-0.421}$ ).

$0.421+0.905-0.581/e^{-0.581}$ ). These findings support previous observations in the captive colony (Languille *et al.* 2012). Life expectancy at the entrance in SD<sub>2</sub> reaches 4.2 years for males and 4.4 years for females (knowing that all individuals are alive when entered SD<sub>2</sub> period, on average at 1.3 years; Table SM2) which corresponds to about eight seasons.

Increasing  $\Delta.SR$  led to a slight, but significant, increase in mortality. This effect was only significant in males, although it was not of large magnitude. In reference individuals, average  $|\Delta.SR|$  was 0.0118 years (i.e. 4.3 days over a ~6 months season; with 95% of values lower than 15 days), which corresponds to an increased mortality of 1.2 compared to a male experiencing a constant seasonal rhythm throughout its life.

Concerning adjustment covariates, the effects of years of birth and years of observation are selected. Although both *YearBirth* and *YearObs* exhibit large cumulative AIC weights (Figure SM5.A), only *YearBirth* is systematically included in the six highest ranked models and its effect is always significant (Table SM3).

**Parametric PH and AFT models** – We considered the parametric PH and AFT versions of the 6 highest ranked Cox models with the 4 different baseline mortality functions. In total 140 models were tested (holding that Weibull models are both PH and AFT models; Klein & Moeschberger 2003). We found that the best model are the parametric PH versions of the ‘cox1’ model (Table SM3), with a Gompertz-shaped baseline mortality  $h_0(t) = ae^{bt}$ , with  $a=1.2 \times 10^{-4}$  and  $b=1.2 \times 10^{-3}$  (Figure SM6.B). Most coefficient estimates from the best PH Gompertz model are similar to those from the best Cox model, except for the *Season* ( $\beta_{Cox}=-0.58$ ;  $\beta_{Gompertz\ PH}=-1.23$ ; Table SM3). Gompertz distribution has been used to describe mortality trajectories in many primate species (including a lemur species; Bronikowski *et al.* 2011).

To conclude, mortality pattern of captive mouse lemurs is Gompertz-shaped and fluctuates between seasons, especially in females. Period and cohort effects, as well as little fluctuations in seasonal rhythms over the individuals’ life (in particular in males) should be taken into account in our analyses. No frailty or maternal effects are detected with the reference dataset.

## 5.2 Analysis of the effect of seasonal acceleration on mortality

Subset 2 aims at testing the difference in mortality between individuals experiencing different seasonal rhythms. To do this, the same analyses than for Subset 1 were performed for Subset 2. Because several complex interactions were found, in particular between sex and seasonal rhythm, analyses were also performed on females and males separately. In males, we showed that the effect of seasonal rhythm on mortality varies with age. To further characterize these variations, piecewise Cox models were implemented. Parametric versions of the equivalent highest ranked Cox models were then considered.

### Methods

**Semi-parametric Cox proportional hazard models** – We considered the same models as for Subset 1.

In the case an interaction between age at entrance in the season  $x(n)$  and a covariate was found within the highest ranked model and was supported by the cumulative AIC weights, the effect of this covariate would vary with age. In such a case, piecewise Cox models (Klein & Moeschberger 2003) would be performed to explore potential non-linear variations of the effect of this covariate on mortality with age. Piecewise Cox models were implemented by incorporating a time-varying covariate defining time-intervals. The optimum number of intervals (2 or 3) and the ages delimiting these intervals (from 300 to 3000 days) were determined by an AIC-based model selection.

**Parametric PH and AFT models** – We considered the parametric PH and AFT equivalent (in term of covariates incorporated) of the best Cox models (including potential piecewise models), for 4 baseline distributions (Gompertz, Weibull, Lognormal, Loglogistic) and for each sex separately. If seasonal rhythm affects mortality differently over age (i.e. a piecewise model is favoured) parametric methods may favour a continuous decline of the effect of seasonal rhythm with age while semi-parametric methods may favour a sudden one. Thus, we developed a *PH-AFT Gompertz parametric model* (Annexe 1) that allows *Mean.SR* to have an effect on mortality both PH and AFT. An additional strength of this model is to allow the incorporation of seasonal rhythm as an AFT covariate while other variables are incorporated with a PH effect. This allows to test whether the PH effect of season type (*Season*) and



adjustment covariates (*YearBirth* and *YearObs*) may have compromised the detection of a continuous AFT effect of *Mean.SR*.

It must be stressed that because most accelerated individuals were all males ('10/10we or 13/13we' experiment) and that males and females' mortality answer differently to seasonal rhythm, all the analyses were also performed without these 12 individuals. This omission had no effect on our results (not shown).

## Results

**Semi-parametric Cox proportional hazard models** – Overall the 26527 considered models, the 14874 that did not converge included either *Frailty* (10409, 78% of all models including *Frailty*) or *MatId* (10046, 76% of all model including *MatId*). All the 11653 that converged respected the PH hypothesis.

Cumulative AIC weights show that five effects are overrepresented within the high-ranked models (Figure SM7.A): *Mean.SR\*x(n)*, *Sex\*x(n)*, *Sex\*Season*, *YearBirth* and *YearObs*. Within the 8 highest ranked models ( $\Delta\text{AIC}<2$ ) interactions *Mean.SR\*x(n)*, *Sex\*x(n)* and *Mean.SR\*Sex* were found respectively in 5, 8 and 2 models (not shown) as well as the effects of *Sex\*Season*, *YearBirth* and *YearObs*, as for reference individuals. The 3x3 interaction *Mean.SR\*Sex\*x(n)* improved the AIC by 1 point and the simplest form of this model (*Mean.SR:Sex* + *Mean.SR:Sex:x(n)* with identical AIC) is presented in Table SM4 and corresponding diagnosis plots in Figure SM7.C and D. Seasonal rhythm acceleration increased drastically mortality (by about  $e^{1.2} = 3.3$  fold per additional season lived per year) in both sexes. However this deleterious effect decreases with age, in particular in males (not significant).

Regarding adjustment covariates, the *Sex\*Δ.SR* interaction selected for the analysis of Subset 1 shows no significant effect and removing it significantly improved the AIC of the model. In addition, neither *Lineage*, *Frailty* nor *MatId* improved models.

Because females and males mortality varies not only differently with the seasonal type (i.e. *Sex\*Season*) but also with the speed of their alternation (*Sex\*Mean.SR*), and because it is suspected that these effects differs with age between both sexes (*Mean.SR\*Sex\*x(n)*), all the previous analyses were further performed for females and males separately. In females, the best Cox model includes *Mean.SR* but not its interaction with *x(n)* (Table SM5). Seasonal

rhythm acceleration increases mortality in females proportionally over age. In males, however, the best model incorporates a negative  $Mean.SR*x(n)$  interaction (Table SM5). Seasonal rhythm acceleration increases mortality, but this effect diminishes as individuals aged.

**Semi-parametric piecewise Cox proportional hazard models** – For all the dataset considered (i.e. females and/or males included) the selected time intervals were the same: 2 intervals with a transition age at 1285 days (3.5 years). When considering both females and males, the piecewise Cox model performed better than the previously selected Cox model (Table SM4). In both sexes increasing seasonal rhythm increases mortality of individuals from their entrance in  $SD_2$  to 3.5 years. After this age, this effect is lower in females ( $e^{1.236} * e^{-0.75} = 1.6$ ) and in males ( $e^{1.83} * e^{-0.979} = 1.35$ ). When considering females only (Table SM5), the piecewise models were not more supported than the other Cox models, in accordance with the previous results that suggested an increase in mortality independent of age. When studying males only, the piecewise Cox model was strongly favoured (decreased AIC by 10 points regarding the other Cox models; Table SM5). As Cox models are PH models, the effect of  $Mean.SR$  is proportional on each age intervals, but not overall the life.

**Selected Cox models for females and males** – In females, the Cox model is selected. Females experiencing an additional season per year (exposed to an accelerated 4/4 mo seasonal rhythm, with  $Mean.SR=3$ ) exhibit a risk of death of about  $\frac{e^{1.166*3}}{e^{1.166*2}} = 3.2$  times higher than females following a 6/6 mo rhythm ( $Mean.SR=2$ ); from their entrance in  $SD_2$  period and over their lifetime (Figure 2 upper panel; Table SM5). In this case, remaining life expectancy at entrance in  $SD_2$  decreases from  $e_{SD_2}=4.05$  years for reference females (with  $x(SD_2)=1.26$  years) to  $e_{SD_2}=2.83$  years for the accelerated females (with  $x(SD_2)=1.0$  years). Interestingly, females experiencing 6/6 mo or 4/4 mo seasonal rhythms are expected to live about the same number of seasons ( $e_{SD_2(6/6mo)}=4.05*2=8.1$  seasons;  $e_{SD_2(4/4mo)}=2.83*3=8.5$  seasons), while, if mortality would have not differed, accelerated females would have been expected to live  $4.05*3=12.2$  seasons. This supports previous results indicating that biological age, expressed in number of seasonal cycles, is a better predictor of mortality hazard than chronological age (Perret 1997).

In males, the Cox piecewise model is selected. Males younger than 3.5 years old experiencing an additional season per years (4/4 mo seasonal rhythm) exhibit a risk of death  $\frac{e^{1.455*3}}{e^{1.455*2}} = 4.3$

times higher than males experiencing a 6/6 mo rhythm of the same age (Figure 2 upper panel; Table SM5). After 3.5 years, accelerated individuals show a mortality only  $\frac{e^{1.455*3} * e^{-1.218*3}}{e^{1.455*2} * e^{-1.218*2}} = 1.3$  times higher than references. Remaining life expectancy at entrance in  $SD_2$  decreases from  $e_{SD_2}=4.83$  for reference males (with  $x(SD_2)=1.2$  5years) to  $e_{SD_2}=3.30$  years for the accelerated males (with  $x(SD_2)=1.0$  years). Again, both reference and accelerated are expected to live a similar number of seasons, respectively  $4.83*2=9.7$  and  $3.30*3=9.9$  seasons. If mortality would have not differed, accelerated males would have been expected to live  $4.83*3=14.5$  seasons.

To conclude, semi-parametric methods detect a drastic increase in mortality both in females and males, as soon as individuals entered their adult life. Rather, in females this effect is proportional to age-specific mortality level throughout their life, and in males this effect almost vanishes in individuals surviving beyond 3.5 years old.

**Parametric models** – Again, we analysed mortality trajectories for females and males independently. Over the 14 models performed for each sex, all converged. The selected model was the PH parametric version of the best Cox model in females and the PH piecewise model for males, both with Gompertz-shaped baseline mortality (Table SM5). Clearly, at the beginning of life, the effect of seasonal rhythm on mortality is proportional over age in both sexes and is also detected both parametric methods.

For females, the selected parametric model is the PH version of the selected Cox model in females with a Gompertz-shaped mortality baseline ( $a=7.3 \times 10^{-3}$ ;  $b=1.5 \times 10^{-3}$ ); Figure 2 lower panel; Table SM5). The magnitude of the proportional effect is about the same than the equivalent Cox model ( $\frac{e^{1.083*3}}{e^{1.083*2}} = 3$ ).

For males, the piecewise PH Gompertz model and the PH-AFT Gompertz are equally supported according to AIC selection (Table SM5), preventing us to discriminate between a continuous and a sudden decline in *Mean.SR* effect over age. As the PH piecewise Gompertz model is slightly favoured (Table SM5), we further present results from this model ( $a=6.9 \times 10^{-3}$ ;  $b=1.2 \times 10^{-3}$ ). Seasonal rhythm acceleration immediately increases mortality early in life, but this effect on mortality decreases as the individuals grow old (Figure 2 lower panel; Table SM5). Reference males younger than 3.5 years old (from their entrance in  $SD_2$ ) exhibit a risk of death 3.2 times higher than males of the same age exposed to an additional season per year.

This value decreases after 3.5 years when the risk of death is only 1.2 times higher for accelerated males than for reference males.

To conclude, mortality pattern of captive mouse lemurs is Gompertz-shaped and answers to seasonal rhythm acceleration differently in females and males. Accelerated females exhibit a higher risk of death compared to reference females, and this effect stays proportional overall their life. In males, acceleration also leads to an increased mortality, but this deleterious effect declines past 3.5 years old.

Is this deleterious effect of acceleration due to the increased frequency of transitions between seasons or to the increased frequency of a given season (SD or LD)? Because the *Mean.SR\*Season* interaction was never selected in our analyses and was poorly supported by the cumulative AIC weights (Figure SM7), we favour the first hypothesis. Moreover, in captivity, reproduction would be the main factor that could increase mortality linked to the frequency of the LD season: if accelerated individuals experience more frequent reproductions events, this could lead to higher mortality. However this was not detected neither by the expected *Mean.SR\*Season* interaction neither by the incorporation of female reproduction into our analysis (see below).

## 6. Female reproduction

All yearling females and about all males were given the opportunity to mate once per long-day season (although polyandry and between-males hierarchy prevent establishing the actual male reproductive output in absence of systematic genotyping of offspring; Andrès *et al.* 2001; Eberle & Kappeler 2004b; Huchard *et al.* 2012). Afterwards, nearly all females were allowed to reproduce per long-day season. Some individuals had more opportunities to reproduce to maintain under-represented maternal lineages, whereas others were prevented to reproduce because of their important past reproductive output or bad health status. Females were allowed to reproduce only once per long-day season.

In the case where the reproductive effort of the females would vary according to the photoperiodic regimen, we would expect that a part or the totality of the deleterious effect of seasonal rhythm acceleration on females' mortality results from more frequent reproduction. Incorporating reproductive effort (whether the female reproduced or not during each season) to our selected Cox model for females improves the AIC. However, the effect of *Mean.SR* on

mortality was similar with and without reproductive effort. Moreover, replacing *Mean.SR* by reproductive effort in the model is less supported. Thus, reproduction has an effect on mortality in females, but independently to seasonal rhythm.

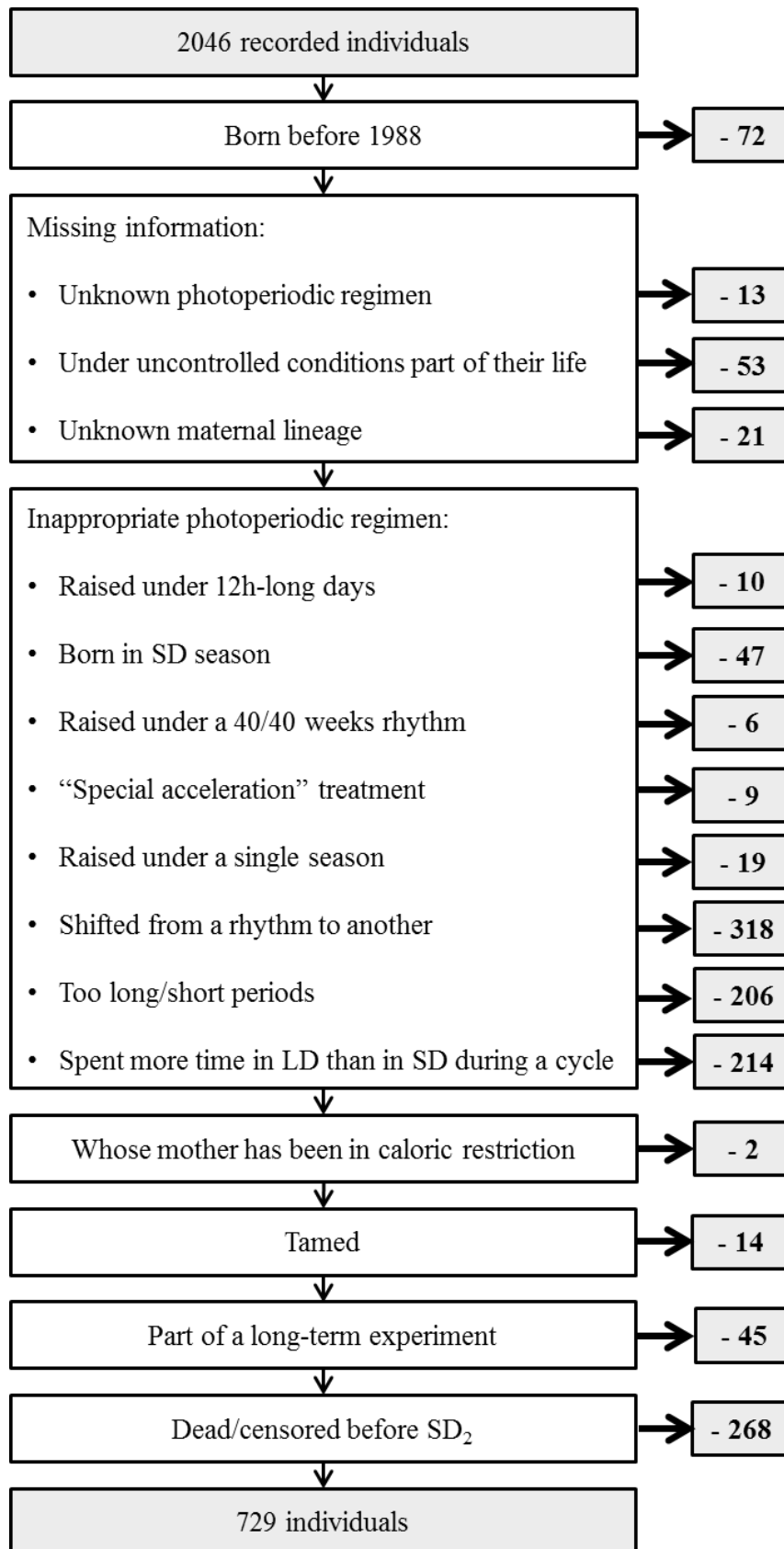
## 7. Seasonal rhythm and body mass trajectories

Changes of seasons trigger body mass variations. In the captive colony, body mass increases during LD periods to reach a maximum at the beginning of SD periods, and decreases over SD periods to reach a minimum at the beginning of LD periods (Hämäläinen *et al.* 2014). The amplitude of the difference between body mass in two successive seasons may be an indicator of the ability of the individual to adjust its body mass to season change. It has previously been reported that this amplitude decreases as grey mouse lemurs age, due to deficient ability to regain body mass after LD periods (Hämäläinen *et al.* 2014).

Body mass of each of the captive lemurs has been recorded at least every two weeks from their birth to their death. This corresponds to 52512 measures of the 729 individuals incorporated into our analysis (about 72 weighing by individual). We analysed the potential change over age of maximum and minimum weights reached respectively during the SD and LD seasons. Linear regressions incorporating a linear, quadratic or cubic effect of age on body mass were performed for each season type and each sex, and for three categories of seasonal rhythms (Reference, Experiment '20/20we', Experiment '10/10we or 13/13we'). In females, no difference in body mass between reference and accelerated females is detected (see Table SM6 and Figure SM8). In males, seasonal rhythm acceleration leads to a decrease in maximum body mass reached during SD season. Moreover, large decline in SD body mass is detected in accelerated males past 3.5 years old (see Table SM6 and Figure SM8).

We define  $\Delta.Mass$  as the absolute difference between maximum and minimum body mass, reached respectively in SD and LD seasons. In females, adding  $\Delta.Mass$  in the previously selected Cox model significantly improves AIC (down to 1209; Table SM7) and decreases slightly the effect of seasonal rhythm on mortality. The magnitude of the change in body mass between seasons is therefore crucial for individual survival. In males, adding  $\Delta.Mass$  to the previously selected Cox piecewise model improved significantly the AIC (down to 1068; Table SM7). At 2.5 years old,  $\Delta.Mass$  of reference individuals is about 55g (from about 75g to 130g) and that of individuals accelerated to 2.6 seasons per year is around 40g (from about 75g to 115g). At 5 years old,  $\Delta.Mass$  is similar in reference males but decreased in accelerated

males down to about 15g. At 2.5 and 5 years, accelerated males exhibit a risk of mortality respectively 2.96 and 2.39 times higher than references males (Table SM7; Figure SM8). Thus, when  $\Delta.Mass$  is included, the effect of seasonal rhythm on mortality remains the same over an age and no longer decreases past 3.5 years old.  $\Delta.Mass$  explains the previously observed decreasing effect of seasonal rhythm on mortality over age.



**Figure SM1:** Data selection from the 2046 individuals recorded to the 729 used in our study. Causes of exclusion are associated to the number of excluded individuals. Major causes of exclusions are detailed and justified in the text.

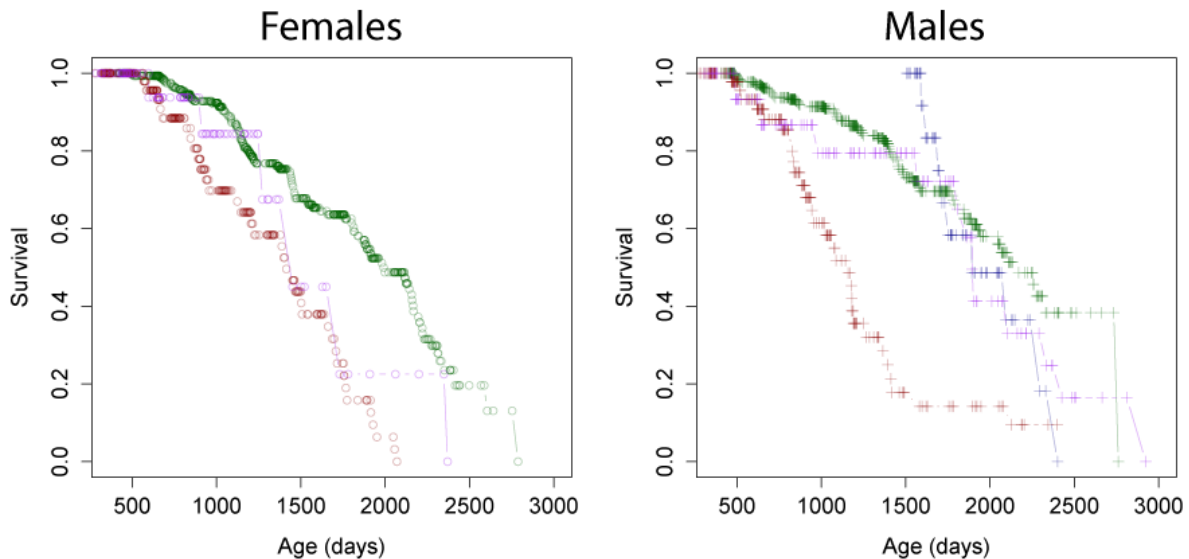
**Table SM1:** Number of individuals that experienced natural death and censoring.

	<b># individuals</b>
<b>Death from natural causes</b>	<b>258</b>
Found dead	234
Euthanized because dying	24
<b>Censored</b>	<b>471</b>
Still alive at the end of the study (01/01/2013)	328
Transferred to other laboratories	76
Escaped individuals	2
Euthanized (experiment)	50
Accidental death (anesthesia, during an experimental procedure)	15

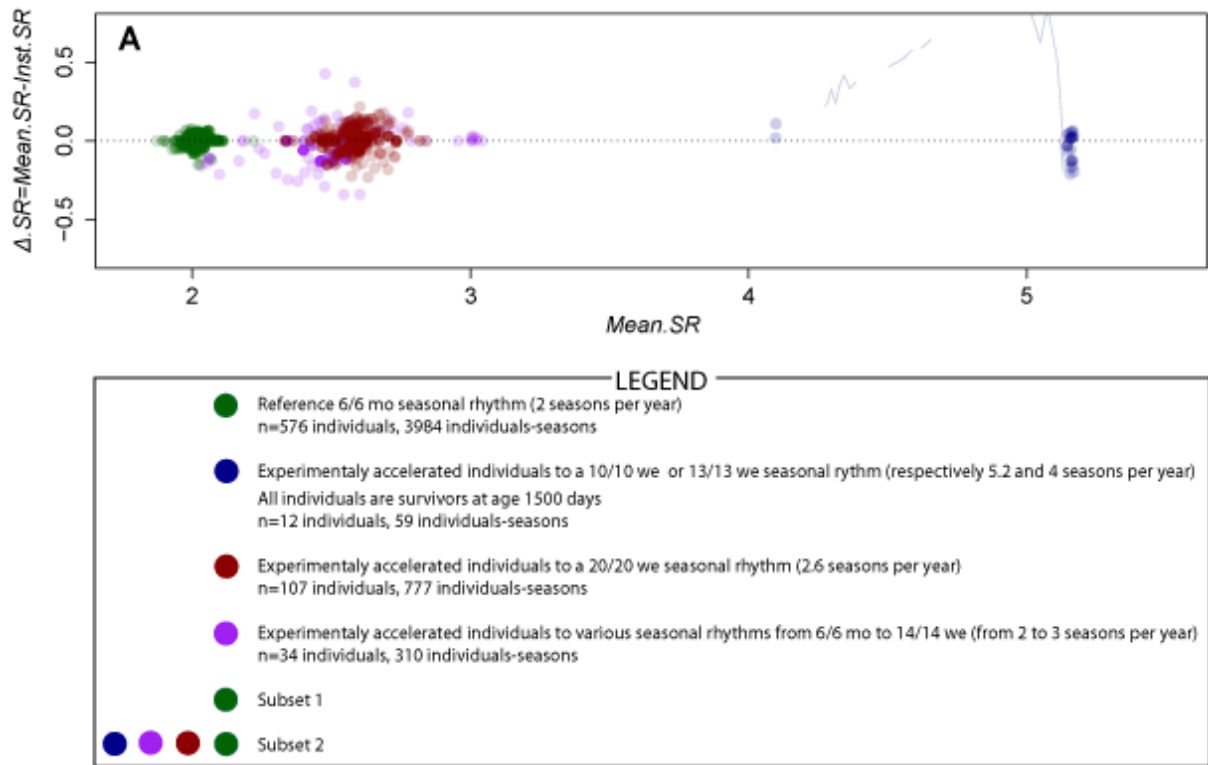


**Table SM2:** Summary of the two subsets of individuals used in our analyses. Standard deviations are indicated in brackets.

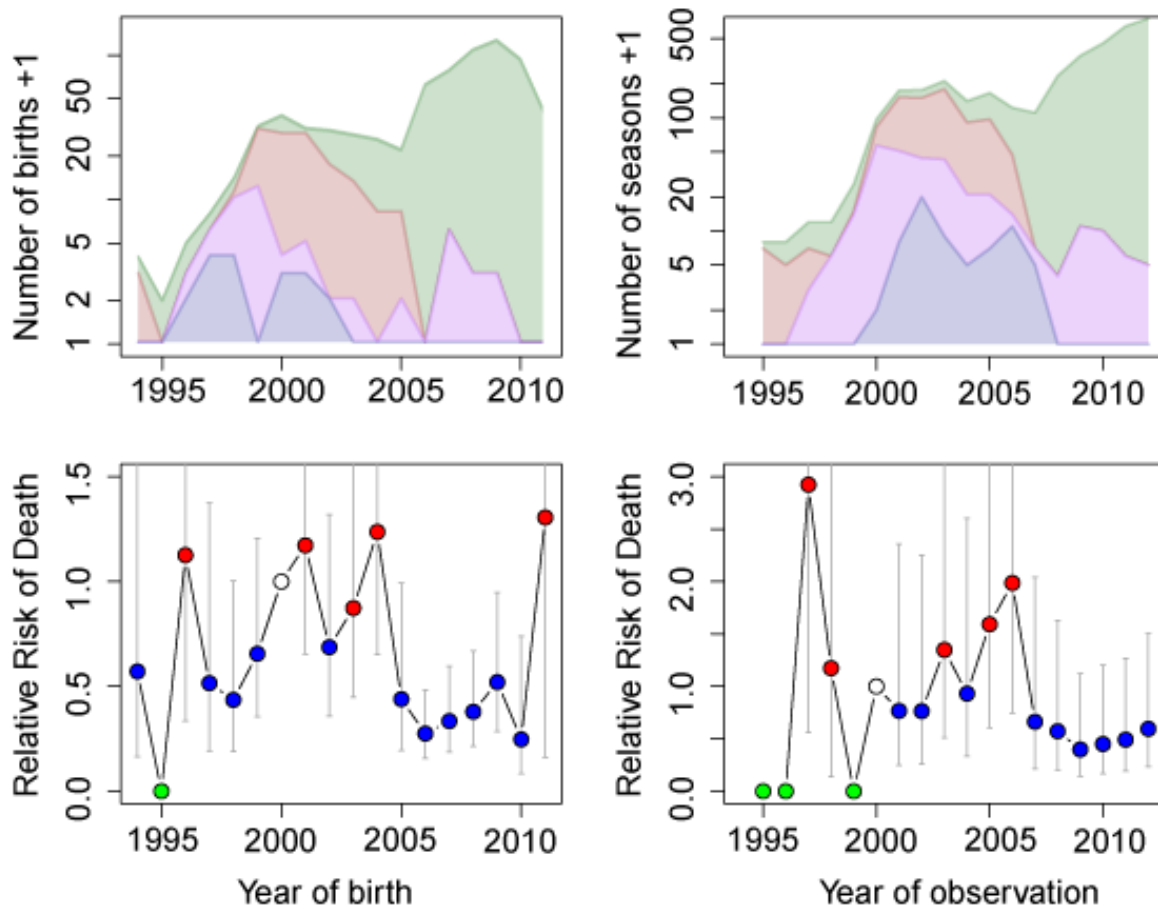
	Mean seasonal rhythm (seasons/year)	Mean # of seasons lived	Mean age at entrance in SD <sub>2</sub> (days)	# individuals				
				Total	Males	Females	Natural deaths	Censored
<b>Reference</b>	2.0 ( $\pm 0.02$ )	6.9 ( $\pm 3.0$ )	468.3 ( $\pm 16.2$ )	576	278	298	167	409
<b>Experiment 20/20we</b>	2.6 ( $\pm 0.07$ )	7.3 ( $\pm 3.5$ )	347.4 ( $\pm 24.4$ )	107	50	57	64	43
<b>Exploratory experiment</b>	2.5 ( $\pm 0.21$ )	9.1 ( $\pm 4.9$ )	385.0 ( $\pm 56.8$ )	34	15	19	18	16
<b>Experiment 10/10we and 13/13we</b>	4.9 ( $\pm 0.38$ )	24.4 ( $\pm 3.8$ )	-	12	12	0	9	3



**Figure SM2:** Kaplan-Meier estimations of survival with age per treatment ('KM'; performed with the 'survfit' function from the 'R' package 'survival'; Therneau 2015; R Core Team 2013) for females and males. Survival for individuals experiencing a 6/6 mo photoperiodic regimen (2 seasons per year) are represented in green. Survival for accelerated individuals from the '20/20we' experiment (2.6 seasons per year), the '10/10we and 13/13we' experiment (4-5 seasons per year) and the exploratory experiment (from 2 to 3 seasons per year) are represented respectively in brown, blue and purple. Each circle and cross corresponds to an age at censoring or death. The KM method allows representing crude survival data, in absence of any parametric data transformation. We are fully aware that this method is inadequate for further analyses because (i) variance in seasonal length means that individuals may enter the seasons at different ages and season type (LD or SD season) should be entered as a time-varying covariate, which is not possible in KM analyses; (ii) no test exists to characterize the differences in survival in the case of truncated data; and (iii) KM allows only bivariate qualitative analyses. Accelerated individuals show a lower survival than reference individuals (e.g. the remaining life expectancy at 500 days for reference individuals is  $e_{500}=4$  years for reference individuals against  $e_{500}=2.2$  years for individuals exposed to a 20/20 we acceleration).



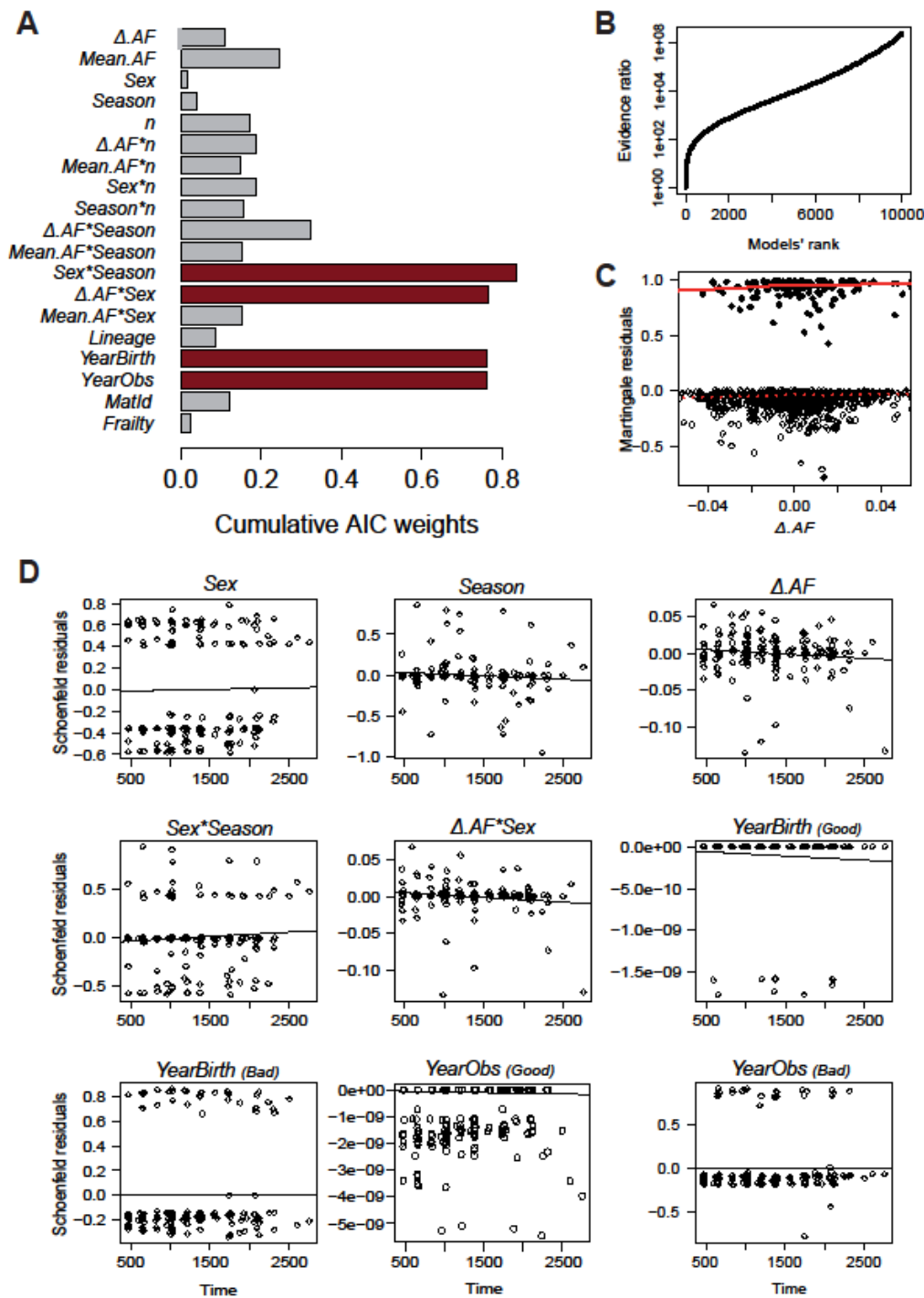
**Figure SM3:** Relationship between the two metrics capturing seasonal rhythm *Mean.SR* and  $\Delta.SR$  for Subsets 1 and 2. Blue lines represent three accelerated individuals that switched from a 13/13 we to a 10/10 we seasonal rhythm.



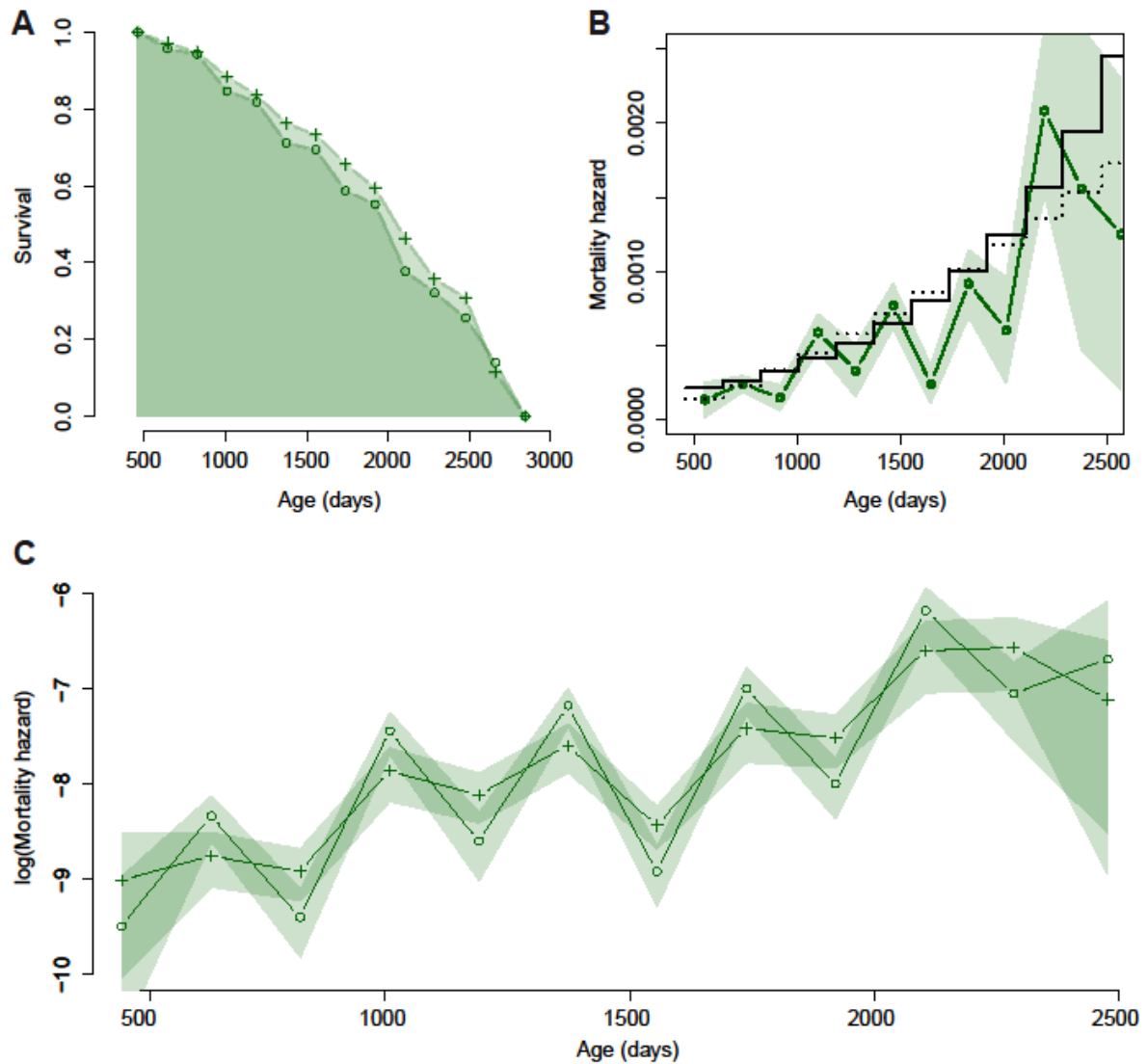
**Figure SM4: Upper panel.** Stacked number of births (left) and observations (right) recorded each year for each photoperiodic regimen. Reference individuals are represented in green, and accelerated individuals in brown ('20/20we' experiment), blue ('10/10we and 13/13we' experiment) and purple (exploratory experiment). **Lower panel.** Regression coefficients of the Cox models for each year of birth (left) and of observation (right) with 2000 as reference year (white dot). Vertical bars represent 95% confidence intervals of regression coefficients. The number of individuals born each year (for year of birth) and the number of season-individuals that started each year (for years of observation) are indicated. Each colour corresponds to a cluster that reflects the effect of each year on the mortality hazard of the individuals ('Good years' in green; 'Medium years' in blue; 'Bad years' in red).

**Table SM3:** Calibration of the reference survival model with Subset 1. Estimated coefficients for all variables retained in the statistically supported Cox models (all models within 2 AIC points from the best model) and parametric versions of the best Cox model with Gompertz (PH) and Weibull distributions. Significance symbols: 0-0.001 ‘\*\*\*’; 0.001-0.01 ‘\*\*’; 0.01-0.05 ‘\*’; 0.05-0.1 ‘.’. Reference levels are ‘Female’ for Sex, ‘LD’ for Season, and ‘Medium years’ cluster for YearBirth and YearObs. G and B stand for ‘Good years’ and ‘Bad years’ clusters, respectively.

Model	Covariates										AIC	Evidence Ratio
	Sex	Season	$\Delta.SR$	Mean.SR	Sex*Season	Sex* $\Delta.SR$	Season* $\Delta.SR$	YearBirth	YearObs			
cox1	-0.42*	-0.58	2.67		0.91**	-17.76*		G -15.16 B 0.64**	G -15.36 B 0.46.	1718.56	1.00	
PH gompertz1	-0.45*	-1.23***	2.48		0.94**	-17.77*		G -11.52 B 0.62**	G -12.36 B 0.51*	2862.01		
PH/AFT weibull1	-0.46*	-1.20***	2.61		0.94**	-17.87*		G -22.34 B 0.63**	G -27.15 B 0.51*	2866.45		
cox 2	-0.45*	-0.61	-0.23		0.98**	-21.28**	8.85	G -14.56 B 0.64**	G -15.40 B 0.47.	1719.32	1.46	
cox 3	-0.45*	-0.59	2.96		0.89**	-17.89*		G -12.01 B 0.79***		1719.48	1.59	
cox 4	-0.41*	-0.59	1.25	4.68	0.90**	-16.35*		G -14.52 B 0.64**	G -15.35 B 0.52.	1719.70	1.77	
cox 5	-0.44*	-0.62.	-2.18	5.45	0.98**	-20.00*	9.79	G -14.57 B 0.64**	G -15.38 B 0.53*	1720.22	2.30	
cox 6	-0.48*	-0.61	0.17		0.96**	-21.11**	8.34	G -12.04 B 0.79***		1720.41	2.53	



**Figure SM5:** (A) Cumulative AIC weights for each covariate over the 11043 Cox models that converged. Red bars indicate covariates retained in the best model. (B) Evidence ratio (on a logarithmic scale) of the 10000 Cox models with lowest AIC. A small number of models are better than all the others. (C) Martingale residuals plotted against the one continuous variable  $\Delta.SR$  in the case of the best Cox model ('cox1'). Red curves represent the loess smooth functions for censored and non-censored events (plain dot and circle respectively). No problem in the functional distribution of  $\Delta.SR$  was detected. (D) Schoenfeld residuals over age for each of the covariate from the best Cox model. The 'Good' cluster of the covariate *YearBirth*, incorporates only one individual, which explains the observed pattern of residuals for this cluster. No covariate showed deviation from the PH hypothesis.



**Figure SM6:** (A) Survival with age fitted from the best Cox model for reference males (crosses) and females (circles) ( $\Delta.SR$  is set to zero). Survival  $S(x) = e^{-H(x)} = \exp[-\int_0^x h(t)dt]$  were obtained by calculating mortality hazard  $h(t)$  for each season type independently using the ‘survfit’ function in ‘R’, and combining them according to each seasonal change. (B) Mortality hazard by age, estimated for each season using the best Cox model (in green), and the corresponding parametric Proportional Hazard Gompertz (black line) and Weibull (for comparison; black dotted line) models. The increase in mortality hazard with age is well described by the Gompertz model. (C) Mortality hazard estimates on a logarithmic scale by age, for each season and each sex from the best Cox model (crosses for males and circles for females). Mortality hazard is lower in SD and higher in LD for females than in males. Females exhibit more differences in mortality between seasons. In all figures, coloured zones correspond to 95% confidence intervals.

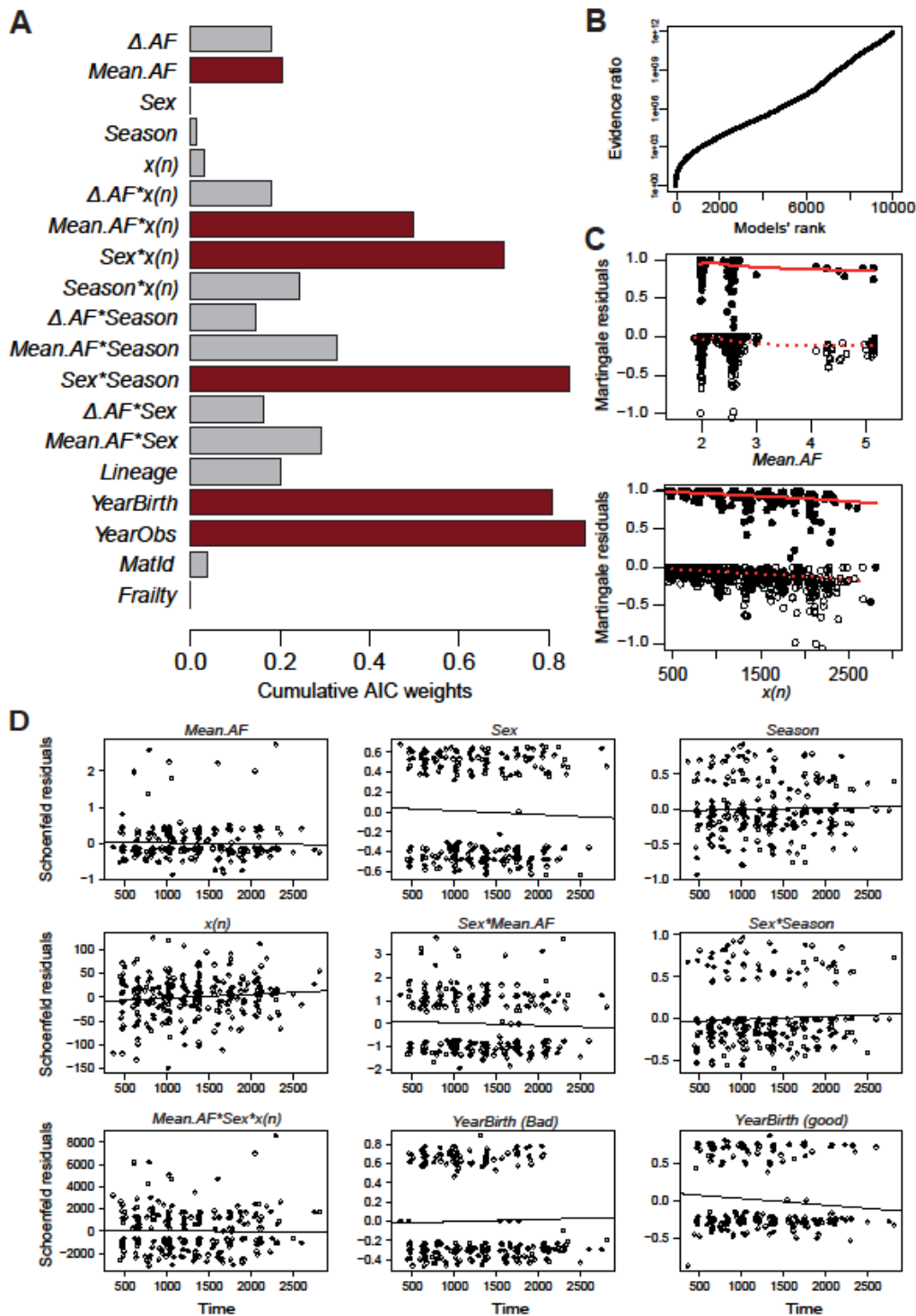
**Table SM4:** Modelling of mortality hazard in individuals exposed to different seasonal rhythms with Subset 2. Estimated coefficients for all variables retained in the statistically supported Cox model, and its piecewise version, for all individuals. Significance symbols: 0-0.001‘\*\*\*’; 0.001-0.01‘\*\*’; 0.01-0.05‘\*’; 0.05-0.1‘.’. Reference levels are ‘Female’ for *Sex*, ‘LD’ for *Season*, and ‘Medium years’ cluster for *YearBirth* and *YearObs*. *G* and *B* stand for ‘Good years’ and ‘Bad years’ clusters, respectively.

	<i>Sex</i>	<i>Season</i>	<i>Sex:Season</i>	Covariates										AIC
				<i>Mean.SR: Females</i>	<i>Mean.SR: Males</i>	<i>Mean.SR: Females (&gt;3.5 years)</i>	<i>Mean.SR: Males (&gt;3.5 years)</i>	<i>Mean.SR: Males:x(n)</i>	<i>Mean.SR: Females:x(n)</i>	<i>YearBirth</i>	<i>YearObs</i>			
Cox	0.37	-0.97***	0.79**	0.96.	1.00.	-4.33x10 <sup>-5</sup>	-3.39x10 <sup>-4</sup>					<i>G</i> NA	<i>G</i> NA	2696.71
												<i>B</i> 0.46**	<i>B</i> 0.62***	
Cox piecewise	-0.22	-1.03***	0.78**	1.24**	1.28***							<i>G</i> -14.45	<i>G</i> -15.31	2693.77
												<i>B</i> 0.44**	<i>B</i> 0.60***	



**Table SM5:** Modelling of mortality hazard in individuals exposed to different seasonal rhythms with Subset 2, for females and males separately. Estimated coefficients for all variables retained in the selected Cox and Cox piecewise models, as well as for the selected parametric (PH Gompertz for females and PH-AFT Gompertz for males) and parametric piecewise (PH Gompertz) models. Significance symbols: 0-0.001\*\*\*; 0.001-0.01\*\*; 0.01-0.05\*; 0.05-0.1. Reference levels are 'Female' for Sex, 'LD' for Season, and 'Medium years' cluster for YearBirth and YearObs. G and B stand for 'Good years' and 'Bad years' clusters, respectively. AFT and PH indicate the effect of the covariate on mortality (one covariate can have both effects in the case of PH-AFT models). Significance of the coefficients estimated from the PH-AFT parametric model could not be determined.

	Covariates							AIC
	Season	Mean.SR	>3.5 years	Mean.SR:x(n)	Mean.SR (>3.5 years)	YearBirth	YearObs	
<b>Females</b>								
Cox		-1.03***	1.17**			G -13.39	G -14.88	1247.00
						B 0.06	B 0.67**	
Cox piecewise		-1.04***	1.22**		-0.12	G -13.37	G -14.92	1248.93
						B 0.06	B 0.67**	
PH parametric		-1.15***	1.08**			G -10.39	G -11.88	2244.64
						B 0.07	B 0.65**	
PH piecewise parametric		-1.20***	0.74	-2.79.	0.98	G -10.49	G -11.66	2242.97
						B 0.11	B 0.57*	
<b>Males</b>								
Cox		-0.11	0.67	-2.09x10 <sup>-4</sup>		G NA	G NA	1098.45
						B 1.03***	B 0.53*	
Cox piecewise		-0.18	1.46***		-1.22***	G NA	G -15.51	1088.75
						B 0.88***	B 0.46.	
PH-AFT parametric		-0.37	PH 0.49			G NA	G -19.31	2025.28
			AFT -0.11			B 0.98	B 0.53	
PH piecewise parametric		-0.36.	1.18*	1.93	-0.99.	G NA	G -13.56	2023.64
						B 0.83**	B 0.47.	

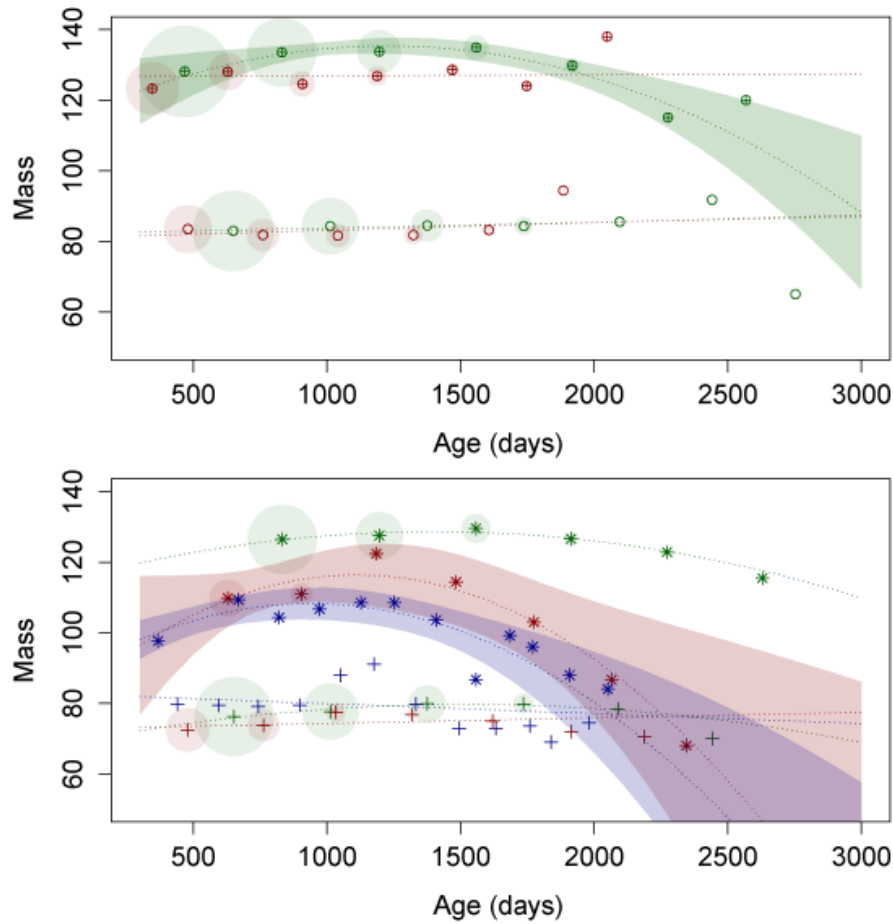


**Figure SM7:** (A) Cumulative AIC weights for each covariate over the 11653 Cox models that converged. Red bars indicate covariates retained in the best model. (B) Evidence ratio (on a logarithmic scale) of the 1000 Cox models with lowest AIC. A small number of models are better than all the others, with a quick increase of the evidence ratio. (C) Martingale residuals plotted against the two continuous variables *Mean.SR* and *x(n)* in the case of the best Cox model. Red curves represent the loess smooth functions for censored and non-censored events (plain dot and circle respectively). No problem in the functional distribution of the two covariates was detected. (D) Schoenfeld residuals over age for each of the covariate from the best Cox model. The ‘Good’ cluster of the covariate *YearBirth*, incorporates only one individual, which explains the observed pattern of residuals for this cluster. No covariate showed deviation from the PH hypothesis.

**Table SM6:** Effect of age on maximum or minimum body mass reached during a SD or a LD period (only significant results shown).

Sex	Seasonal rhythm (seasons/year)	Season	Intercept	Mass	Mass <sup>2</sup>	# individuals	# measures
<b>Females</b>	Reference (2)	SD	1.13 x10 <sup>2</sup> ***	3.68x10 <sup>-2</sup> **	-1.50x10 <sup>-5</sup> ***	224	507
<b>Males</b>	Experiment (2.6)	SD	7.91 x10 <sup>1</sup> ***	6.73x10 <sup>-2</sup> *	-3.03 x10 <sup>-5</sup> *	37	84
<b>Males</b>	Experiment (4-5)	SD	8.63 x10 <sup>1</sup> ***	4.68x10 <sup>-2</sup> ***	-2.49 x10 <sup>-5</sup> ***	27 <sup>1</sup>	194

<sup>1</sup> For this analyse, all the individuals following a 10/10 we or 13/13 we seasonal rhythm are incorporated (included those sacrificed not included in survival analyses), from their entrance in SD<sub>2</sub> season to their death.



**Figure SM8:** Change of body mass over age for females (upper panel) and males (lower panel). Each point corresponds to the averaged maximum body mass in SD (plain circles for females; crosses for males) and averaged minimum body mass in LD (empty circles for females; stars for males). Green, brown and blue points represent individuals experiencing respectively 2 (reference individuals), 2.6 ('20/20we' experiment) and 4-5 seasons per year ('10/10we and 13/13we'). Circular arrays are proportional to the number of measures used for the averaging. Dotted lines represent the predicted relationship between age and body mass according to the selected model (among the linear, quadratic and cubic regressions). Confidence intervals at 95% are plotted only for significant relationships (coloured zones).

**Table SM7:** Selected Cox and Cox piecewise models for females and males respectively, when including  $\Delta.Mass$ .

	Covariates						AIC
	Season	Mean.SR	Mean.SR (>3.5 years)	$\Delta.Mass$	YearBirth	YearObs	
<b>Females</b>							
Cox	-1.04***	0.84**		$-3.45 \times 10^{-2}$ ***	G -13.60 B 0.08	G -14.90 B 0.78***	1209
<b>Males</b>							
Cox piecewise	-0.21**	1.32 ***	-1.17 ***	$-1.98 \times 10^{-2}$ ***	B 0.71***	G -15.30 B 0.51 *	1048

## References

- Andrès, M., Gachot-Neveu, H. & Perret, M. Genetic determination of paternity in captive grey mouse lemurs: Pre-copulatory sexual competition rather than sperm competition in a nocturnal prosimian? *Behaviour* **138**, 1047–1063 (2001).
- Aubry, L. M., Cam, E., Koons, D. N., Monnat, J.-Y. & Pavard, S. Drivers of age-specific survival in a long-lived seabird: contributions of observed and hidden sources of heterogeneity. *J. Anim. Ecol.* **80**, 375–83 (2010).
- Aujard, F. *et al.* Artificially accelerated aging by shortened photoperiod alters early gene expression (*Fos*) in the suprachiasmatic nucleus and sulfatoxymelatonin excretion in a small primate, *Microcebus murinus*. *Neuroscience* **105**, 403–12 (2001).
- Bronikowski, A. M. *et al.* Aging in the natural world: Comparative data reveal similar mortality patterns across primates. *Science*. **331**, 1325–1328 (2011).
- Burnham, K. P. & Anderson, D. R. *Model Selection and Inference: A Practical Information-theoretic Approach*. (1998).
- Castanet, J. *et al.* Lines of arrested growth in bone and age estimation in a small primate: *Microcebus murinus*. *J. Zool.* **263**, 31–39 (2004).
- Cayetanot, F., Van Someren, E. J. W., Perret, M. & Aujard, F. Shortened seasonal photoperiodic cycles accelerate aging of the diurnal and circadian locomotor activity rhythms in a primate. *J. Biol. Rhythms* **20**, 461–9 (2005).
- Dammhahn, M. & Kappeler, P. M. Comparative feeding ecology of sympatric *Microcebus berthae* and *M. murinus*. *Int. J. Primatol.* **29**, 1567–1589 (2008).
- Eberle, M. & Kappeler, P. M. Sex in the dark: determinants and consequences of mixed male mating tactics in *Microcebus murinus*, a small solitary nocturnal primate. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **57**, 77–90 (2004a).
- Eberle, M. & Kappeler, P. M. Selected polyandry: female choice and inter-sexual conflict in a small nocturnal solitary primate (*Microcebus murinus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **57**, 91–100 (2004b).
- Eberle, M., Perret, M. & Kappeler, P. M. Sperm competition and optimal timing of matings in *Microcebus murinus*. *Int. J. Primatol.* **28**, 1267–1278 (2007).
- Geiser, F. Hibernation. *Curr. Biol.* **23**, 188–193 (2013).
- Giroud, S. *et al.* Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, 1958–1967 (2008).

- Giroud, S. *et al.* Late-born intermittently fasted juvenile garden dormice use torpor to grow and fatten prior to hibernation: consequences for ageing processes. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* **281**, 1–8 (2014).
- Hämäläinen, A. *et al.* Senescence or selective disappearance? Age trajectories of body mass in wild and captive populations of a small-bodied primate. *Proc. R. Soc. B* **281**, 1–10 (2014).
- Huchard, E. *et al.* Convenience polyandry or convenience polygyny? Costly sex under female control in a promiscuous primate. *Proc. Biol. Sci.* **279**, 1371–9 (2012).
- Klein, J. P. & Moeschberger, M. L. *Survival Analysis - Techniques for censored and truncated data, 2nd ed. Surviv. Anal. - Tech. censored truncated data* (Springer-Verlag, 2003).
- Kraus, C., Eberle, M. & Kappeler, P. M. The costs of risky male behaviour: sex differences in seasonal survival in a small sexually monomorphic primate. *Proc. Biol. Sci.* **275**, 1635–44 (2008).
- Languille, S. *et al.* The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. *Ageing Res. Rev.* **11**, 150–62 (2012).
- Lee, E. T. & Go, O. T. Survival analysis in public health research. *Annu. Rev. Public Health* **18**, 105–134 (1997).
- Liow, L. H., Fortelius, M., Lintulaakso, K., Mannila, H. & Stenseth, N. C. Lower Extinction Risk in Sleep-or-Hide Mammals. *Am. Nat.* **173**, 264–272 (2009).
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M. & Hornik, K. *cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions.* (2013).
- Mittermeier, R. A. *Lemurs of Madagascar.* (Conservation International, 2010).
- Neveu, H., Hafen, T., Zimmermann, E. & Rumpler, Y. Comparison of the genetic diversity of wild and captive groups of *Microcebus murinus* using the random amplified polymorphic DNA method. *Folia Primatol. (Basel)*. **69 Suppl 1**, 127–135 (1998).
- Perret, M. Change in photoperiodic cycle affects life span in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). *J. Biol. Rhythms* **12**, 136–145 (1997).
- Perret, M. & Colas, S. Manipulation of sex ratio at birth and maternal investment in female mouse lemurs (*Microcebus murinus*, Primates). *Appl. Anim. Behav. Sci.* **51**, 275–283 (1997).
- Perret, M. & Aujard, F. Regulation by photoperiod of seasonal changes in body mass and reproductive function in gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*): differential responses by sex. *Int. J. Primatol.* **22**, 5–24 (2001a).

- Perret, M. & Aujard, F. Daily hypothermia and torpor in a tropical primate: synchronization by 24-h light-dark cycle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R1925–R1933 (2001b).
- Pifferi, F., Aujard, F. & Perret, M. L’horloge biologique est-elle au centre du processus de vieillissement ? Études chez un primate non humain. *Biol. Aujourd’hui.* **208**, 281–287 (2015).
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (2013).
- Ricklefs, R. E. & Scheuerlein, A. Comparison of aging-related mortality among birds and mammals. *Exp. Gerontol.* **36**, 845–57 (2001).
- Schmid, J. & Kappeler, P. Fluctuating sexual dimorphism and differential hibernation by sex in a primate, the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **43**, 125–132 (1998).
- Schmid, J. Sex-Specific Differences in Activity Patterns and Fattening in the Gray Mouse Lemur (*Microcebus murinus*) in Madagascar. *J. Mammal.* **80**, 749–757 (1999).
- Schmid, J. Daily torpor in free-ranging gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*) in Madagascar. *Int. J. Primatol.* **22**, 1021–1031 (2001).
- Therneau, T. M. & Grambsch, P. M. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. (Springer, New York, 2000).
- Turbill, C., Ruf, T., Smith, S. & Bieber, C. Seasonal variation in telomere length of a hibernating rodent Seasonal variation in telomere length of a hibernating rodent. *Biol. Lett.* (2013).
- Vuarin, P., Dammhahn, M. & Henry, P.-Y. Individual flexibility in energy saving: body size and condition constrain torpor use. *Funct. Ecol.* **27**, 793–799 (2013).



## APPENDIX 1 – Description of the PH-AFT Gompertz model

Gompertz models of mortality hazard can be expressed as PH or AFT models:

$$h(t|z) = a \cdot e^{b \cdot t} \cdot e^{\alpha'z} \quad (\text{PH model})$$

$$h(t|x) = e^{\beta'x} \cdot a \cdot e^{b \cdot t \cdot e^{\beta'x}} \quad (\text{AFT model})$$

where  $a$  and  $b$  are the shape and scale parameters of the Gompertz distribution,  $t$  is the time at death or censoring, and  $\alpha'z$  and  $\beta'x$  are the parameters for the PH and the AFT models respectively (with  $\alpha$  and  $\beta$  the coefficients corresponding to the covariates values  $z$  and  $x$ ).

It is possible that some factors may have proportional effects (e.g. *Season*) and others have accelerated effects, such as the metrics describing seasonal rhythm. To take this into account, we developed a parametric model combining the two approaches (hereafter called PH-AFT model), which mortality hazard is expressed as:

$$h(t|x, z) = a \cdot e^{b \cdot t \cdot e^{\beta'x}} \cdot e^{\alpha'z} \cdot e^{\beta'x}$$

The likelihood function for right-censored and left-truncated data is defined as:

$$L(\beta, \alpha, \theta) = \prod_{i=1}^n \frac{[h_0(Y_i^a, \theta) \cdot e^{\beta'x} \cdot e^{\alpha'z}]^{\delta_i} \cdot [S_0(Y_i^a, \theta)]^{e^{\alpha'z}}}{[S_0(W_i^a, \theta)]^{e^{\alpha'z}}}$$

where  $\theta$  represents the parameters of the chosen distribution ( $a$  and  $b$  for Gompertz),  $Y_i$  and  $W_i$  are the censoring and truncation times of the  $i^{\text{th}}$  observation respectively.  $Y_i^a = Y_i \cdot e^{\beta'x}$  and  $W_i^a = W_i \cdot e^{\beta'x}$ .

## 1.2 Effet du déséquilibre de longueur des saisons sur la mortalité et le vieillissement

### Introduction

Les environnements saisonniers alternent des périodes favorables et défavorables pour les organismes qui y vivent. Les saisons défavorables se caractérisent par de mauvaises conditions climatiques telles que des températures particulièrement faibles ou élevées, qui s'accompagnent d'une limitation des ressources disponibles dans le milieu. Pour y survivre et pouvoir se reproduire une fois les conditions adéquates, les organismes saisonniers, tout du moins ceux qui ne migrent pas, ont développé diverses adaptations. Parmi celles-ci, de nombreuses espèces entrent en quiescence pour survivre aux conditions défavorables (Stuart & Brown 2006). La quiescence est un état d'hypométabolisme (et d'hypothermie pour les endothermes) accompagné d'une réduction, voire un arrêt, de la prise alimentaire. La quiescence peut se traduire par une diapause complète, comme chez l'*Artemia* (p. ex. *Artemia franciscana*) ou de nombreuses espèces d'insectes (p. ex. *Drosophila melanogaster*), lors de laquelle l'organisme cesse toute activité métabolique et qui peut durer plusieurs années. Dans le cas des espèces saisonnières, l'état de quiescence se limite à la période la plus défavorable de l'année. Dans les environnements à températures estivales élevées, certaines espèces vont estiver pendant plusieurs mois (p. ex. l'escargot terrestre *Helix aspersa* ou la grenouille *Neobatrachus centralis*). Pour les endothermes qui maintiennent leur température interne, plus la température externe est basse, plus l'homéothermie est coûteuse. Les espèces hétérothermes utilisent l'hibernation (de plusieurs jours à plusieurs semaines consécutives) ou la torpeur journalière (quelques heures par jour) pour survivre aux périodes les plus froides. L'utilisation de l'hibernation et de la torpeur est observée chez de nombreuses espèces réparties dans la plupart des ordres de mammifères, ainsi que plusieurs espèces d'oiseaux (p. ex. de nombreux rongeurs comme le loir gris *Glis glis*, la chauve-souris *Scotophilus heathi*, ou l'engoulevent de Nuttall *Phalaenoptilus nuttallii* hibernent ; la souris *Mus musculus*, le blaireau d'Amérique *Taxidea taxus* ou le podarge gris *Podargus strigoides* utilisent la torpeur ; Geiser 2004 ; Melvin & Andrews 2009 ; Geiser 2013).

En plus de voir leur survie accrue pendant la saison défavorable, les mammifères qui hibernent ou utilisent la torpeur (c.-à-d. les mammifères hétérothermes) montrent des histoires de vie plus lentes, avec une survie et une longévité plus importantes, que les espèces homéothermes "strictes" de même masse corporelle ou proches phylogénétiquement (Turbill *et al.* 2011). Par exemple, les espèces de chauves-souris qui utilisent ces mécanismes ont des durées de vie plus de 50% plus longues que les espèces qui ne les utilisent pas (Wilkinson & South 2002). Les espèces hétérothermes ont également un taux de vieillissement réduit (Stuart & Brown 2006 ; Turbill *et al.* 2011) et un risque plus faible d'extinction (Liow *et al.* 2009). L'augmentation de la longévité chez les mammifères hétérothermes semble être liée à l'augmentation de la résistance au stress oxydatif (c.-à-d. la production excessive de radicaux libres par l'activité métabolique, responsable de dommages cellulaires ; (Finkel & Holbrook 2000) en période de torpeur qui entraîne une diminution du taux de dégénérescence cellulaire et protège les cellules contre le vieillissement (Stuart & Brown 2006). La torpeur favorise également les mécanismes de protection et de réparation de l'ADN, avec par exemple une élongation des télomé-

mères (régions terminales des chromosomes qui protègent l'ADN contre l'érosion) observée chez le hamster russe (*Phodopus sungorus*; Turbill *et al.* 2012). Enfin, l'augmentation de la survie pendant la saison défavorable est fortement liée à la diminution de la pression de prédation induite par la limitation de l'activité locomotrice des organismes en hypothermie (Turbill *et al.* 2011). Nous posons donc l'hypothèse que les mécanismes d'hypométabolisme diminueraient la mortalité, voire même le vieillissement.

Cette hypothèse semble particulièrement pertinente dans le cas du microcèbe murin. En effet, le microcèbe murin utilise la torpeur pendant les heures les plus froides de la journée en saison sèche (période de SD). Les femelles utilisent plus la torpeur que les mâles qui restent relativement actifs au cours de la saison défavorable (Schmid 2001). L'entrée en torpeur dépend, pour cette espèce, en majorité de la photopériode (Aujard *et al.* 1998), mais également de la température extérieure (Aujard & Vasseur 2001), de la disponibilité en nourriture dans le milieu (Vuarin *et al.* 2015) ainsi que de la masse et la condition corporelle (Vuarin *et al.* 2013a). L'utilisation de la torpeur chez cette espèce s'accompagne d'un engraissement en fin de saison favorable, comme c'est le cas pour la majorité des hétérothermes de taille moyenne et grande (c.-à-d. de plus de 70g; Geiser 2004). La graisse ainsi stockée est ensuite utilisée comme principale source d'énergie pendant la saison défavorable. Les microcèbes utilisent donc la torpeur et l'engraissement pour économiser leur énergie et augmenter leurs chances de survivre à la saison défavorable. Diminuer le temps passé en SD signifie diminuer le temps alloué à la maintenance et à la réparation de l'organisme associées à l'utilisation de l'hypométabolisme. Nous nous attendons donc à ce que cette diminution diminue la survie des microcèbes, voire même accélère leur vieillissement.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet d'un raccourcissement des périodes de SD. Nous avons analysé la mortalité d'individus exposés à des saisons SD plus courtes que leurs saisons LD. Diminuer le temps passé en période de SD devrait entraîner une mortalité plus importante. Deux mécanismes seraient alors possible. Premièrement, diminuer la longueur absolue des périodes de SD peut affecter la mortalité car un temps en SD minimal est nécessaire à la maintenance et à la réparation de l'organisme. Alternativement, la diminution de la longueur des saisons SD relativement aux saisons LD serait responsable de l'augmentation de la mortalité proportionnelle par rapport aux dommages accumulés en LD. Dans ce cas, les longueurs de saisons seraient complémentaires dans leurs effets sur la mortalité, avec par exemple un temps minimum nécessaire à passer en SD pour compenser les dommages subis par l'organisme pendant la période de LD précédente. La durée minimum en SD pour un bon équilibre dépendrait de l'état de l'organisme, et donc de la longueur des LD.

Cette étude nous permettra également d'affiner nos résultats du Chapitre 1.1. Dans le Chapitre 1.1, nous avons analysé les trajectoires de mortalité de microcèbes captifs exposés à l'alternance de périodes de 6 mois de jours longs (LD; 14h de lumière par jour; équivalent de la saison humide de Madagascar) et de 6 mois de jours courts (SD; 10h de lumière par jour; équivalent de la saison sèche de Madagascar), ou à un rythme saisonnier accéléré obtenu en raccourcissant le temps passé dans chaque saison (avec un temps similaire passé en LD et en SD). Nous avons montré que l'augmentation de la fréquence des transitions saisonnières entraîne une forte augmentation de la mortalité par rapport

aux individus en conditions de référence.

Dans cette étude, nous avons analysé la mortalité des individus utilisés dans le Chapitre 1.1 auxquels ont été ajoutés des individus passant moins de temps en saison SD relativement à leurs saisons LD.

## Matériel et méthodes

### Colonie captive

Pour cette analyse, nous avons ré-analysé les suivis démographiques des individus adultes sélectionnés pour l'analyse de l'effet de l'accélération du rythme saisonnier sur la mortalité (voir Chapitre 1.1) : les individus exposés à l'alternance de 6 mois de LD et 6 mois de SD au cours d'une année (comme en nature ; "individus de référence") et ceux exposés à un rythme saisonnier accéléré (de 2 à 5 saisons par an ; "individus accélérés"). Nous avons ajouté à ces données les suivis de 152 individus adultes exposés à un rythme saisonnier accéléré et déséquilibré ("individus en déséquilibre"), c'est-à-dire dont les saisons SD sont plus courtes que les saisons LD. Tous les individus pris en compte ont été exposés au même régime photopériodique tout au long de leur vie.

Le rythme "déséquilibré" a été mis en place dans la colonie captive pour des raisons de gestion d'élevage. Afin de diminuer l'intervalle de temps entre les événements de reproduction, 82% des individus de la colonie ont été exposés à l'alternance d'environ 5 mois de LD et 3-4 mois de SD (entre 1987 et 2006 ; Table 1.1). Le fait que ce régime photopériodique ait été appliqué dans le cadre de la gestion de l'élevage et non dans un cadre expérimental, explique qu'il y ait une variance de déséquilibre et d'accélération entre individus. En prenant en compte les changements ponctuels de régimes photopériodiques dus à la gestion à court terme de l'élevage, le rythme saisonnier des individus en déséquilibre est en moyenne de 2,7 saisons/an (Table 1.1). Le jeu de données analysé regroupe au total 943 individus (455 mâles et 488 femelles ; 391 morts de causes naturelles et 552 censurés ; Table 1.1).

Tous les individus en déséquilibre saisonnier sont donc accélérés et nous n'avons pas d'individus suivant un rythme de 2 saisons par an mais de longueurs différentes. Nous sommes pleinement conscients que nous n'avons donc pas un continuum de déséquilibre indépendant du niveau d'accélération des saisons.

TABLE 1.1 – Résumé des différents groupes d'individus selon leur régime photopériodique. Les écarts-types sont indiqués entre parenthèses.

	Rythme saisonnier moyen (saisons/an)	# moyen de saisons vécues	Longueur de		Age moyen d'entrée en SD2 (jours)	# individus				
			LD (mois)	SD (mois)		Total	Mâles	Femelles	Morts	Censures
Références	2,0 (±0,02)	6,9 (±3,0)	5,7 (±1,0)	5,5 (±1,5)	468,3 (±16,2)	576	278	298	167	409
Accélérés "20/20xe"	2,6 (±0,07)	7,3 (±3,5)	4,6 (±1,1)	4,2 (±0,9)	347,4 (±24,4)	107	50	57	64	43
Accélérés "Exploratory"	2,5 (±0,21)	9,1 (±4,9)	5,0 (±0,9)	4,4 (±1,2)	385,0 (±56,8)	34	15	19	18	16
Accélérés "10/10-13/13we"	4,9 (±0,38)	24,4 (±3,8)	2,5 (±0,6)	2,5 (±0,7)	-	12	12	0	9	3
En déséquilibre	2,7 (±0,17)	11,6 (±5,3)	4,9 (±1,1)	4,0 (±0,8)	340,1 (±46,4)	152	66	86	113	39

## Equilibre saisonnier

Pour incorporer l'équilibre saisonnier dans nos modèles, il nous faut introduire de nouvelles co-variables en plus de celles présentées dans le Chapitre 1.1. Deux métriques ont été calculées pour capturer l'effet du temps passé en SD et les écarts ponctuels au régime photopériodique moyen sur l'ensemble de la vie des individus :

- Equilibre saisonnier instantané [ $Inst.SE(i,n)$ ] - Déséquilibre potentiel entre les longueurs des saisons LD et SD vécues par l'individu  $i$  dans sa  $n^{\text{ème}}$  saison au cours du cycle saisonnier de deux saisons précédent, tel que :

$$Inst.SE(i,n) = \frac{\text{longueur LD} + \text{longueur SD}}{2 \cdot \text{longueur SD}}$$

qui peut s'écrire comme suit dans le cas où  $n$  est une saison SD :

$$Inst.SE(i,n) = \frac{[x(i,n) - x(i,n-1)] + [x(i,n+1) - x(i,n)]}{2[x(i,n) - x(i,n-1)]}$$

où  $x(i,n)$  est l'âge de l'individu  $i$  au début de sa  $n^{\text{ème}}$  saison. Cette métrique permet de capturer les variations de l'équilibre saisonnier qui interviennent au cours de la vie d'un individu (dues à la gestion de l'élevage).  $Inst.SE$  permet donc de capturer l'effet de variations d'équilibre saisonnier à court terme sur la mortalité.

- Equilibre saisonnier moyen [ $Mean.SE(i,n)$ ] - Equilibre saisonnier moyen vécu par l'individu  $i$  depuis son entrée en première période de SD (SD1) et jusqu'à sa  $n^{\text{ème}}$  saison, tel que :

$$Mean.SE(i,n) = \frac{1}{n(i)} \sum_{s=1}^{s=n(i)} Inst.SE(i,n)$$

Cette métrique capture les effets sur le long terme du déséquilibre saisonnier, moyenné sur la vie d'un individu jusqu'à sa  $n^{\text{ème}}$  saison, sur la mortalité.

Plus la longueur de la saison SD diminue, plus les métriques  $Inst.SE$  et  $Mean.SE$  augmentent. Selon notre hypothèse, nous nous attendons donc à ce qu'une augmentation de ces métriques augmentent la mortalité.

Au début de la vie d'un individu,  $Inst.SE$  et  $Mean.SE$  sont égaux. Cependant, au fur et à mesure que l'individu vieillit,  $Inst.SE$  peut s'écarter du déséquilibre moyen ( $Mean.SE$ ). Pour décorrélérer ces deux variables, nous avons utilisé  $\Delta.SE = Mean.SE - Inst.SE$  au lieu de  $Inst.SE$  dans les analyses (Figure 1.3).  $Mean.SE$  capture l'effet de grandes différences d'équilibres saisonniers (sur le long terme), alors que  $\Delta.SE$  permet d'ajuster les modèles en tenant compte des déviations sur le court terme de l'équilibre saisonnier par rapport à sa valeur moyenne.

Afin de tester si l'effet du déséquilibre traduit l'effet du raccourcissement des périodes SD relativement à la durée des LD ou celui de la longueur absolue des SD, les quatre interactions possibles entre les deux variables décrivant l'équilibre saisonnier et celles décrivant le rythme saisonnier ( $Mean.SR$

et  $\Delta.SR$ ; voir Chapitre 1.1 pour leur description) ont été incorporées dans nos analyses. En effet, l'interaction  $Inst.SR * Inst.SE$  peut s'écrire :

$$Inst.SR * Inst.SE = \frac{2}{longueur LD + longueur SD} \cdot \frac{longueur LD + longueur SD}{2 \cdot longueur SD}$$

$$Inst.SR * Inst.SE = \frac{1}{longueur SD}$$

Les données analysées contiennent suffisamment de variabilité dans ces covariables pour tester ces interactions (voir Figure 1.3). Les interactions entre les métriques décrivant le rythme et l'équilibre saisonniers sont corrélées négativement à la longueur des périodes SD. Une diminution de la durée des périodes SD absolue ou relativement à la durée des LD entraîne une augmentation de  $Inst.SE$ . Nous nous attendons à ce qu'une telle diminution augmente la mortalité.

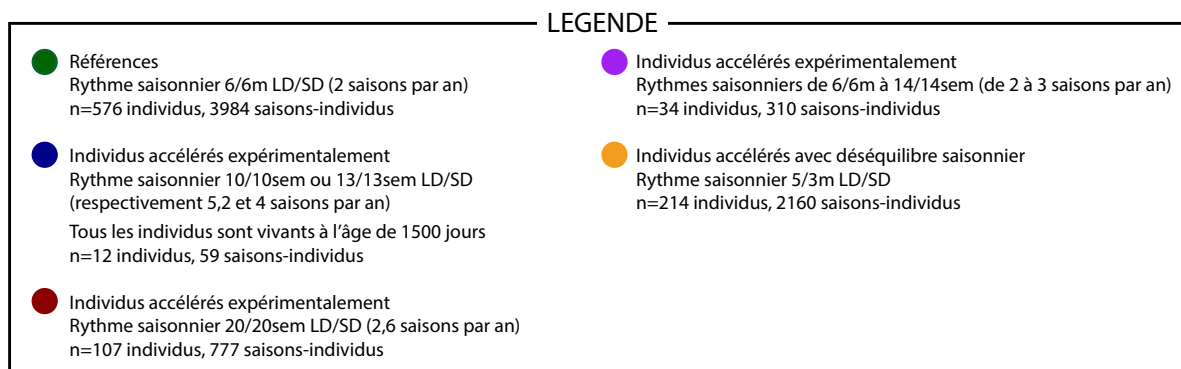
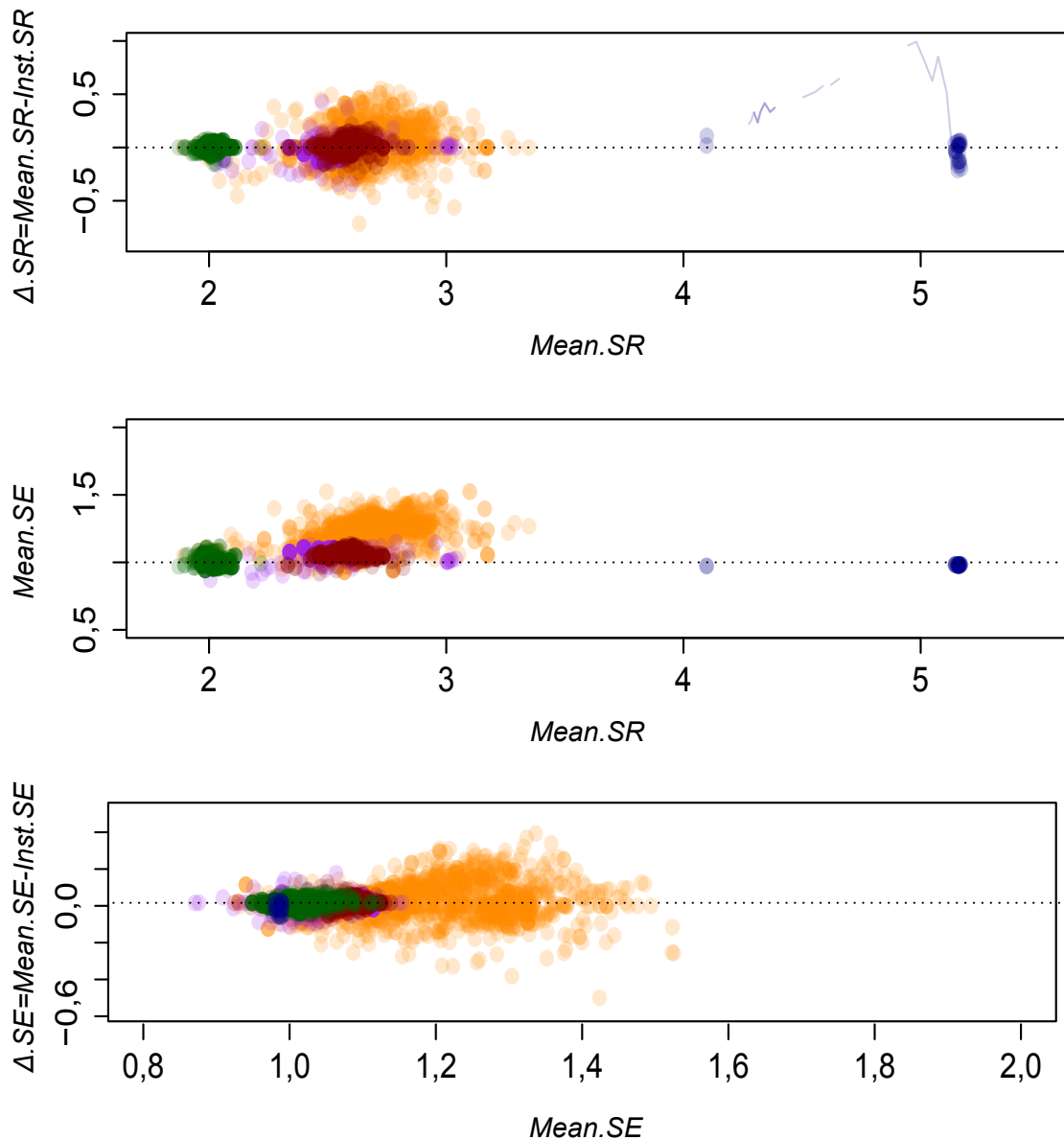


FIGURE 1.3 – Relation entre les métriques décrivant le rythme et le déséquilibre saisonniers.  $\text{Mean.SR}$  capture le rythme saisonnier moyen (en nombre de saisons par an) sur l'ensemble des périodes vécues par un individu (varie dans le temps) ;  $\Delta.SR$  est l'écart du rythme saisonnier instantané par rapport à sa valeur moyenne pour chaque individu.  $\text{Mean.SE}$  est le déséquilibre saisonnier moyen sur l'ensemble des périodes vécues par un individu (varie dans le temps) ;  $\Delta.SE$  représente l'écart de l'équilibre saisonnier instantané par rapport à  $\text{Mean.SE}$  pour chaque individu. Les lignes bleues correspondent à trois individus qui ont légèrement changé de rythme saisonnier (voir Chapitre 1.1).



## Analyses de survie

Dans le Chapitre 1.1, nous avons mis en évidence que les mâles et les femelles ont des patrons de mortalité différents avec l'âge et ne répondent pas au rythme saisonnier de la même façon. Nous avons donc choisi d'analyser de nouveau chaque sexe séparément.

Toujours d'après les analyses présentées dans le Chapitre 1.1, pour tous les individus, le modèle de Cox qui décrit le mieux la mortalité des individus exposés à différents rythmes saisonniers prend en compte les effets du rythme saisonnier moyen (*Mean.SR* ; voir Chapitre 1.1), la saison (*Season* ; LD ou SD), et les années de naissance et d'entrée dans la saison (variables d'ajustement ; respectivement *YearBirth* et *YearObs*). Cependant, pour les mâles uniquement, le rythme saisonnier n'affecte pas la mortalité de la même façon avant et après 3,5 ans (1285 jours ; modèle "par morceaux" ou "piecewise" en anglais).

Pour chaque sexe séparément, nous avons construit les modèles de Cox incorporant toutes les combinaisons possibles entre (i) les covariables retenues par l'analyse précédente (*Mean.SR* dont l'effet varie avec l'âge ou non, *Season*, *YearBirth* et *YearObs*) ; (ii) les covariables décrivant l'équilibre saisonnier (*Mean.SE* et  $\Delta.SE$ ) ; (iii) les écarts ponctuels au rythme saisonnier moyen  $\Delta.SR$  (voir description Chapitre 1.1) ; (iv) les interactions entre *Mean.SR*,  $\Delta.SR$ , *Mean.SE* ;  $\Delta.SE$  et *Season* ; (v) les interactions entre ces variables et l'âge à l'entrée dans la saison ( $x(n)$ ) pour détecter les covariables dont les effets varient avec l'âge des individus ; (vi) les variables d'ajustement : la lignée maternelle *Lineage*, la fragilité *Frailty* et l'effet maternel *MatId* (voir description Chapitre 1.1). Dans l'étude précédente, le modèle sélectionné pour décrire la mortalité des mâles est un modèle de Cox "par morceaux". Nous avons donc uniquement considéré des modèles "par morceaux", 5759 au total. Dans le cas des femelles, dans l'analyse précédente le modèle sélectionné est un modèle de Cox. Nous avons donc construit des modèles de Cox (1439) et de Cox "par morceaux" (5759) pour caractériser la mortalité femelle. Les versions paramétriques (PH et PH-AFT ; avec une distribution de Gompertz ; voir Chapitre 1.1) des modèles de Cox sélectionnés ont également été testées.

## Résultats

Pour les mâles comme pour les femelles, nos modèles montrent que les individus accélérés exposés à un déséquilibre saisonnier survivent mieux que les accélérés (voir Figure 1.4 pour une visualisation des données brutes).

Concernant les mâles, tous les modèles testés convergent, à l'exception de ceux incorporant *Frailty* et *MatId*, et respectent l'hypothèse PH. Les poids d'AIC cumulés calculés pour chaque variable et interaction montrent que l'interaction *Mean.SR:Mean.SE*,  $\Delta.SR$  et  $\Delta.SE$  sont sur-représentés dans les modèles à faible AIC (Figure 1.5.A). Parmi les 13 meilleurs modèles ( $\Delta AIC < 2$ ), tous incluent ces covariables (seules ou en interaction avec une autre covariable). Le meilleur modèle est le modèle de Cox "par morceaux" sélectionné dans l'étude précédente (voir Chapitre 1.1) : *Season+Mean.SR(< ou > 3,5ans)+YearBirth+YearObs*, auquel s'ajoute un effet négatif du déséquilibre saisonnier (*Mean.SE*) sur la mortalité (Table 1.2 ; voir Figure 1.5.C et D pour les graphiques de diagnostique). Cet effet de *Mean.SE* est d'autant plus important que le rythme saisonnier est accéléré (interaction positive

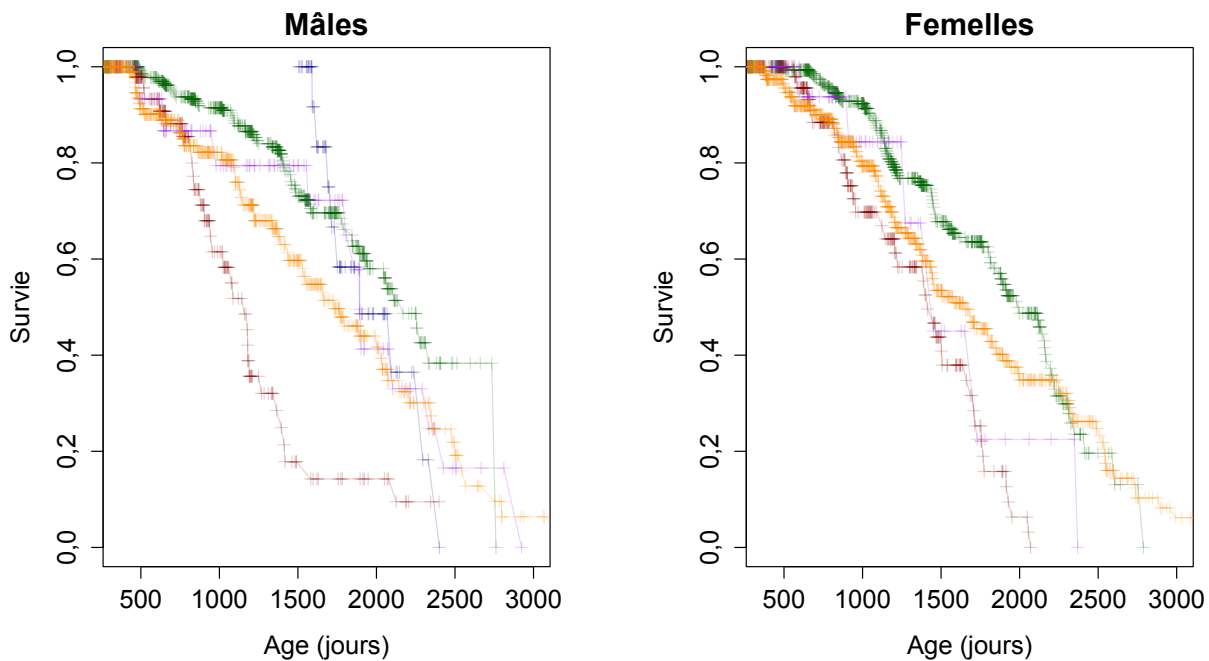


FIGURE 1.4 – Fonction de survie estimée par la méthode de Kaplan-Meier selon l'âge pour les mâles et les femelles, et par régime photopériodique : les références (en vert), les accélérés ("20/20we" en rouge ; "Exploratory experiment" en bleu et Groupe "10/10-13/13we" en violet) et les individus exposés à un rythme saisonnier accéléré et déséquilibré (en orange). Chaque croix correspond à une mort naturelle ou à une censure.

*Mean.SR:Mean.SE*). *Mean.SE* affecte la mortalité de la même façon avant et après 3,5 ans, âge après lequel l'effet de l'accélération saisonnière diminue.  $\Delta.SR$  et  $\Delta.SE$  sont également pris en compte et affectent négativement la mortalité. Nous pouvons noter que le coefficient associé à l'effet de  $\Delta.SE$  sur la mortalité paraît anormalement élevé (Table 1.2). La distribution des résidus des martingales (Figure 1.5.C) montre clairement un écart à la linéarité des covariables continues dans le cas du meilleur modèle. Bien que ce modèle soit insatisfaisant et explique de façon insuffisante les données, ce modèle tend vers une diminution de la mortalité en fonction d'une diminution de la longueur des saisons SD.

Le déséquilibre saisonnier augmente lorsque la durée des périodes de SD diminue (pour une même longueur de LD). De plus, l'interaction *Mean.SR:Mean.SE* est significative, ce qui indique que c'est l'effet de la longueur absolue des périodes SD qui affecte la mortalité et non la durée relative par rapport aux LD. D'après nos résultats, moins un mâle passe de temps en SD, et plus sa mortalité diminue.

Afin d'illustrer ces résultats, nous prendrons comme exemple le cas de trois individus exposés soit au régime photopériodique de référence (6/6 mo LD/SD ; *Mean.SR*=2 ; *Mean.SE*=1), soit à une saison supplémentaire par an avec LD et SD de même longueur ( 4/4 mo LD/SD ; *Mean.SR*=2,8 ; *Mean.SE*=1), soit à l'alternance de 5 mois de LD et 3 mois de SD qui correspond au même rythme saisonnier que l'individu accéléré avec un déséquilibre saisonnier (5/3 mo LD/SD ; *Mean.SR*=2,8 ; *Mean.SE*=1,3). L'espérance de vie des jeunes mâles adultes (à leur entrée en SD2) est de 4,7 ans pour l'individu de référence, diminue à 4 ans pour l'accéléré et atteint 5,9 ans pour l'individu en déséquilibre (Figure 1.6). Que ce soit avant ou après 3,5 ans, le risque de mortalité est le plus faible

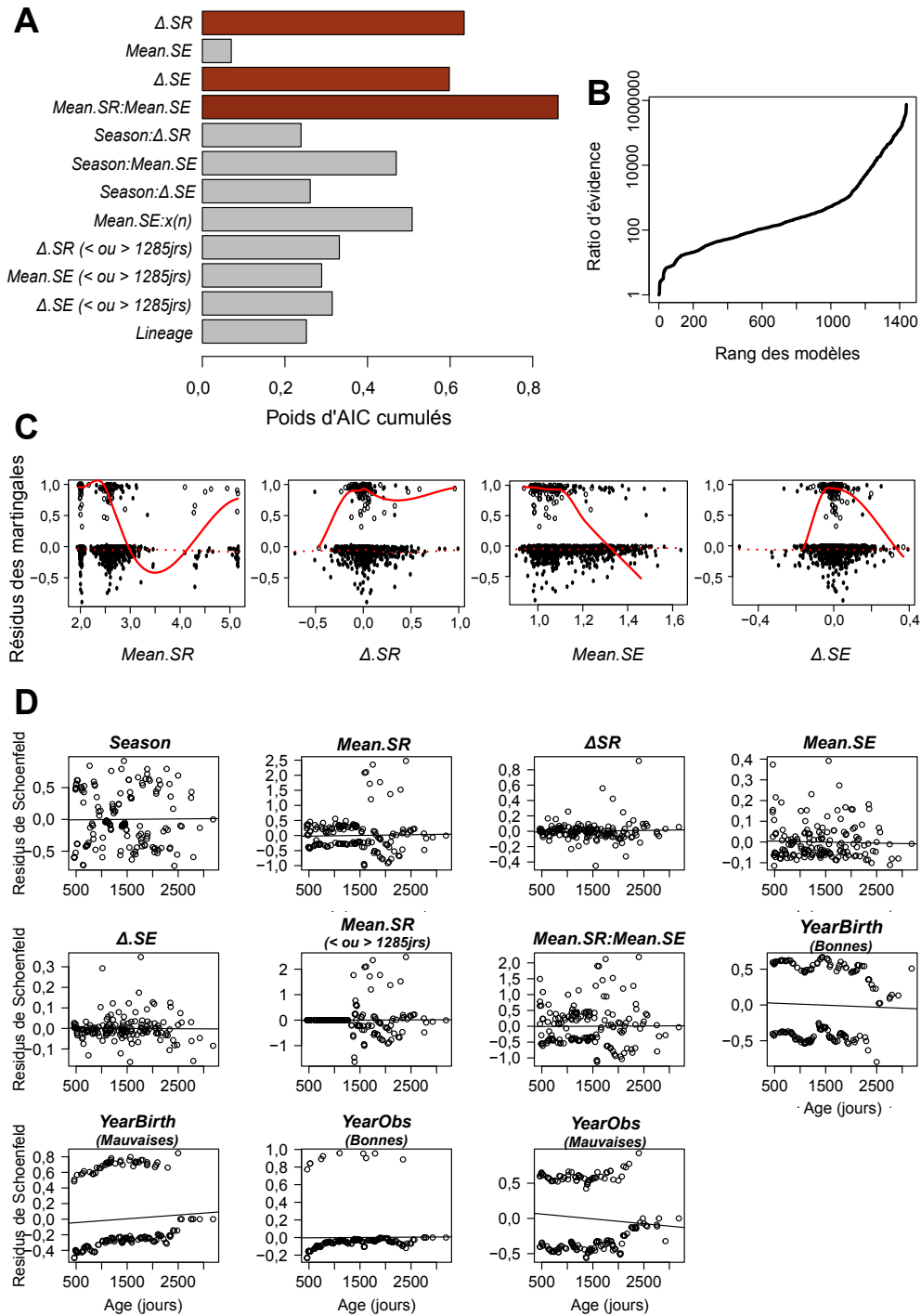


FIGURE 1.5 – Sélection des covariables et graphiques de diagnostique pour le meilleur modèle de Cox, dans le cas des mâles. (A) Poids d'AIC cumulés pour chaque variable (à l'exception de *Season*, *Mean.SR*, *Mean.SR(< ou > 1285jrs)*, *YearBirth* et *YearObs* qui ont été systématiquement incluses dans les modèles car sélectionnées par les analyses précédentes), pour les 1439 modèles de Cox qui convergent. Les covariables retenues par notre meilleur modèle sont indiquées en rouge. (B) Ratios d'évidence (à l'échelle logarithmique) de tous les modèles considérés. (C) Résidus des martingales par rapport aux variables continues dans le cas du meilleur modèle de Cox. Les régressions locales ("loess smooth functions") sont tracées en rouge pour les censures (cercles pleins) et les morts naturelles (cercles vides). Les distributions des covariables considérées ne sont pas linéaires et le modèle n'est donc pas satisfaisant. (D) Résidus de Schoenfeld selon l'âge pour chaque covariable et interaction incluse dans le meilleur modèle de Cox. Aucune covariable du modèle sélectionné ne montre d'écart à l'hypothèse PH.

TABLE 1.2 – Estimation des coefficients correspondant aux effets des variables sur la mortalité pour les meilleurs modèles semi- et paramétriques. Le degré de significativité est symbolisé comme suit : 0-0,001 '\*\*\*\*' ; 0,001-0,01 '\*\*\*' ; 0,01-0,05 '\*\*' ; 0,05-0,1 '\*'. Les niveaux de références sont 'Femelles' pour le sexe, 'LD' pour la saison, et 'Medium years' pour *YearBirth* et *YearObs*. *G* et *B* correspondent aux bonnes ('Good') et mauvaises ('Bad') années respectivement. *AFT* et *PH* indiquent l'effet de la covariable sur la mortalité (une covariable peut avoir les deux effets dans le cas des modèles PH-AFT). La significativité des coefficients estimés par les modèles PH-AFT n'a pas pu être déterminée.

	Covariables										AIC		
	Season	Mean.SR	$\Delta$ .SR	Mean.SE	$\Delta$ .SE	>3,4/3,5 ans	Mean.SE: $x(n)$	Mean.SR (>3,5 ans)	Mean.SE (>3,4 ans)	Mean.SR: Season: $\Delta$ .SE		<i>YearBirth</i>	<i>YearObs</i>
<b>Mâles</b>													
Cox "par morceaux"	-0,36.	-11,83*	-1,94*	-39,75**	4,73**			-0,66**		12,87*	G 0,91**** B 1,73****	G -0,15 B -0,40*	1528,4
PH-AFT paramétrique	-0,45	AFT -0,09 PH -7,74	-1,69	-26,05	3,80					8,31	G 0,88 B -0,83	G -0,28 B 0,09	2732,0
PH "par morceaux" paramétrique	-0,45**	-11,60*	-1,75*	-38,56**	4,21*	1,32		-0,62		12,55*	G 0,86**** B 1,68****	G -0,14 B -0,38*	2730,7
<b>Femelles</b>													
Cox	-1,25***	0,93*	2,13*	1,16	-3,74*		-2,86x10 <sup>-3</sup> **			6,63*	G 0,45* B -0,23	G -0,03 B 0,16	1926,2
Cox "par morceaux"	-1,41***	0,90*	2,15*	-1,65	-4,06*					6,78*	G 0,47** B -0,30	G 4,46x10 <sup>-3</sup> B 0,19	1922,0
PH-AFT paramétrique	-1,32	1,07	2,03	AFT -1,43	-3,58					7,04	G 0,42 B -0,28	G 1,37x10 <sup>-3</sup> B 0,17	3340,5
PH "par morceaux" paramétrique	-1,34***	0,95*	2,28**	-0,91	-4,37**	4,33**				6,97**	G 0,30 B 0,73****	G -0,24 B -0,16	3336,5

pour l'individu exposé à un déséquilibre saisonnier. Avant cet âge limite, le risque de mortalité est 1,3 fois plus important pour le mâle référence et 3 fois plus pour l'accélééré que pour l'individu en déséquilibre. Après 3,5 ans, le risque de mortalité du mâle accéléré diminue, de même que celui du mâle en déséquilibre, de sorte qu'il soit toujours 3 fois plus important pour l'accélééré mais 2,2 fois plus grand pour le référence par rapport au mâle exposé à un rythme déséquilibré.

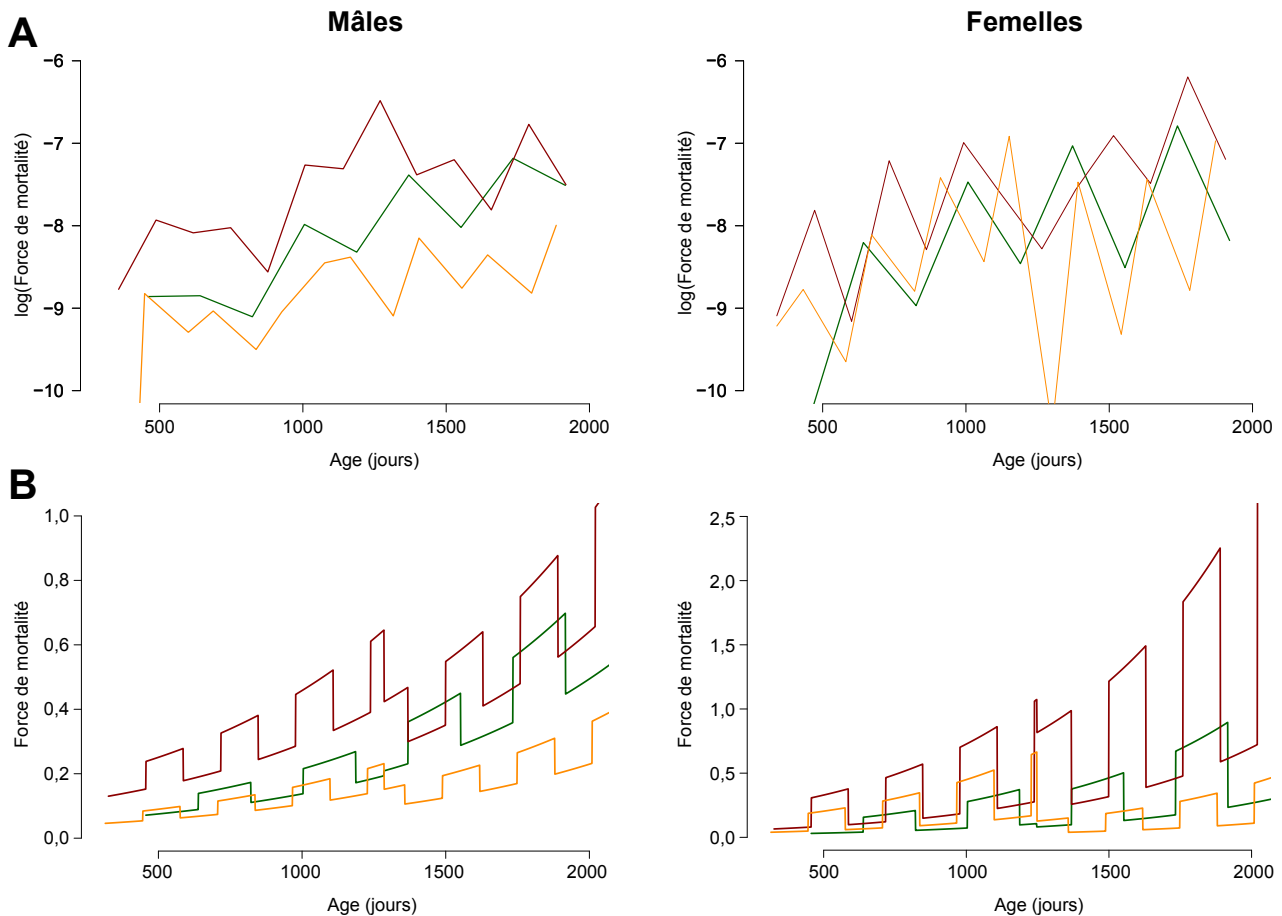


FIGURE 1.6 – Effet du rythme et de l'équilibre saisonniers sur les trajectoires de mortalité avec l'âge, pour les mâles et les femelles. (A) Force de mortalité (à l'échelle logarithmique) selon l'âge, pour des mâles et des femelles, estimé par les modèles de Cox sélectionnés pour chaque sexe respectivement, pour un individu de référence (en vert), un individu accéléré exposé à une saison supplémentaire par an (LD et SD de même longueur; en rouge) et un individu accéléré et en déséquilibre exposé à un rythme 5/3mo LD/SD (en orange). Chaque point correspond au milieu d'une saison. (B) Force de mortalité avec l'âge estimé par les modèles paramétriques sélectionnés.

Concernant les femelles, tous les modèles testés convergent, là encore à l'exception de ceux incorporant *Frailty* et *MatId*, et respectent l'hypothèse PH. Les poids d'AIC cumulés calculés pour chaque variable et interaction montrent que les interactions *Mean.SE:x(n)* et *Season:Δ.SE* sont sur-représentées dans les modèles à faible AIC (Figure 1.7.A). Ces interactions sont présentes dans tous les meilleurs modèles. Le modèle de Cox sélectionné inclut *Season*, *Mean.SR*, *YearBirth* et *YearObs* (meilleur modèle pour décrire la mortalité des femelles références et accélérées, Chapitre 1.1), ainsi que *Δ.SR* et *Δ.SE* et les interactions *Mean.SE:x(n)* et *Season:Δ.SE* (Table 1.2).

*Mean.SE* n'a pas le même effet tout au long de la vie d'un individu. Nous avons donc utilisé des modèles de Cox "par morceaux" pour chercher à déterminer si cet effet change brusquement après

un (ou plusieurs) âge limite. Nous avons sélectionné un effet de *Mean.SE* sur la mortalité différent avant et après 1247 jours (3,4 ans). Après avoir testé tous les modèles "par morceaux" possibles, le meilleur modèle est la version "par morceaux" du modèle de Cox sélectionné précédemment (et dont l'AIC est meilleur ; Table 1.2 ; Figure 1.7.A et B pour la sélection des covariables et C et D pour les graphiques diagnostiques). Le déséquilibre saisonnier n'interagit pas avec le rythme saisonnier. L'effet de *Mean.SE* traduit donc l'effet de la longueur des périodes SD relative par rapport aux LD.

Chez les femelles, la diminution du temps passé en SD diminue faiblement la mortalité. Cet effet s'accroît après 3,4 ans. De nouveau, nous prendrons l'exemple de trois femelles adultes exposées soit au régime photopériodique de référence, soit à une saison supplémentaire par an avec LD et SD de même longueur, soit à un rythme de 5/3 mois LD/SD. L'espérance de vie des jeunes femelles (de leur entrée en SD2 à 3,4 ans) est de 4,3 ans pour l'individu référence, 3,6 ans pour l'accélééré et atteint 4,8 ans pour l'individu en déséquilibre (Figure 1.6). Avant 3,4 ans, le risque de mortalité le plus faible est celui de l'individu de référence ; il est 1,3 fois plus grand pour l'individu en déséquilibre et 2,1 fois plus important pour l'accélééré. Après cet âge limite, le risque de mortalité de la femelle en déséquilibre devient le plus faible ; il est 2,1 fois plus grand pour le référence et 3,4 fois pour l'accélééré.

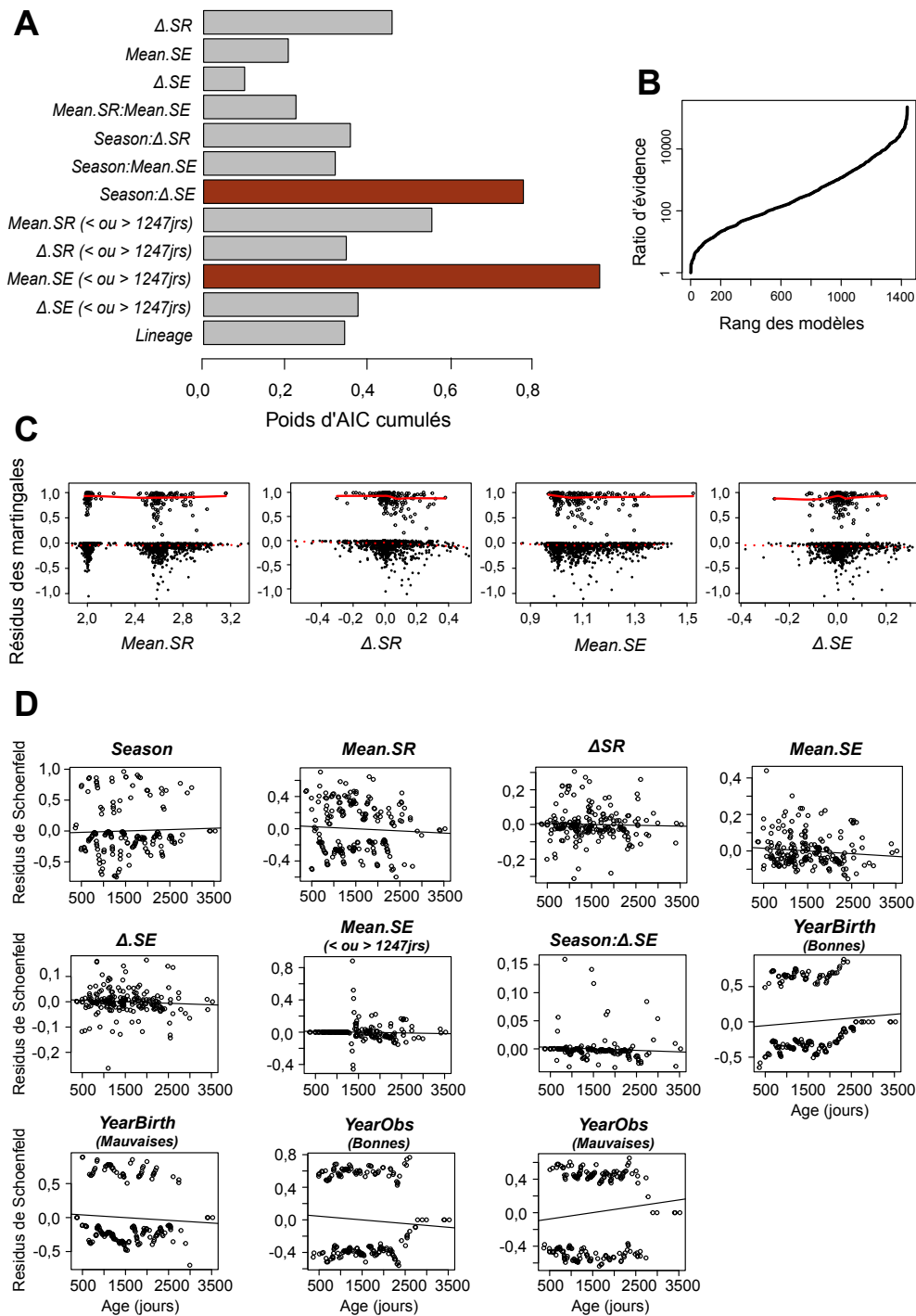


FIGURE 1.7 – Sélection des covariables et graphiques de diagnostique pour le meilleur modèle de Cox, dans le cas des femelles. (A) Poids d'AIC cumulés pour chaque variable (à l'exception de *Season*, *Mean.SR*, *Mean.SR* (< ou > 1285jrs), *YearBirth* et *YearObs* qui ont été systématiquement incluses dans les modèles car sélectionnées par les analyses précédentes), pour les 1439 modèles de Cox qui convergent. Les covariables retenues par notre meilleur modèle sont indiquées en rouge. (B) Ratios d'évidence (à l'échelle logarithmique) de tous les modèles considérés. (C) Résidus des martingales par rapport aux variables continues dans le cas du meilleur modèle de Cox. Les régressions locales ("loess smooth functions") sont tracées en rouge pour les censures (cercles pleins) et les morts naturelles (cercles vides). Les covariables sélectionnées respectent l'hypothèse de linéarité. (D) Résidus de Schoenfeld selon l'âge pour chaque covariable et interaction incluse dans le meilleur modèle de Cox. Aucune covariable du modèle sélectionné ne montre d'écart à l'hypothèse PH.

## Discussion

Contrairement à notre attendu, les individus exposés à des rythmes saisonniers accélérés déséquilibrés en faveur du temps passé en LD ont une mortalité plus faible que ceux qui passent autant de temps dans les deux saisons.

Le modèle sélectionné pour décrire la mortalité des mâles n'est clairement pas satisfaisant au vu des caractéristiques de ses résidus et des paramètres estimés. De plus, pour les deux sexes, l'amplitude des effets du déséquilibre est telle que la mortalité estimée des individus en déséquilibre saisonnier est plus faible que celle des références, ce qui est très improbable. Notre analyse statistique échoue donc à capturer de façon satisfaisante l'effet du déséquilibre saisonnier sur la mortalité. Une première raison à cela peut venir de l'inadéquation entre la question posée et la procédure statistique utilisée. En effet, les modèles de survie "time-varying" sont conçus pour étudier l'effet d'un état variant dans le temps sur la mortalité. Dans le Chapitre 1.1, nous les avons utilisés pour étudier l'effet de la vitesse des changements d'état (c.-à-d. l'accélération) sur la mortalité. Dans cette étude, nous les utilisons pour analyser à la fois l'effet de la vitesse des changements d'état, et leur irrégularité (c.-à-d. le déséquilibre). Il n'est pas du tout certain que les modèles de Cox soient capables de détecter ces effets. En revanche, à ce jour et à notre connaissance, il n'existe pas d'autres techniques statistiques pour analyser ce type d'effet. Une solution pour s'assurer que les modèles de survie "classiques" (Cox, PH, AFT) soient capables de détecter ces types d'effets serait de les tester sur des données simulées.

Une deuxième raison pour laquelle l'analyse échoue à capturer les effets du déséquilibre sur la mortalité tient au fait que nous n'avons pas d'individus vivant deux saisons par an mais en déséquilibre saisonnier. Ces individus seraient pourtant indispensables pour évaluer uniquement l'effet du déséquilibre, indépendamment de l'accélération.

Les résultats de l'analyse de Kaplan-Meier montrent cependant que les individus accélérés et en déséquilibre meurent moins que les individus accélérés en équilibre saisonnier. Ces résultats pourraient être biaisés par des effets cohortes ou périodes, ou par une structuration de notre échantillon. Pourtant, nos analyses multi-variées, bien qu'insatisfaisantes, montrent qualitativement la même tendance alors que l'on contrôle pour ces facteurs. En effet, la sélection des individus a été faite pour qu'il y ait suffisamment de morts naturelles dans les trois grands groupes d'individus (références, accélérés et en déséquilibre) pour permettre l'estimation de la mortalité par nos modèles. Nous avons également pris soin d'inclure dans nos modèles plusieurs variables d'ajustement, telles que les effets cohortes et périodes, l'hétérogénéité inter-individuelle et les effets maternels. Il semble donc que nous pouvons envisager la validité qualitative de ces résultats qui tradiraient une réalité biologique : dans la colonie captive, passer moins de temps en SD serait bénéfique pour la survie.

Ces résultats invalideraient pourtant notre hypothèse d'un effet protecteur du temps passé en SD. Nos résultats vont à l'encontre des prédictions et sont difficilement interprétables à la lumière de la littérature. Le passage en SD entraîne l'initiation de mécanismes d'économie d'énergie, et en particulier l'utilisation d'épisodes de torpeur et l'utilisation de graisses stockées, ainsi qu'une activité locomotrice limitée. Ces mécanismes permettent aux microcèbes de mieux survivre en SD qu'en LD. Diminuer la longueur du temps passé en SD signifie laisser moins de temps aux individus pour main-



tenir et réparer leur organisme. De plus, les études précédentes qui se sont intéressées aux différences entre les microcèbes de la colonie captive exposés à l'alternance de 6/6 mois LD/SD et 5/3 mois LD/SD ont mis en évidence une diminution de la longévité et l'émergence précoce de perturbations des rythmes biologiques pour les individus accélérés par rapport aux références (Perret 1997 ; Aujard *et al.* 2001 ; Cayetanot *et al.* 2005). Il faut toutefois noter que ces études ne font pas la différence entre accélération avec et sans équilibre saisonnier.

A l'inverse de l'attendu, nos résultats montrent que, dans le cas des mâles, une diminution du temps absolu passé en SD diminue la mortalité. Après 3 mois passé en SD, les mâles deviennent réfractaires à la photopériode et activent leurs fonctions reproductrices en prévision de la saison LD suivante. Diminuer le temps passé en SD jusqu'à 3 mois ne devrait donc pas empêcher les mâles d'avoir le temps nécessaire à la maintenance de leur organisme. D'après nos résultats, diminuer le temps de préparation de la période de reproduction aurait même un effet bénéfique sur leur survie.

Pour les femelles, l'effet de la longueur des SD dépend de la longueur des LD. A l'inverse des mâles, le rythme biologique des femelles est strictement synchronisé par la photopériode. Elles disposent de toute la durée des périodes de SD pour compenser les dommages causés par la forte activité métabolique liée à la période de reproduction. Or, moins elles disposent de temps en SD relativement à leur LD et moins elles meurent. Une explication possible serait que dans la population étudiée, la période de reproduction ne soit pas ou peu coûteuse en termes de stress oxydatif, comme le montre les résultats présentés dans le Chapitre 2 pour les femelles en conditions de référence. Les femelles n'auraient donc pas besoin d'une longue période de SD pour compenser les dommages liés à la saison LD précédente.

Ces résultats supposent que dans la colonie captive, il est bénéfique de ne pas passer trop de temps en SD.

Pendant, il est nécessaire de rappeler que les microcèbes étudiés sont des animaux élevés en captivité où la mortalité extrinsèque est fortement limitée. Dans ces conditions, il est possible que des coûts liés à la saison de SD émergent, non observés *in natura* à cause de cette mortalité extrinsèque. Par exemple, dans la nature les effets bénéfiques de la torpeur, sont liés à la pression de prédation, la température et la disponibilité des ressources alimentaires (Kraus *et al.* 2008 ; Vuarin & Henry 2014), autant de pressions absentes en captivité.

D'autre part, il a été montré que malgré le fait que la torpeur journalière favorise la survie et protège l'organisme contre les stress physiologiques, la transition de l'hypo- vers la normothermie s'accompagne d'un important stress oxydatif, de sorte que des organismes passant par de fréquents épisodes de torpeur au cours d'une saison subissent plus de dommages, oxydatifs en particulier, que ceux dont le taux métabolique varie moins souvent (Turbill *et al.* 2013 ; également discuté dans Giroud *et al.* 2014). Diminuer le temps passé en SD pourrait entraîner des passages en hypothermie moins fréquents et limiter le nombre de ces épisodes coûteux de retour à la normothermie.

Nous proposons ici des hypothèses pouvant expliquer, ou du moins contribuer à éclaircir les raisons de nos résultats inattendus, mais le fait que la mortalité des individus en déséquilibre diminue au point de devenir plus faible que celle des références reste inexplicable.

## Discussion du Chapitre 1

Dans ce chapitre nous avons caractérisé la mortalité par âge, sexe et saison, et les effets de l'accélération du rythme des saisons et du déséquilibre saisonnier sur la mortalité et le vieillissement du microcèbe murin en captivité. Nous mettons ici en exergue les implications les plus intéressantes de ces résultats.

Nous avons montré que l'exposition à un rythme accéléré des transitions saisonnières augmente la mortalité et accélère le vieillissement dans le cas du microcèbe murin. Ce résultat supporte une théorie du vieillissement plus large : les changements saisonniers d'état physiologique (de métabolisme, de masse ou endocrinien) ont un coût. Dans le cas des espèces saisonnières, il est probable que ce coût se traduise par une accumulation de dommages cellulaires, tissulaires ou physiologiques – ou d'ajustements physiologiques imparfaits entre fonctions incompatibles – lors de ces transitions. Cette idée semble généralisable à l'ensemble des systèmes complexes, alternant entre des états inactifs et actifs. Par exemple, les protocoles de vieillissement accéléré appliqués dans les tests industriels reposent sur le même principe : les coûts induits lors des transitions entre états sont supérieurs aux coûts induits par l'exposition à un stress constant (p. ex. haute température). Il est bien connu, notamment par les expériences de restriction calorique (Finkel & Holbrook 2000), que le fonctionnement de la machinerie cellulaire se paie en termes d'accumulation de stress oxydatif, de cellule entrant en état sénescence ou d'accumulation de mutations somatiques (López-Otín *et al.* 2013). Nous montrons en revanche que les fluctuations de niveaux de fonctionnement ont elles aussi un coût : éteindre (ralentir) ou redémarrer (accélérer) la machinerie cellulaire engendre des dommages transitoires mais intenses se répercutant sur la mortalité des individus. Nous formulons ainsi une théorie complémentaire à celles existantes du vieillissement biologique (sous le nom de *transition-based theory of ageing*). Cette théorie s'appliquerait à tout système biologique dont les niveaux d'énergie fluctuent dans le temps. Dans ce cas, l'accumulation de dommages ne serait pas continue et monotone avec l'âge mais procéderait par à-coup au rythme de ces fluctuations. Cette théorie prend son sens au regard de la grande diversité des patrons de sénescence récemment observée à travers l'arbre du vivant (Jones *et al.* 2014) : chez de nombreuses espèces, l'augmentation de la mortalité avec l'âge n'est pas linéaire mais peut passer par des phases de stagnation ou même de décroissance. Le microcèbe murin est un modèle particulièrement adéquat pour la formulation et le test de cette théorie, puisqu'il présente des états physiologiques extrêmement contrastés entre les saisons, beaucoup plus contrastés que chez nombre de vertébrés endothermes qui se soustraient aux fluctuations environnementales par une homéothermie stricte, et des ajustements comportementaux ou alimentaires. La généralité de notre théorie reste à explorer au travers de son application à d'autres modèles biologiques, présentant des dépendances physiologiques saisonnières potentiellement moindres (homéothermes stricts) ou encore plus grandes (ectothermes).

Nous montrons également que l'espérance du nombre de saisons vécues par les microcèbes demeure inchangé quel que soit le niveau d'accélération des rythmes saisonniers. Il s'agit à notre avis d'un résultat très robuste, déjà suggéré par Perret (1997). En effet, cela signifie que le nombre de saisons vécues est un meilleur indicateur de la survie des individus que leur âge. Ce résultat renforce notre théorie car il suppose que la sélection naturelle a sélectionné les mécanismes de maintenance

de l'organisme non pas pour qu'il survive un temps donné, mais pour qu'il franchisse un nombre de transitions saisonnières donné. *In natura* les deux processus (temps et nombre de saisons) sont confondus et seule notre expérience, en les désynchronisant, a permis de révéler ce phénomène.

Finalement, le dernier résultat majeur est que la mortalité des mâles augmente avec la fréquence des transitions saisonnières jusqu'à un âge limite, après lequel la mortalité devient indépendante de la photopériode. L'analyse des fluctuations de masse en fonction de l'âge et de la fréquence de transition saisonnière (Supplementary Methods 7, Chapitre 1.1) montre un déclin de l'amplitude des changements saisonniers de masse chez les mâles âgés et accélérés (également trouvé par Perret (1997) sur un nombre plus réduit d'individus). Ce déclin n'est pas observé chez les femelles qui ne présentent pas non plus d'érosion de l'effet de l'accélération sur la mortalité avec l'âge. Cela suggère que l'accélération du rythme saisonnier affecte moins la mortalité du sexe (les mâles) ayant une sensibilité amoindrie de sa physiologie aux transitions saisonnières (baisse de l'engraissement automnal au-delà de la demi-vie ; voir Supplementary Methods 7, Chapitre 1.1). Ce résultat est cohérent avec notre proposition théorique, les transitions devenant moins coûteuses si l'écart entre états saisonniers diminue. Nous pensons que ce résultat possède un grand potentiel explicatif des patrons de mortalité observés aux grands âges (non discuté dans le Chapitre 1.1). Il suggère en effet un «épuisement physiologique» de la mortalité avec l'âge dans le cas où l'augmentation de la mortalité est la réponse au déclin physiologique. Or, chez de nombreuses espèces, l'augmentation de la mortalité des populations ralentit aux grands âges pour se stabiliser et atteindre un plateau (Jones *et al.* 2014). L'émergence de ces plateaux est en général attribuée à l'hétérogénéité inter-individuelle au sein d'une population : les individus les plus fragiles meurent plus tôt que les plus robustes. Cela entraîne une sur-représentation d'individus robustes dans les classes d'âge les plus élevées. Au niveau populationnel, les métriques agrégées de mesure de la mortalité (c.-à-d. « mortality hazard » ou coefficients de mortalité) peuvent ainsi se stabiliser, voire décroître, avec l'âge (Vaupel *et al.* 1998). Si l'hypothèse d'« épuisement physiologique » se vérifie, les plateaux de mortalité pourraient plutôt être dus aux propriétés intrinsèques des individus. La diminution de la mortalité avec l'âge serait le résultat du déclin des performances physiologiques. Une fois les fonctions physiologiques épuisées, les individus survivraient à un taux constant.

## Conclusion

Nous avons mis en évidence le rôle majeur des transitions physiologiques, telles que les transitions saisonnières, dans l'évolution des patrons de sénescence. Nous pensons que nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes dans de nombreux champs disciplinaires : (1) en physiologie, biologie évolutive et démographie évolutive car nos résultats éclairent d'une lumière nouvelle le rôle joué par les transitions physiologiques et métaboliques dans les processus du vieillissement et dans l'évolution de la sénescence ; (2) en écologie et en biologie de la conservation car nos résultats questionnent les relations mécaniques entre fluctuations environnementales et dynamiques des populations, tout particulièrement dans un contexte de dérégulation saisonnière résultant du réchauffement climatique ; et (3) en biologie humaine, parce que nos résultats ont pour modèle animal un primate non-humain,

mais aussi car ils interrogent sur les liens entre dérèglements métaboliques (p. ex. chronobiologiques dus au travail posté) et sénescence.

# Chapitre 2

## Reproduction et mortalité

### Objectif et résumé

Le premier chapitre a mis en évidence une relation étroite entre rythme biologique (saisonnalité) et mortalité. La reproduction est un événement majeur dans un cycle saisonnier. De plus, le compromis entre reproduction et survie est probablement le compromis entre traits d'histoire de vie le plus étudié, voire le plus générique (voir Introduction). L'objectif de ce second chapitre est donc de tester l'existence de compromis entre la reproduction et la mortalité chez le microcèbe murin en captivité.

Ce second chapitre étudie l'impact de la reproduction sur la mortalité par deux approches complémentaires : (i) l'étude du suivi démographique de femelles microcèbes s'étant reproduites au moins une fois au cours de leur vie ; et (ii) la comparaison de marqueurs de vieillissement biologique de femelles microcèbes ayant eu la possibilité de se reproduire ou non au cours d'une saison de reproduction via une approche expérimentale.

(i) Effet de la reproduction sur la mortalité et le vieillissement.

La théorie des histoires de vie prédit que, dans le milieu naturel où les ressources sont supposément limitées, l'allocation à la reproduction se fait au détriment d'autres traits tels que la protection de l'organisme, et donc la longévité. En effet, chez de nombreuses espèces, se reproduire souvent ou produire beaucoup de descendants simultanément compromet la longévité future. Cependant, certaines études suggèrent que le coût de la reproduction serait allégé, voire absent, lorsque les ressources sont non limitantes (comme c'est le cas en général en conditions de captivité). En effet, pour les femelles microcèbes en captivité, nous n'avons pas détecté d'effet négatif de la reproduction sur la mortalité future de ces femelles. Au contraire, la reproduction montre un effet protecteur, les femelles s'étant reproduites plus d'une fois au cours de leur vie montrant une mortalité diminuée par deux par rapport aux femelles qui ne se sont reproduites qu'une fois. Ce résultat soutient l'hypothèse qu'il n'y a pas de coût intrinsèque de la reproduction femelle pour l'organisme, mais que ce coût biologique (s'il existe) est induit par la limitation des ressources. Il resterait toutefois à écarter l'hypothèse que l'absence de coût de la reproduction en captivité ne soit en fait dû à l'absence de mortalité extrinsèque. Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation.

(ii) Effet d'un événement de reproduction sur la longueur des télomères.

Chez plusieurs espèces, la reproduction est associée à une activité métabolique élevée, responsable de dommages cellulaires (largement attribués à la surproduction de radicaux libres par l'activité métabolique, générant un stress oxydatif). L'érosion des télomères (partie distale des chromosomes) est un marqueur intégratif du stress oxydatif effectif, et de ses conséquences ultimes puisque l'érosion des télomères est associée à une longévité diminuée dans un nombre croissant d'études. Les résultats issus de l'analyse des histoires de vie suggèrent que, pour les femelles microcèbes en captivité, la reproduction n'est pas coûteuse, et est même protectrice puisqu'elle diminue la mortalité future. Nous avons cherché à caractériser les mécanismes physiologiques expliquant cette absence de coût de la reproduction. Pour cela, nous avons mesuré la longueur des télomères de cellules sanguines nucléées de femelles microcèbes à différents moments de la saison de reproduction, pour des femelles ayant l'opportunité de se reproduire (N=7) et d'autres non (N=6). La faible répétabilité des mesures de longueur relative de télomères ne nous a pas permis de détecter de différences de dynamique des longueurs de télomères entre les deux groupes de femelles. Cependant, nous avons observé une élongation des télomères sur l'ensemble des femelles (reproductrices ou non) entre leur entrée en saison de reproduction et la période de sevrage des juvéniles, c'est-à-dire la fin de l'effort reproducteur femelle. Ce résultat obtenu de manière expérimentale, sur des échelles de temps (une saison de reproduction) et par une méthode très différente (marqueur biologique) conforte le fait que la reproduction femelle ne semble pas avoir de coût chez notre modèle en condition de captivité.

## 2.1 Absence de coût de la reproduction en captivité

Ce chapitre fait l'objet d'un article en préparation :

### **Reproducing with no limit : female reproduction bears no survival cost in a small primate under captivity**

Julie LANDES<sup>1,2</sup>, Pierre-Yves HENRY<sup>2</sup>, Isabelle HARDY<sup>2</sup>, Martine PERRET<sup>2</sup>, Samuel PAVARD<sup>1</sup>

1- Eco-Anthropologie et Ethnobiologie, UMR 7206 CNRS, MNHN, Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75005 Paris, France ; 2- Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Sorbonne Universités, CNRS, MNHN, 91800 Brunoy, France

### **Introduction**

Life-history theory aims at understanding the evolution of species' life cycles. It postulates that trade-offs between life-history traits occur, resulting in negative covariance between fitness components (Cole 1954 ; Stearns 1989). The most prominent trade-off is the cost of reproduction (Reznick 1985 ; Williams 1957). Investment in current reproduction bears a cost either in terms of future reproduction or chances of survival. This trade-off has been extensively measured in natura and through experimental manipulation in a large variety of species (review in plants in Obeso 2002 and in natural population of vertebrates in Lemaître *et al.* 2015). It is a keystone mechanism in the theory explaining the diversity of life-history strategies between species (Charnov 2002), population dynamics in finite environment (e.g. Proaktor *et al.* 2008), population variation in reproductive success due to individuals' quality (e.g. Hamel *et al.* 2009 ; van Noordwijk & de Jong 1986), and is at the core of two of the main theories of the evolution of aging (Lemaître *et al.* 2015) : the antagonistic pleiotropy theory (Williams 1957) and the disposable soma theory (Kirkwood 1977).

Life history trade-offs have been usefully categorized according to their underlying mechanisms (Stearns 1989). First, genetic trade-offs are covariances between traits that arise from population genetic diversity. They have mainly been explored through the analyze of demographic responses of crossbred or genetically altered organisms (e.g. Luckinbill *et al.* 1984), or thanks to quantitative genetic analyses of field work data (e.g. Charmantier *et al.* 2006). Quantitative genetics aims at disentangling environmental and genetic components of life history trade-offs, which are ultimately embodied within the genetic variance-covariance matrix between traits. Estimating these genetic trade-offs are crucial to understand responses to selection on standing genetic variation, and therefore to predict a species' future adaptive response to environmental changes. It is however increasingly recognized that observed polymorphism leading to genetic covariance in demographic traits has a limited value for understanding past constraints on life-history evolution (Conner 2012).

Second, allocation trade-offs (also called physiological trade-offs) are rooted within an organism biology (with potentially no genetic variance and a heritability equaled to one). This idea is often framed as follow. An organism has a limited amount of internal resources and it must face the choice of investing these resources within different organismal functions throughout its life. Regarding the cost of reproduction, these differential investments between current reproduction and body's maintenance translate into negative covariance between reproduction components (e.g. recruitment, age at reproduction or litter size) and later survival and/or reproduction. In this case, environmental conditions set the amount of resources that can be acquired and subsequently allocated among competing traits. This acquisition-allocation setting (also called the Y model; van Noordwijk & de Jong 1986) has proved fundamental for detecting trade-offs when individuals are heterogeneous in their acquisition performance (e.g. King *et al.* 2011). Once this individual heterogeneity is appropriately controlled for, the cost of reproduction has been detected in many vertebrate species (Lemaître *et al.* 2015). These negative covariances between demographic traits have been the fuel of life-history optimality modeling for several decades now, and have greatly contributed to our understanding of the life-cycle diversity across the tree of life.

However there is still little understanding on the extent to which magnitude of this trade-off depends on the level of available resources. Is allocating strategy crucial when resources are scarce and relaxed when resources are abundant? In natura, long-lived species are seemingly more buffered against environmental fluctuations and seem more prone to escape trade-offs (Aubry *et al.* 2010). Furthermore, dietary restriction experiments analyzing influence on survival and reproduction of reduced nutriment availability show contrasted results, especially when insulin/IGF signaling (IIS) pathway is altered (reviewed in Partridge *et al.* 2005). At similar level of resources consumption, crickets can be crossbred towards different allocating strategies between fecundity and dispersal demonstrating the fundamental role of internal pathway in allocating nutrients flows towards specific physiological functions (Zera 2005). Finally it is still unclear whether the cost of reproduction relies only on acquisition *versus* allocation strategies or whether biological constraints impose trade-offs due to the functioning of the biochemical circuitry. Reproduction itself may be the source of internal somatic damages for example in compromising immune functions (Barnes & Partridge 2003; Harshman & Zera 2007).

We argue here that demographic analyze of the cost of reproduction in captive species (in zoo or laboratory) have an enormous potential for understanding the role played by internal allocation strategies and biological constraints in mediating trade-offs. Although captive data should always be taken with caution (Mason 2010), comparative studies between captive and free-ranging population have proved themselves fundamental in disentangling extrinsic and intrinsic factors responsible for senescence patterns and understanding the proximal causes of increase mortality with age. These studies have for example demonstrated that intrinsic age-related death, even in the wild, are more likely caused by intrinsic failure than by larger vulnerability to extrinsic causes of mortality (Ricklefs 2008). Furthermore, recent evidences show that senescent rates differ between captive and free-ranging populations of ungulates and that such difference is more pronounced for species relying exclusively in grass diet (Lemaitre *et al.* 2013). This type of approach has been little used so far to address the



specific case of the cost of reproduction.

Published results are however intriguing and challenge the universality of reproduction-survival trade-off. Using data of 18 species of mammals and 12 species of bird (Ricklefs & Cadena 2007) analyzed the relationship between age at first reproduction or number of offspring on age at death. No trade-off was neither detected in laboratory mice (Tarin *et al.* 2014), nor in Rottweiler pet dogs (Kengeri *et al.* 2013). If proved true, this would imply that the allocation trade-off fades when resources are abundant enough, and argues for low biological constraints on reproduction in the studied captive species. The cost of reproduction detected in the wild would be mainly the result of acquisition-allocation constraints.

Here we investigate the cost of reproduction in the case of a captive colony of grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*), a small Strepsirhine primate endemic to Madagascar. More precisely, the available data includes 15 years of females' monitoring. Food and water were provided *ad libitum* all year long such that environmental resources level can be considered as non-limiting. Animals were kept in monosexual groups of one to five individuals per cage such that competition was maintained at low level. Infection level was low and treated if any. Wounded and unhealthy individuals were systematically isolated and received veterinary care. Reproductive opportunity was under the control of colony manager. In this context, pressures on reproductive-survival trade-offs can be considered as extensively relaxed. We first analyzed the short- and long-term effects of breeding success on survival throughout the females' life. Second, we investigated whether difference in maternal investments into successful reproduction (i.e. litter size, litter sex-ratio, juvenile deaths) translates into differential of survival prospect.

## Data

### Colony description

Our data consists in the long-term monitoring of a captive colony of grey mouse lemurs (at Brunoy, France ; see Languille *et al.* 2012 or Landes *et al.* Submitted for a detailed description). It includes females born between 1996 and 2011. Environmental conditions were kept constant (temperature, humidity, food and water provided *ad libitum*). Only the photoperiod was allowed to vary to mimic natural seasonal photoperiodic changes in Madagascar. Indeed, biological seasonal cycles of mouse lemurs are synchronized to the seasonal photoperiodic changes. An alternation of 6-months periods of long days (LD periods ; 14h of light per day) and 6-months periods of short days (SD periods ; 10h of light per day) reproduces the alternation of wet and dry seasons respectively. The wet seasons and LD periods in captivity correspond to the period of reproduction. The dry season and the SD periods are periods of inactivity and body maintenance and repair. The alternation of LD and SD seasons trigger the physiological and behavioral seasonal changes observed *in natura*.

## Data setting

Our dataset was constituted of 251 females that had the opportunity to reproduce at least once during the recorded period. These data are a subsample of the “reference females” mortality data analyzed by Landes *et al.* (Submitted). Their mortality with age is Gompertz-shaped and fluctuates between high mortality during LD seasons and low mortality during SD seasons (Languille *et al.* 2012 ; Landes *et al.* Submitted submitted). A time-varying model is therefore required to accurately model their mortality patterns (Klein & Moeschberger 2003), where individuals are left-truncated at the entrance in a new season and, if not dead or censored within the season, is right-censored at the end of the season (as in Landes *et al.* Submitted). The females included into our study lived a total of 1802 seasons. During the last season lived by individuals, 91 natural deaths are recorded (animals found dead or euthanized because dying), 23 individuals are censored at death because death resulted from accidents or an experimental procedure, 28 are censored at the date of transfer to another laboratory or colony, and 109 are censored at the date at which the time series for the present study was stopped (January 1<sup>st</sup>, 2013).

Because we focus exclusively on survival pattern after first breeding opportunity, all seasons prior to the first opportunity to breed are excluded. Since the earliest first opportunity to breed was during the first long-day season of their life (hereafter denoted LD1, at an age of  $9.46 \pm 0.52$  months), all individuals recruited for the analysis have survived until the beginning of their second short day season (SD2). Overall the 251 females had a total of 379 breeding opportunities that led to 249 breeding successes (defined as a gestation followed by the birth of at least one offspring alive at birth) and 130 breeding failures (see Table 2.1). Breeding failure includes unsuccessful fecundations or early abortion, and one case where all offspring were stillbirths. Reproduction events happen during one of the six first reproductive seasons (Figure 2.1), but 90% (341) of breeding opportunities occur before age 3.5 years-old (i.e. the females’ life expectancies ; Landes *et al.* Submitted).

TABLE 2.1 – Sample sizes for each possible reproductive history, combining reproductive successes and failures, over the total number of reproductive opportunities (number of individual.seasons) and over individuals’ lifetime (number of individuals).

		# of reproductive failures			Total # of reproductive successes	
		0	1	2+		
# of reproductive successes	0	Individual.seasons	129	62	191	
		Individuals	34	21	55	
	1	Individual.seasons	608	85	19	716
		Individuals	123	22	7	152
	2+	Individual.seasons	150	22	7	179
		Individuals	34	7	3	44
Total # of reproductive failures	Individual.seasons	762	236	88	1082	
	Individuals	157	63	31	251	

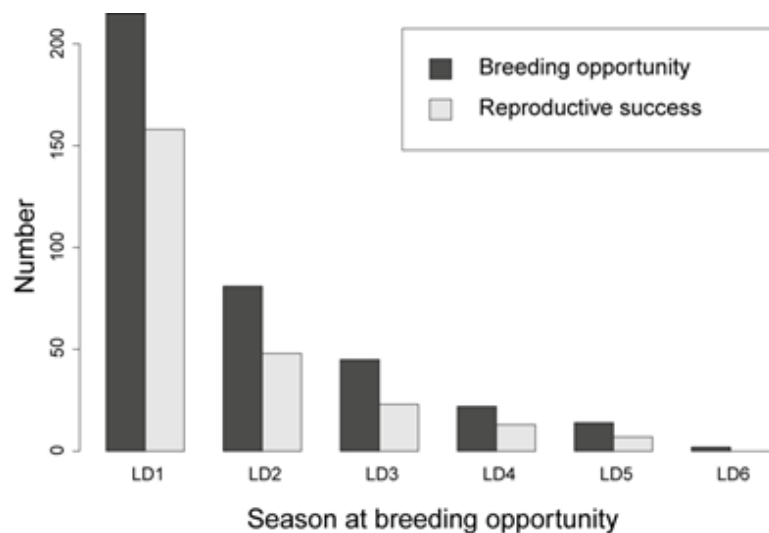


FIGURE 2.1 – Number of breeding opportunities and of reproductive successes per breeding (long-day) season (ranging from one to six breeding seasons experienced over a lifetime).

### Determinants of breeding opportunity

Controlling for heterogeneity in individuals' quality, whether this later is fixed (i.e. at entrance into the analysis) or dynamic (i.e. changing throughout the follow-up period) is key for unbiased estimation of the cost of reproduction (see above and van Noordwijk & de Jong 1986). Any factors influencing both animal quality and breeding opportunity may bias results ; for example if it makes individuals of better quality more prone to reproduce.

In the case of population, breeding opportunity is determined by colony manager with the aim of keeping the colony size around 400 individuals. As a consequence, the mean number of breeding opportunities per females is 1.5 (SD=0.77) while the mean number of LD seasons lived is 2.44 (SD=1.45) ; which is below the one (to two) breeding opportunity per lived LD season expected in nature (Lahann *et al.* 2006 ; Kraus *et al.* 2008). Moreover, females are not chosen randomly for reproduction, females having to satisfy to a set of criteria, with the aim to minimize genetic drift, unwanted selection, and diversity impoverishment of the colony. First, the colony manager provides the opportunity to breed to a maximum number of first-year (i.e., primiparous) females (86% of females in LD1 are included in inter-sexual group when in estrus ; against 12% in LD2 and only 2% later ; Figure 2.2.A). Second, all females are given the opportunity to reproduce at least once. Over all the years, females that succeeded to their first reproduction opportunity (N = 182) had a reduced chance to be offered another opportunity to breed (32%) relative to unsuccessful females (N = 69 ; 50%). Additionally, females that failed their first reproductive opportunity had a lower rate of reproductive success during their second reproductive opportunity (respectively, 34% and 64%, pprop.test=0.002). This explains why second reproductive event is less successful than the first one in Figure 2.2.B.

Colony manager was also taking into account body mass at entrance in LD seasons in the selection of breeding females (Figure 2.3.A). Mass is lower in LD1 because yearling fatten less during their first short-day season. At LD1, females having the opportunity to breed are on average heavier ( $83 \pm 13g$ ) than those who have not ( $76 \pm 9g$  ;  $p_{Wilcoxon}=0.002$  ; see Figure 2.3.B). Females are fully grown after LD1. An opposite managerial strategy is then implemented : heavier females have less

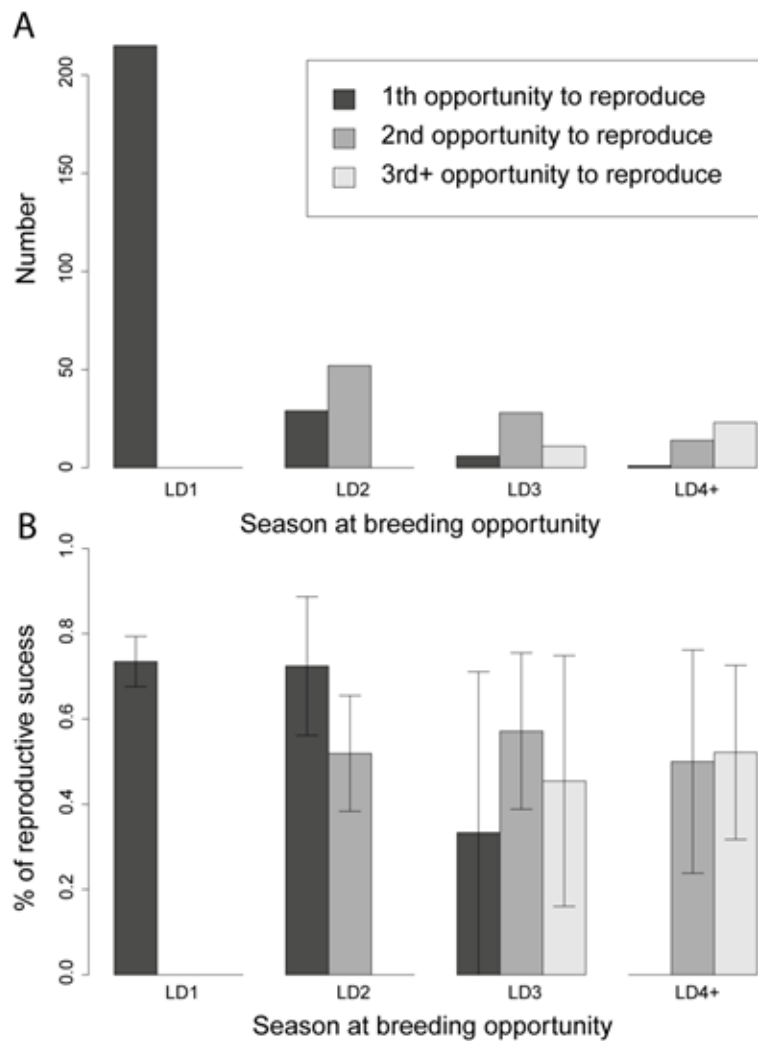


FIGURE 2.2 – (A) Number of breeding opportunities and (B) reproductive success (proportion of breeding opportunities) according to the number of past breeding opportunities, per breeding season.

breeding opportunities than lighter females (respectively  $105 \pm 20\text{g}$  and  $94 \pm 20\text{g}$  for females who had not and had the opportunity to breed ;  $p_{\text{Wilcoxon}} = 2.279e^{-10}$  ; Figure 2.3.C). As for reproductive success, no effect of mass is found on the probability to successfully reproduce, whether it is in LD1 (mean mass of females failing or succeeding reproduction being respectively  $84 \pm 14\text{g}$  and  $83 \pm 13\text{g}$ ) or in later seasons (respectively  $94 \pm 20\text{g}$  and  $95 \pm 21\text{g}$ ).

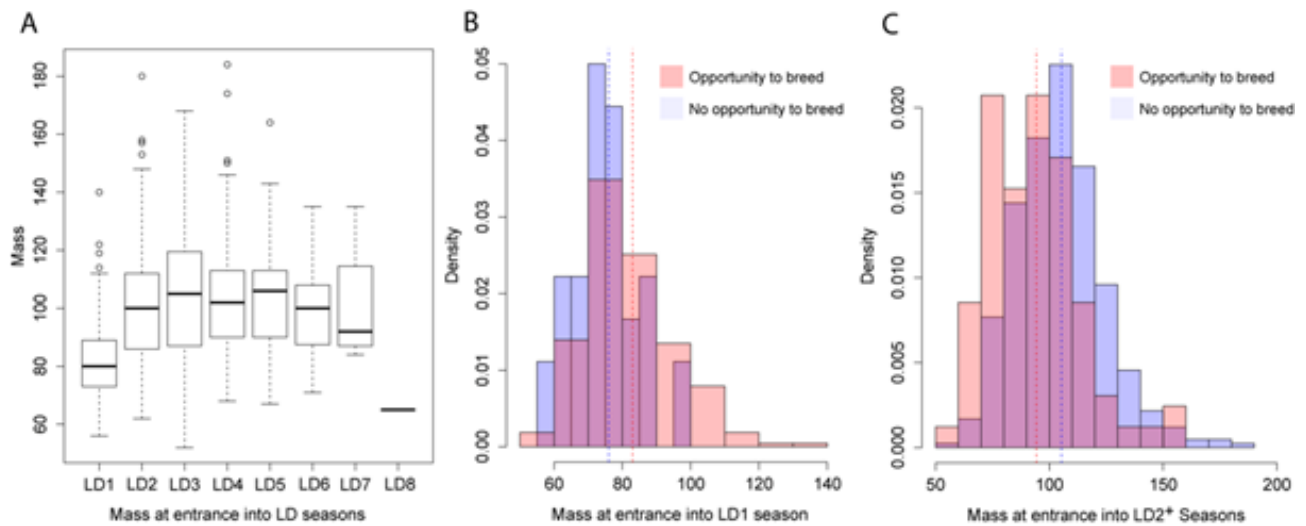


FIGURE 2.3 – (A) Distribution of females’ masses at the entrance into each LD seasons. (B and C) Distribution of mass, respectively at the entrance into the first and later seasons, for females who had (in red) or not (in blue) the opportunity to breed. Vertical dotted lines correspond to the mean for each breeding status.

## Methods

Our study is structured in two parts. First, we aim at analyzing the effect of breeding success or failure on females’ survival for all the individuals that had the opportunity to breed at least once. Second, in the case of successful reproduction (so for females that reproduced at least once), we aim at analyzing to what extent the level of investment within reproductive events may compromise later maternal survival.

## Covariates

Season (SD or LD season ; denoted *Season*) is a time-varying variable defined at the entrance of each individual into a new season. Cumulative number of breeding successes (*CRS*) and failures (*CRF*) are also time-varying variables. Obviously, the number of breeding successes decreases when the number of failures increases, and both covariates are negatively correlated ( $-0.54$ ,  $p \leq 2.2 \times 10^{-16}$ ). Because numerous studies demonstrate that the age at first successful reproduction is a major determinant of future reproductive success and survival (Aubry *et al.* 2010 ; Lemaître *et al.* 2015), season at first reproduction (*FirstRepro*) is also entered into the analysis. As discussed above, failure at first reproduction (*Failure1st*, 0/1 with 1 being failure) influences future breeding opportunity and may be as well an indicator of individual quality. Because mass at entrance in the LD season influences breeding opportunity, mass at last breeding opportunity (*massLBO*) were entered to control for the influence of individual’s quality on breeding opportunity. Although no effect of mass were found on breeding success (see above) mass at last reproductive success (*massLRS*) may anyhow reflect maternal health at last reproductive event and influence further survival.

Unobserved heterogeneity in individuals’ quality may potentially bias survival analysis (Vaupel & Yashin 1985 ; Plard *et al.* 2015) because the frailest individuals exhibit a higher risk of dying early than robust ones. It may be especially crucial in estimating cost of reproduction when individuals’ quality

may be positively correlated to both reproductive and survival capacities (van Noordwijk & de Jong 1986). Hidden heterogeneity arising from unobserved genetic or environmental component can be captured by optimizing a gamma-distribution of frailty values in survival analysis (i.e. by entering individuals' identity as random variable, hereafter called *Frailty*). Heterogeneity may also arise from shared genetic and epigenetic characters transmitted from mothers to their offspring and resulting in so-called maternal effects. To capture this, the identity of the mother, which clusters siblings, is also entered as a random gamma-shaped covariate into the survival analysis (*MatId*).

In summary, variance in individuals' quality through life, also called dynamic heterogeneity, is controlled using observed measures as their number of breeding failure (*CRF*, *Failure1st*); their age at first successful reproduction (*FirstRepro*), and a proxy of individuals' health at breeding opportunity (*MassLBO*) and reproductive success (*MassLRS*). Unobserved individuals' heterogeneity is controlled at two levels : gamma-shaped heterogeneity among individuals and siblings.

Accounting for year of birth (i.e. cohort effect) or when an individual lived (i.e. period effect) proved important to adjust for uncontrolled temporal variations in survival in the studied population (Landes *et al.* Submitted). To control for these, we first analyzed the effect of year at observation (i.e. the year at which a given season is starting as a time-varying covariate ; d.f.=15) and year at birth (i.e. the year at which a given individual is born ; d.f.=14) on individual survival (using Cox survival analysis ; see below). We then used the models' estimates to cluster these years (using 'cluster' function of the 'pam' package in 'R' ; Maechler *et al.* 2015). We found that, for both variable, 2 groups explained changes in survival in the most parsimonious fashion. For year at observation the variable *YearObs* clusters years 1997, 2003, 2006 to 2012 in group 1 with higher survival and years 2000, 2002, 2004 and 2005 in group 2 with lower survival. For year at birth the variable *YearBirth* clusters years 1998, 2002, 2005 to 2010 in group 1 with higher survival and years 1996, 2000, 2001, 2003, 2004 and 2011 in group 2 with lower survival.

Investment into a given reproductive event is given by the litter size (*Litter* ; Figure 2.4). A common phenomenon in captive mouse lemurs is the birth of very frail individuals (easily recognizable by colony manager). Mother does not breastfeed these individuals and they generally die within their first week. The probability of having at least one frail offspring per litter is around 15% and does not depend on litter size ( $p_{prop.test} > 0.05$  when comparing litters of 1, 2 and 3 offspring) Apart from this phenomenon, juvenile mortality is low within the 40 days of maternal care. An alternative variable describing realized litter size (*RLitter* ; Figure 2.4) does not account for these offspring and is therefore adjusted for realized investment in post-natal care. Because females invest more time and energy in males than in females offspring (Perret & Colas 1997), level of investment may also vary with the sex ratio of the realized litter (*SexRatio*). A cumulative version of litter size and realized litter size (respectively *cumLitter* and, *cumRLitter* ; incremented at each new reproduction) and sex ratio calculated over all offspring produced (*cumSexRatio*), were also tested to account for potential cumulative costs of reproduction.

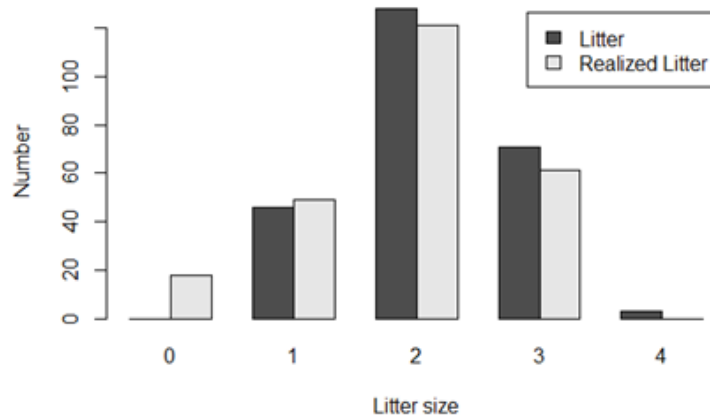


FIGURE 2.4 – Distribution of litter size at birth (*Litter*) and realized litter size, i.e. offspring surviving the first week after birth (*RLitter*).

### Survival analyses

Mortality following a breeding opportunity (for effect of breeding failure or success), or a reproductive success (for effect of investment in reproductive events), was analyzed using semi-parametric proportional models (also called Cox's model; Klein & Moeschberger 2003) using the 'cph' function in the 'rms' library of 'R' (Harrell 2015). Cox analyses are flexible models that do not constrain the distribution of the baseline hazard. The drawback of this method is that a Cox's model assumes that the effect of a covariate is proportional to the baseline mortality level at all ages (i.e. proportional hazard model). The hazard function is modeled as  $h(t|x) = h_0(t).e^{\beta x}$ , with  $h_0(t)$  the mortality hazard baseline of unspecified distribution,  $t$  the time at death or censoring and  $\beta$  the parameter quantifying the association between covariate  $x$  and time at death. Proportionality assumption ( $p > 0.05$ ) was checked using the 'cox.zph' procedure of 'survival' package from 'R' software (Therneau 2015). Departure from proportionality was also relaxed by incorporating interactions between the variables of interest and the individuals' age  $x(n)$  at entrance into the season  $n$  (Martinussen & Scheike 2006).

More precisely, Cox's models were fitted over four periods of life to distinguish between potential short- and long-term effects of reproduction : over the whole individual's life, during the season of breeding opportunity or reproduction ; within the 4 seasons following a given breeding opportunity or success, and only at oldest ages among individuals that survived until the mean life expectancy (3.5 years; Landes *et al.* Submitted).

The effects of reproductive success and failure on mortality were investigated using all females that had the opportunity to breed at least once. All the 10367 possible models combining the effects of the following covariates were considered : *CRS*, *CRF*, *FirstRepro*, *Failure1st*, *MassLBO*, *MassLRS*, *Season*, *YearObs*, *YearBirth*, the interactions *CRS\*Season* and *CRF\*Season* and one of the two unobserved heterogeneity components *Frailty* or *MatId* (models incorporating both did not converge). Model selection was based on AIC criterion. First cumulative AIC weights were calculated for each covariate (i.e. the sum of the AIC weight  $w_i$  of all models incorporating this covariate; Burnham &

Anderson 1998) to identify the covariates which are overrepresented within the high-ranked models. Second these variables were compared to those appearing into the models with the highest statistical support ( $\Delta AIC < 2$ ). Information criterion is informative but not compelling for comparing models incorporating random variables due to lack of robust quantification of their appropriate penalty (Jiang *et al.* 2008). Selected models that did not incorporate *Frailty* and *MatId* were therefore *a posteriori* tested with each of these covariates to identify potential changes of the magnitude or significance of the potential effects. Once the selected model identified, analysis of the residuals allowed us to control the goodness of the fit of the model to the data. The distribution of the Schoenfeld residuals over age allows detecting eventual deviation from the PH hypothesis for each covariate. The distribution of the martingale residuals plotted against the values of the continuous covariates check for their linearity.

The effects of investment in one reproductive event were investigated on the 194 females that succeed at least one reproduction. In this case only 8 models were tested incorporating one of the four alternative covariates *Litter*, *RLitter*, *cumLitter*, *cumRLitter* in interaction or not with *SexRatio* and *cumSexRatio*. Tested models incorporate also the adjustment variable retained at the previous analysis.

## Results

### Effect of breeding failure and success on females' survival

Effects of reproductive failure and success on mortality are qualitatively and quantitatively similar on all the periods studied : all over the life, within the season of breeding opportunity, with the four seasons following a breeding opportunity and at old ages. We hereafter present only results for the whole females' life following their first breeding opportunity.

Three covariates are clearly overrepresented within the tested models with lowest AIC (Figure 2.5) : *CRS*, *Season*, and *YearBirth*. Clearly, reproductive success does not compromise females' survival. Rather, the number of reproductive successes linearly decreases further mortality, each novel reproduction decreasing mortality by about a factor of two ( $RR=0.57$ ,  $p < 0.001$  see model 1, Table 2.2 ; and holding the fact that 97% of females have a maximum number of reproductive successes overall their life lower or equaled to two, see Table 2.1). Incorporating female's mass at last reproductive success increases this effect ( $RR=0.45$  ; models 4, 9, and 11 in Table 2.2).

These three variables are incorporated within the 13 selected models (with  $\Delta AIC < 1$  ; see Table 2.2). Comparing the 100 best models, *Season* is in 86%, *CRS* in 90% and *YearBirth* in 96% of them (the 100<sup>th</sup> model receiving 8 times less statistical support than the first one, and most additional covariates being not significant).



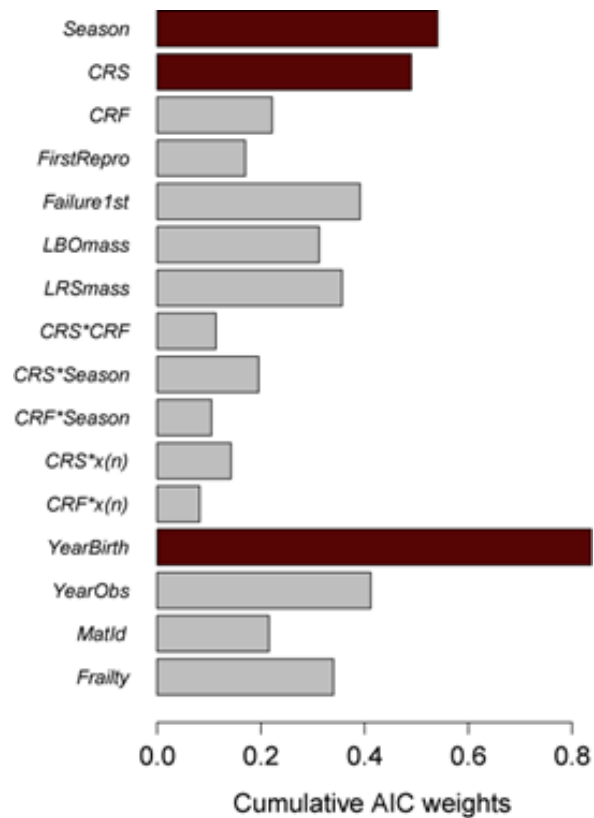


FIGURE 2.5 – Covariate cumulative AIC weights over the 10367 Cox models tested.

The *CRS* effect is robust (same direction, same magnitude, same significance) to the addition of the effects of *Frailty* (Table 2.2, model 2), *MatId* (model 5), and a potential dependency on the season (*CRS\*Season*, Table 2.2 model 12). If we replace the effect of past successful reproduction (*CRS*) by the effect of failing during the 1<sup>st</sup> reproductive opportunity (*Failure1st*; model 18,  $\Delta AIC=2.27$ ), *Failure1st* has a significant deleterious effect ( $-0.65$ ,  $p=0.008$ , reference being successful reproduction). If we replace *CRS* by the number of breeding failure (*CRF*, model 83,  $\Delta AIC=3.97$ ), number of failures significantly increases females mortality ( $RR=1.46$ ,  $p=0.03$ ).

Analysis of the martingale residuals of model 1 shows no departure of the *CRS* variable from linearity and Schoenfeld residuals' distribution validates the proportionality assumption. This protective effect of successful reproduction (even when controlled for number of failures or failing first reproduction), as well as the trend for increased mortality when the first reproductive opportunity fails, is confirmed when entering *CRS:CRF* as categorical variables with three classes (0,1,2+) with reference *CRS*=1 and *CRF*=0 ( $\Delta AIC=15$ , see Table 2.3). Successfully reproducing more than once decreases mortality independently of the number of past failures. Accumulating failures while never succeeding a reproduction tends to increase mortality, although the trend is not significant.

TABLE 2.2 – Results of the 13 better Cox models ( $\Delta AIC < 2$ ) fitted over the seasons following a breeding opportunity and throughout females' life. Concerning model 1 the effect of CRS is verified with a similar magnitude within the four seasons following an opportunity to reproduce ( $-0.53$ ,  $p=0.01$ ) and is still significant at old ages ( $-0.59$ ,  $p=0.004$ ). (\*\*) for  $p < 0.001$ , (\*) for  $p > 0.05$  and (†) for  $p < 0.1$ . Reference for *Season* is 'LD'.

NDegres model	CRS	CRF	Failure1st	LBOMass	LRSmass	Season	CRS*Season	YearBirth	YearObs	MatId	Frailty	Proportional	AIC	AAIC
1	-0.56**					-1.03*	0.62*					yes	638.35	0.00
2	-0.59**					-1.01*	0.68*			$-3 \times 10^{-3}$ ns		yes	638.70	0.36
3	-0.55*					-1.01†	0.69*		0.57 ns			yes	639.02	0.68
4	-0.81**				0.005 ns	-1.01*	0.68*					yes	639.38	1.03
5	-0.56**					-1.03*	0.67*			$-4 \times 10^{-4}$ ns		yes	639.73	1.39
6	-0.57**					-1.00†	0.73**			$-3 \times 10^{-4}$ ns		yes	639.78	1.43
7	-0.60**			$-6.5 \times 10^{-3}$ ns		-1.02*	0.70*			$-4 \times 10^{-4}$ ns		yes	639.81	1.46
8	-0.56**			$-4.9 \times 10^{-3}$ ns		-1.04*	0.62*					yes	639.83	1.49
9	-0.79*				0.004 ns	-1.00†	0.72**			$-3 \times 10^{-4}$ ns		yes	640.05	1.70
10	-0.46†					-1.03*	0.60*					yes	640.12	1.78
11	-0.78*				0.004 ns	-1.00†	0.73**		0.51 ns			yes	640.20	1.86
12	-0.59**					-1.12†	0.62*					yes	640.29	1.95
13	-0.56*					-1.03*	0.62*					yes	640.35	2.00

TABLE 2.3 – Relative risk of death in seasons following a breeding opportunity when the cumulative number of breeding successes (*CRS*) and failures (*CRF*) are entered as factorial variables (0,1,2+) into the Cox model together with *Season* and *YearBirth*. Last column and line stand for respectively *CRF* and *CRS* entered alone into the model. Framed results stand for all possible categories of number of successes and failures (i.e. *CRS :CRF*). Adding *Frailty* or *MatId* does not improve the AIC. (\*) for  $p < 0.05$  and (†) for  $p < 0.1$ . "REF" indicates the reference for the model.

		‡ of reproductive failures			
		0	1	2+	
‡ of reproductive successes	0		1.37†	1.85	1.59†
	1	REF	1.08	0.81	REF
	2+	0.53*	0.64†	0.50	0.55*
		REF	1.07	1.07	

### Effect of investment in reproductive events on females' survival

No effect of litter size (at birth or accounting only for survivor offspring after one week, cumulative or not) and sex ratio were found; whether on the whole females' life following a successful reproductive event, within the fourth seasons following this event or at old ages. Absence of results holds when controlling for *Frailty*, *MatId*, *CRS*, *CRF*, *Failure1st* or *MassLBO*. When analyzing females' mortality over the reproductive period, *Litter* has no effect while *RLitter* was found decreasing females' mortality (RR=0.2,  $p=0.047$ ). Transforming *RLitter* as a factorial variable (0/1+) shows similar results demonstrating that this effect comes from 18 births where all produced offspring were of poor quality and died early, likely because females were unhealthy during gestation.

### Discussion

We analyzed potential cost of breeding success and failure on subsequent mortality in females. We also looked for negative covariance between females' investment in reproductive events and survival prospect. Both studies show negative results. Rather, we found that experiencing more than one reproductive success decreases females' mortality by half overall her life, including at old ages.

One may wonder if these results may arise from uncontrolled individual heterogeneity which has been proved crucial in identifying the costs of reproduction (van Noordwijk & de Jong 1986). These results hold when hidden heterogeneity in individual quality, as well as heterogeneity between individuals born from the same mother is controlled for. Our results also show that this effect is independent of the number of breeding failures experienced by the females. It is also independent of whether females succeed or not their first reproduction, although both these later factors tend to increase females' mortality. A potential bias could have been that, beforehand, only individuals of better quality had the opportunity to reproduce more than once. However, we show that mass is an important criteria determining breeding opportunity for fully-grown individuals, overweighed individuals reproducing less. Though, controlling for females' mass at breeding opportunity does not modify our results. Another possibility is that sick females (but without loss of weight) are not given the opportunity to breed. This potential bias is uncontrolled for in our analysis. Our result holds however long after the last recorded reproduction at oldest ages (>3.5 years old). More generally, the

average age at breeding is  $1.57 \pm 1.13$  years-old while averaged age at death or censoring is  $3.36 \pm 1.5$  years-old. Most of the data includes therefore ages at which sick individuals at time of breeding are either dead or have recovered.

It is here crucial to assess whether our results may arise from type 2 statistical error. We used a procedure detailed in Appendix 1 to generate 1500 random datasets where individuals are subject to increasing mortality linked to their amount of reproductive success, with coefficients ranging from  $\beta^*=0.09$  to  $\beta^*=0.9$  (incremented by 0.059, 100 random dataset for each values). We found that the minimum  $\beta^*$  leading to an excess of deaths related to reproductive success which is detected more than 95 times out of 100 is  $\beta^*=0.15$  (RR=1.16, p=0.04). This value can be considered small since it corresponds to only  $4.2 \pm 1.7$  additional deaths out of the 91 natural deaths recorded in the dataset. If any, a slight increase of mortality due to amount of reproductive success (RR>1.16) would have been detected.

Our results show that Darwinian demons may not be only phantasmagorical creatures. They are coherent with previous studies that show no cost of reproduction in captive population of birds and mammals (Ricklefs & Cadena 2007 ; Tarin *et al.* 2014). When resources are abundant and predation absent, the organism seems able to reproduce without paying the price of internal allocation strategy or biological constraints. They become paradoxical creatures able to maximize both survival and reproductive fitness components. These results shed new light on the importance of acquisition-allocation trade-offs in free-ranging populations. Non genetic trade-offs have been attributed to three major origins : acquisition-allocation strategy ; internal allocation strategies and environmental constraints. Our results suggest that acquisition-allocation strategy into a density-dependence context is likely the most prominent actor in mediating trade-offs between life-history traits ; a result predicted by the most precursor work on the topic (e.g. Reznick 1985 ; Stearns 1989 ; van Noordwijk & de Jong 1986). Finally one may also wonder the amount of unpublished negative results in estimating cost of reproduction. Controlling of fixed or dynamic heterogeneity in individual quality is not an easy task and few dataset allow for such control. It is however determinant for convincingly demonstrate the absence of cost of reproduction.

In captive mouse lemurs, instead of increasing mortality, reproduction seems to favor survival. Individuals reproducing more than twice die half less than individuals successfully reproducing once. This result holds until old ages. Although under the life-history trade-off paradigm, this positive association between reproductive success and survival is quite unexpected, proximate mechanisms may explain it. Indeed, female reproductive hormones are known to have a protective effect on several biological functions, and therefore potentially, and organismal maintenance. For instance, estrogen exposure – and its endocrine complement, progesterone – decreases neurodegeneration, and would protect against stroke (Garcia-Segura *et al.* 2001 ; Singh 2006). Reproduction would also decrease the risk of breast cancer ; and increases the chances of surviving a breast cancer at old ages (Thalib *et al.* 2005). Reproduction, potentially through an improved efficiency of the antioxidant response, would also effectively protect the organism against the damages of the burst of oxidative stress induced by the reproductive effort (Oldakowski *et al.* 2012). The oxidative status of reproductive females can even be better than that of non-reproductive females (Garratt *et al.* 2011). Overall, these studies

suggest that in female mammals, reproduction could have a protective effect on several physiological functions closely linked with the survival prospects.

## Supplementary Methods

Cox model are semi-parametric survival analyses that fit the mortality hazard  $h(t|z_i)$  of individual  $i$  at age  $t$  as a function of the set of covariate  $z_i$  describing the individual  $i$  such that :

$$h(t|z_i) = h_0(t)e^{\beta z_i}$$

where  $h_0(t)$  is the baseline mortality hazard (when all variables are set to 0 or to reference values) and  $\beta$  is the vector of the coefficients corresponding to covariate  $Z$ .

Our model is time-varying and covariates may change at entrance into a new season. Let us denote  $x(n)$  the individual age at entrance into season  $n$ . The survival probability of individual  $i$  over the season  $n$  is given by :

$$p_i(n) = \exp\left[-e^{\beta z_i} \int_{x(n)}^{x(n+1)} h_0(t) dt\right]$$

Let us now assume that an additional covariate  $z^*$  increases proportionally mortality hazard according to a coefficient  $\beta^*$ . The new seasonal survival probability is :

$$p_i(n)p_{i^*}(n) = \exp\left[-e^{\beta z_i} e^{\beta^* z_i^*} \int_{x(n)}^{x(n+1)} h_0(t) dt\right]$$

and

$$p_{i^*}(n) = \frac{p_i(n)p_{i^*}(n)}{p_i(n)} = \exp\left[-e^{\beta z_i} \int_{x(n)}^{x(n+1)} h_0(t) dt (e^{\beta^* z_i^*} + 1)\right]$$

The survival probability  $p_i(n)$  is easily derived using the ‘survfit’ function of the ‘survival’ package in ‘R’ (Therneau 2015). We can then derive the additional survival probability  $p_{i^*}(n)$  according to any covariate  $Z^*$  and coefficient  $\beta^*$ .

Using the calculation above, we can then find the competitive survival probability  $p_{i^*}(n)$  for each season-individual of our dataset described by their cumulative reproductive success at entrance in season  $n$  ( $Z^*=CRS_{i,n}$ ) for any additional mortality coefficient linking  $\beta^*$  to  $CRS_{i,n}$ . We can then randomly generate datasets where individuals die from this additional cause of death.

## 2.2 Meilleure survie des bonnes reproductrices ? Exploration à l'aide d'un marqueur proximal de sénescence

### Introduction

L'activité métabolique est responsable de la formation de réactifs de l'oxygène (ROS), des produits de la synthèse de l'ATP par les mitochondries. Les ROS causent des dommages cellulaires via la détérioration des molécules, comme les nucléotides (des composants de l'ADN), les lipides et les protéines. Pour limiter les dommages induits par les ROS, l'organisme dispose de défenses anti-oxydantes et de mécanismes de réparation. Un excès de production de ROS par rapport à la réponse anti-oxydante constitue un stress oxydatif et entraîne la détérioration et le vieillissement de l'organisme (Finkel & Holbrook 2000 ; Monaghan *et al.* 2009 ; Selman *et al.* 2012).

La reproduction est associée à une activité métabolique importante chez de nombreuses espèces (p. ex. McLean & Speakman 2000). La reproduction est donc une période de forte production de ROS et a été liée à un stress oxydatif chez plusieurs espèces de vertébrés (Dowling & Simmons 2009 ; Monaghan *et al.* 2009 ; Stier *et al.* 2012 ; Speakman & Garratt 2014). Par exemple, une taille de portée élevée chez la souris s'accompagne d'importants dommages oxydatifs (Stier *et al.* 2012). Cependant, d'autres études ne détectent pas cette relation. C'est le cas de l'étude par Nussey *et al.* (2009) où la reproduction ne semble pas liée aux dommages oxydatifs pour des brebis de Soay (*Ovis aries*). La reproduction peut même être associée à des mécanismes protecteurs de l'organisme contre les dommages et le vieillissement (p. ex. hypothèse de l'« oxydative shielding » ; Blount *et al.* 2015).

D'après le Chapitre 2.1, les microcèbes femelles en captivité se reproduisant avec succès meurent moins que les femelles en échec de reproduction. Cela suggère que les événements de reproduction ont un effet protecteur en termes de mortalité (et non pas délétère, comme attendu d'après la théorie des compromis entre traits d'histoires de vie). Cette conclusion étant issue d'une approche corrélative basée sur les histoires de vie à l'échelle de la colonie de microcèbes, nous avons voulu la vérifier dans un dispositif expérimental, dans lequel l'investissement reproducteur femelle était déterminé *a priori* (mise à la reproduction, ou non), et en examinant un marqueur physiologique intégratif du vieillissement, directement lié à l'activité des ROS et réponses anti-oxydantes ; le changement de longueur des télomères.

Les télomères sont les régions terminales des chromosomes qui jouent un rôle dans la protection de l'ADN contre les erreurs de réplication et les dommages nucléotidiques. Les télomères s'érodent à chaque événement de réplication et la longueur de ces régions est un marqueur de vieillissement et un prédicteur de la longévité (Monaghan & Haussmann 2006 ; López-Otín *et al.* 2013). En cas de stress oxydatif, cette érosion est accélérée. La télomérase est l'enzyme qui permet la synthèse et la réplication des télomères. Un déficit ou un dysfonctionnement de la télomérase est responsable de la perte de portions de télomères à chaque réplication de l'ADN, se traduisant par une réduction progressive de la longueur des télomères. Son rôle est important dans la réponse de l'organisme à la production de ROS. La longueur des télomères est le résultat de l'équilibre entre les ROS (qui dégradent les télomères, et donc réduisent leur longueur), la réponse anti-oxydante (qui neutralise les ROS), et l'activité de la télomérase (qui répare les télomères, et donc maintient, voire augmente, leur

longueur). Chez plusieurs espèces de vertébrés, la reproduction est associée à une plus rapide érosion des télomères (p. ex. chez la tortue luth *Dermochelys coriacea*; Plot *et al.* 2012; ou la mésange bleue *Cyanistes caeruleus*; Sudyka *et al.* 2014), bien que cette conclusion ne soit pas consensuelle (p. ex. chez le manchot Adélie *Pygoscelis adeliae*, Beaulieu *et al.* 2011; ou le choucas des tours *Corvus monedula*; Boonekamp *et al.* 2014). La relation inverse a même été observée dans la seule étude portant sur un mammifère hibernant : les télomères des femelles se reproduisant s'allongeaient au cours de la période de reproduction (Turbill *et al.* 2013).

Chez l'humain et les grands singes, les télomères sont relativement courts et raccourcissent avec l'âge (Steinert *et al.* 2002; Tackney *et al.* 2014). Le microcèbe possède des télomères particulièrement longs en comparaison de ceux des autres primates (25 à 30kb), et l'érosion de leurs télomères avec le temps est limitée. En ce sens, le microcèbe se rapproche plus de la souris de laboratoire, qui est un autre petit mammifère à vie « rapide » (voir la partie « Modèle biologique »), que des grands singes pourtant plus proches phylogénétiquement (Trochet *et al.* 2015). Or, ces mammifères à vies rapides se reproduisent plus souvent et produisent des portées de plus grande taille que les espèces à vies plus lentes. Ces organismes investissent massivement dans la reproduction au détriment de leur survie. Nous avons comparé la dynamique des télomères de femelles microcèbes en captivité ayant ou non la possibilité de se reproduire au cours d'une saison de reproduction. En nous basant sur la littérature dominante, nous nous attendions à ce que la reproduction ait un effet délétère sur l'organisme, indiqué par un raccourcissement des télomères. Mais en nous basant sur nos résultats corrélatifs sur le microcèbe, et sur les études montrant une absence de coût physiologique proximal de la reproduction chez de petits mammifères (télomères, Turbill *et al.* 2013; stress oxydatif, Garratt *et al.* 2011, Oldakowski *et al.* 2012), la relation inverse pouvait également être attendue : chez ces femelles microcèbes, la reproduction pourrait se traduire par une meilleure protection ou réparation des télomères, indicateur d'un effet neutre, voire positif, de la reproduction sur la longévité.

## Méthodes

### Protocole expérimental

Nous avons comparé la dynamique des télomères de sept femelles qui ont eu l'occasion de se reproduire (groupe Reproduction) et six femelles qui n'ont pas eu l'opportunité de s'accoupler (groupe Contrôle). Les femelles du groupe Reproduction ont été mises en présence de mâles au moment de leur œstrus, puis isolées le temps de la gestation et de la lactation (avec les petits). Deux femelles supplémentaires avaient été mises en présence de mâles en vue d'une fécondation mais ne se sont pas accouplées ou ont avorté peu après. Ces femelles ont été retirées de notre étude car elles ne pouvaient pas être maintenues dans le traitement 'Reproduction' (puisqu'elles ne se sont pas reproduites), mais elles ne pouvaient pas non plus être intégrées dans le traitement 'Contrôle' (absence de reproduction) au risque d'induire un biais dans ce traitement (puisque leur absence de reproduction pouvait être due à des caractéristiques intrinsèques de ces femelles, non-représentatives de l'état des femelles en période de reproduction mais en absence d'opportunité de fécondation). Toutes les femelles utilisées ont été exposées aux mêmes conditions d'élevage : température et humidité constantes, eau et nourri-

ture disponibles *ad libitum* et 14h de lumière par jour pour reproduire la photopériode de la saison de reproduction naturelle des microcèbes (voir Modèle biologique). Les femelles des groupes Contrôle et Reproduction ont des rythmes biologiques synchronisés par la photopériode (p. ex. les œstrus sont synchrones). Le suivi a donc été fait en parallèle pour les femelles des deux groupes afin que les femelles soient au même stade de leur cycle saisonnier.

Trois prélèvements sanguins ont été effectués à trois points clé du cycle de reproduction (Figure 2.6) : à l'entrée des femelles en saison de reproduction (« Prélèvement 1 », environ deux semaines avant l'œstrus des femelles), entre l'accouchement et le pic de lactation des femelles du traitement 'Reproduction' (« Prélèvement 2 » ; environ 10 jours après l'accouchement, le pic de lactation étant vers 15-20 jours *post-partum*), et au moment du sevrage des petits (« Prélèvement 3 » ; environ 40 jours *post-partum*). Nous n'avons pas pu réaliser plus de prélèvements sanguins car ce sont des événements relativement stressants pour les microcèbes femelles, et des prises de sang trop fréquentes auraient pu compromettre la gestation ou les soins parentaux femelles précoces. Ce protocole permet de discriminer les effets des périodes de gestation et de début de lactation, de l'effet sur la fin de lactation ; la lactation étant la phase la plus coûteuse de la reproduction (Speakman 2008 ; Canale *et al.* 2012).

A partir des prélèvements sanguins, nous avons mesuré la longueur des télomères des lymphocytes des femelles. Nous avons préféré l'utilisation des cellules sanguines circulantes dans tout l'organisme et à fort taux de renouvellement, plutôt que des cellules d'autres tissus tels que l'épiderme ou les muscles (Nussey *et al.* 2014). Le but étant de détecter un éventuel effet de la reproduction sur les télomères, les cellules circulantes ont plus de chances d'être impactées par un éventuel stress oxydatif que des cellules de tissus non impliqués dans la reproduction.

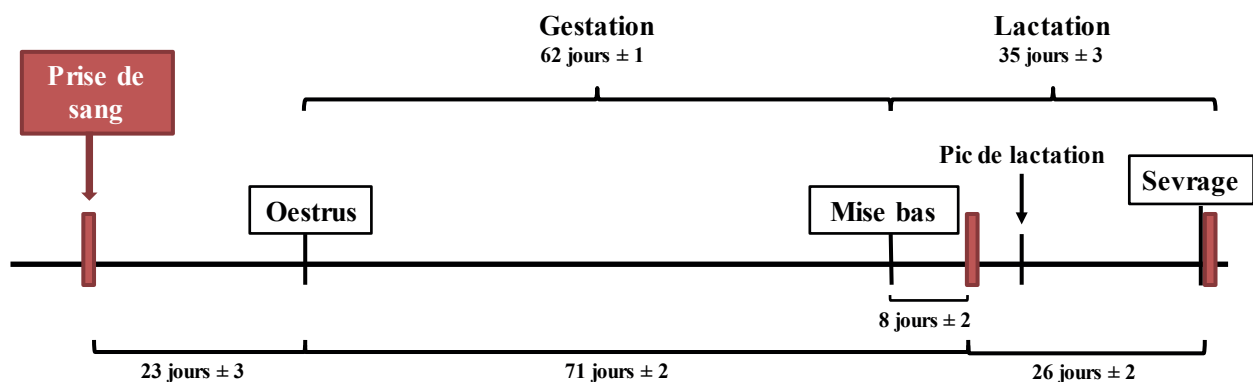


FIGURE 2.6 – Déroulement de l'expérience. Trois prélèvements sanguins ont été fait en début de la saison de reproduction, environ 8 jours après l'accouchement des femelles du groupe Reproduction et au moment du sevrage des juvéniles.

Le sang a été prélevé au niveau de la veine saphène et a directement été mélangé à un anticoagulant (EDTA). Le volume prélevé était d'environ  $50\mu\text{l}$  par prélèvement. L'échantillon a ensuite été conservé dans de la glace avant d'en extraire l'ADN. L'ADN des lymphocytes contenus dans les échantillons sanguins a été extrait grâce au kit QIAamp Blood Mini (QUIAGEN). Les échantillons ont été exposés à la protéinase K qui lyse les cellules, puis l'ADN a été récupéré par le biais de



purifications successives. L'éluion finale a été faite dans du Tris-HCl. L'ADN extrait a été ensuite stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Mesure des longueurs de télomères

A partir des extractions d'ADN total, des mesures de longueur des télomères ont été faites sous la responsabilité de Lauréline Roger (UMR 7196 – Structure et instabilité des génomes, MNHN/CNRS). La longueur des télomères a été mesurée par PCR quantitative [QPCR] qui permet de faire une quantification relative de la longueur moyenne des télomères contenus dans un échantillon d'ADN génomique. Plus précisément, la valeur mesurée représente le nombre de répétitions de télomères ( $T$  – déterminées à partir de primers dirigés contre les séquences télomériques) normalisées sur un gène de référence ( $S$ ), et donc exprimée par un ratio  $T/S$ . C'est la seule méthode qui ne nécessite pas de calibration de marqueurs spécifiques au génome de l'espèce étudiée. Elle est donc de mise en œuvre relativement simple et rapide, et particulièrement adaptée pour les faibles quantités d'ADN. Son principal défaut est qu'elle ne donne qu'une information relative sur la longueur des télomères (RTL pour « Relative Telomere Length » ; et non pas la longueur absolue). Toutefois, dans un design expérimental incluant un traitement contrôle et se basant sur une caractérisation des changements au cours du temps de la longueur des télomères (entre les Prélèvements 1 à 3), cette méthode est suffisante pour tester les prédictions sur la relation entre reproduction et dynamique de la longueur des télomères.

Nous avons utilisé le protocole de QPCR décrit par Cawthon (2002 ; voir encadré X). Le gène de référence est le gène 36B4, codant pour protéine ribosomale et située sur le chromosome 12. Neuf mesures de longueur de télomère ont été faites à partir de chaque échantillon d'ADN (trois répliquas par plaque, plaques répliquées trois fois). Chaque mesure a été faite sur 1ng d'ADN auquel a été ajouté les amorces (« Forward » et « Reverse » ;  $10\mu\text{Mol}$  de chaque ; amorce pour les télomères ou le gène de référence),  $3,8\mu\text{l}$  d'eau et  $10\mu\text{l}$  du réactif FastStart Essential DNA green master (Roche Life Science) qui contient un fluorochrome (SYBR Green), la polymérase et un tampon. Les témoins utilisés sont l'eau et de l'ADN extrait de cellules de microcèbes cancéreuses (télomères longs) et saines (télomères courts) issues de cultures cellulaires.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

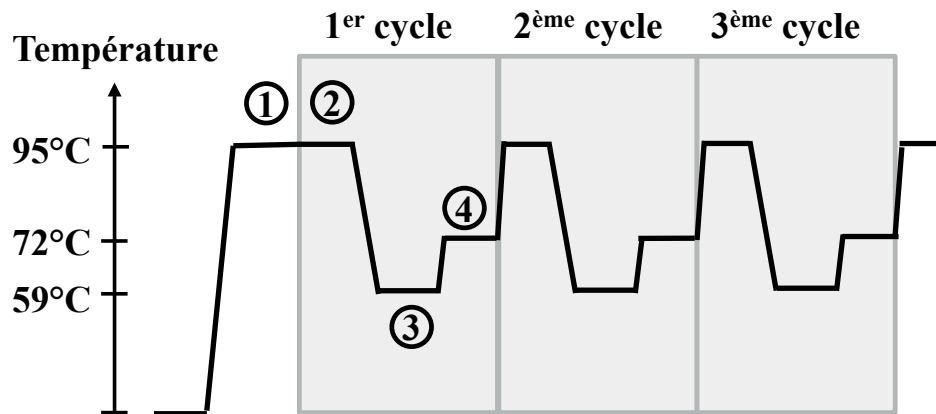
Amorce Télomère Forward : CGG-TTT-GTT-TGG-GTT-TGG-GTT-TGG-GTT-TGG-GTT

Amorce Télomère Reverse : GGC-TTG-CCT-TAC-CCT-TAC-CCT-TAC-CCT-TAC-CCT-TAC-CCT

Amorce 36B4 Reverse : CCC-ATT-CTA-TCA-TCA-ATG-GGT-ACA-A

Amorce 36B4 Forward : CAG-CAA-GTG-GGA-AGG-TGT-AAT-CA

- ① Dénaturation initiale (10min à 95°C) : déshybridation de l'ADN dont l'hélice s'ouvre et libère les deux doubles brins.
- ② Dénaturation (30sec à 95°C) : comme le ①.
- ③ Hybridation (1min à 59°C) : appariement des amorces avec les brins d'ADN.
- ④ Elongation (1min à 72°C) : réplification des brins d'ADN complémentaires aux amorces.



Les étapes ②, ③ et ④ sont répétées 35 fois. Le nombre de cycle nécessaires à la détection par fluorescence du brin répliqué traduit la longueur de la région d'intérêt.

Encadré 3 – **Étapes de la QPCR.**

### Homogénéité des groupes de femelles

Sur des très petits échantillons (ici inférieur à 10 par traitement), avec des facteurs confondants pré-identifiés et un nombre d'individus à disposition limité (trentaine de femelles), l'attribution aléatoire des individus à un traitement peut générer des biais, compromettant l'interprétation de la comparaison entre traitements. Il est alors préférable de constituer des lots expérimentaux en équilibrant les individus relativement aux facteurs confondants pré-identifiés. Le choix des femelles des groupes Contrôle et Reproduction a donc été fait de façon à ce que les groupes soient les plus homogènes possibles en termes d'âge, de poids, d'histoire reproductive passée et de lignée maternelle, compte tenu des femelles disponibles pour cette expérience. Toutes les femelles utilisées sont âgées de plus d'un an et ont déjà eu l'opportunité de se reproduire au moins une fois au cours des années précédentes. Malheureusement, du fait de contraintes sur les nécessités de mise à la reproduction de certaines femelles (leur première vocation pour le maintien à long terme de cet élevage), nous n'avons pu éviter des différences entre les deux groupes. L'âge des femelles est en moyenne légèrement plus élevé dans le groupe Contrôle (4,8 ans  $\pm$  1,4 contre 4 ans  $\pm$  2 dans le groupe Reproduction ;  $p\text{-value}_{\text{Wilcoxon}}=0,02$ ). La masse moyenne à l'entrée en saison de reproduction est également un peu plus élevée dans le groupe Contrôle (123,8g  $\pm$  12,6 contre 110,3g  $\pm$  9,9 dans le groupe Reproduction ;  $p\text{-value}_{\text{Wilcoxon}} < 0,0001$ ). Le nombre d'opportunités de reproduction (nombre de fois où les femelles ont été mises en présence de mâles en période d'œstrus) est le même en moyenne dans les deux groupes (1,6 fois  $\pm$  0,9 ;  $p\text{-value}_{\text{Wilcoxon}}=0,6$ ). Toutes les femelles utilisées ont accouché une fois au cours des années précé-

dentés, sauf une femelle du groupe Contrôle qui a accouché deux fois.

### Analyses statistiques

Pour comparer la dynamique des télomères pour des femelles ayant eu l'opportunité de se reproduire ou pas, au cours de la saison de reproduction, nous avons analysé la longueur relative de télomères pour chaque dosage à l'aide d'un modèle linéaire mixte. Les variables explicatives considérées étaient (i) l'effet du traitement expérimental (dénommé *Treatment*, « Contrôle » versus « Reproduction »), (ii) le stade de la saison de reproduction (dénommé *NoSample* ; « Prélèvement 1 », « Prélèvement 2 » ou « Prélèvement 3 »), et (iii) l'interaction entre ces deux covariables (*Treatment\*NoSample*), qui permet de caractériser la dynamique temporelle de RTL au sein du traitement « Reproduction ». Les RTL mesurés à partir des répliquas présents sur une plaque pour chaque échantillon ont été moyennés. En revanche, les valeurs obtenues en répliquant trois fois la QPCR sur des plaques différentes ont été analysées comme des mesures répétées de RTL pour chaque individu. Nous avons donc inclus dans le modèle un effet aléatoire prenant en compte la non-indépendance des mesures de RTL entre dosages (dénommé *Sample*) et entre individus (*Individual*). Nous avons utilisé la fonction 'lme' du package 'nlme' pour 'R' (Pinheiro *et al.* 2015).

Parmi les femelles du groupe Reproduction, le coût physiologique de la reproduction pourrait avoir dépendu de leur effort reproducteur. Nous avons supposé que cet effort reproducteur pouvait être indexé par la taille de la portée. Nous avons donc testé si le changement de RTL au cours de la période de reproduction dépendait de la taille de portée. Pour cela, les variations de RTL ont été analysées à l'aide d'un modèle incluant un effet du stade de la reproduction (*NoSample*), un effet linéaire de la taille de portée (dénommée *LitterSize* ; 1 à 3 petits), ainsi que leur interaction (le changement de RTL au cours de la saison de reproduction devant être plus fort pour les femelles produisant le plus de petits). Nous avons également inclus les effets *Sample* et *Individual* au modèle. Cette analyse a été faite sur les femelles du groupe Reproduction uniquement.

### Résultats

Le seul effet significatif est celui du stade chronologique au sein de la période de reproduction : les RTL sont plus élevés au sevrage des petits (Prélèvement 3) qu'avant la période de reproduction (avant l'œstrus, Prélèvement 1 ; Coefficient=0,13, Variance=0,05, p-value=0.018 ; Figure ??). Aucun autre effet n'est détecté statistiquement. La variabilité des RTL entre reliquats du dosage (effet aléatoire *Sample* ; Variance=0,13) est aussi grande que celle observée entre individus (effet aléatoire *Individual* ; Variance=0,11), et que toute la variance résiduelle non-expliquée (Variance=0,16).

Lorsque l'on ne considère que les femelles du groupe Reproduction, la RTL ne dépend pas du nombre de petits produits (Coefficient=-0,02, Variance=0,09, p-value=0,85).

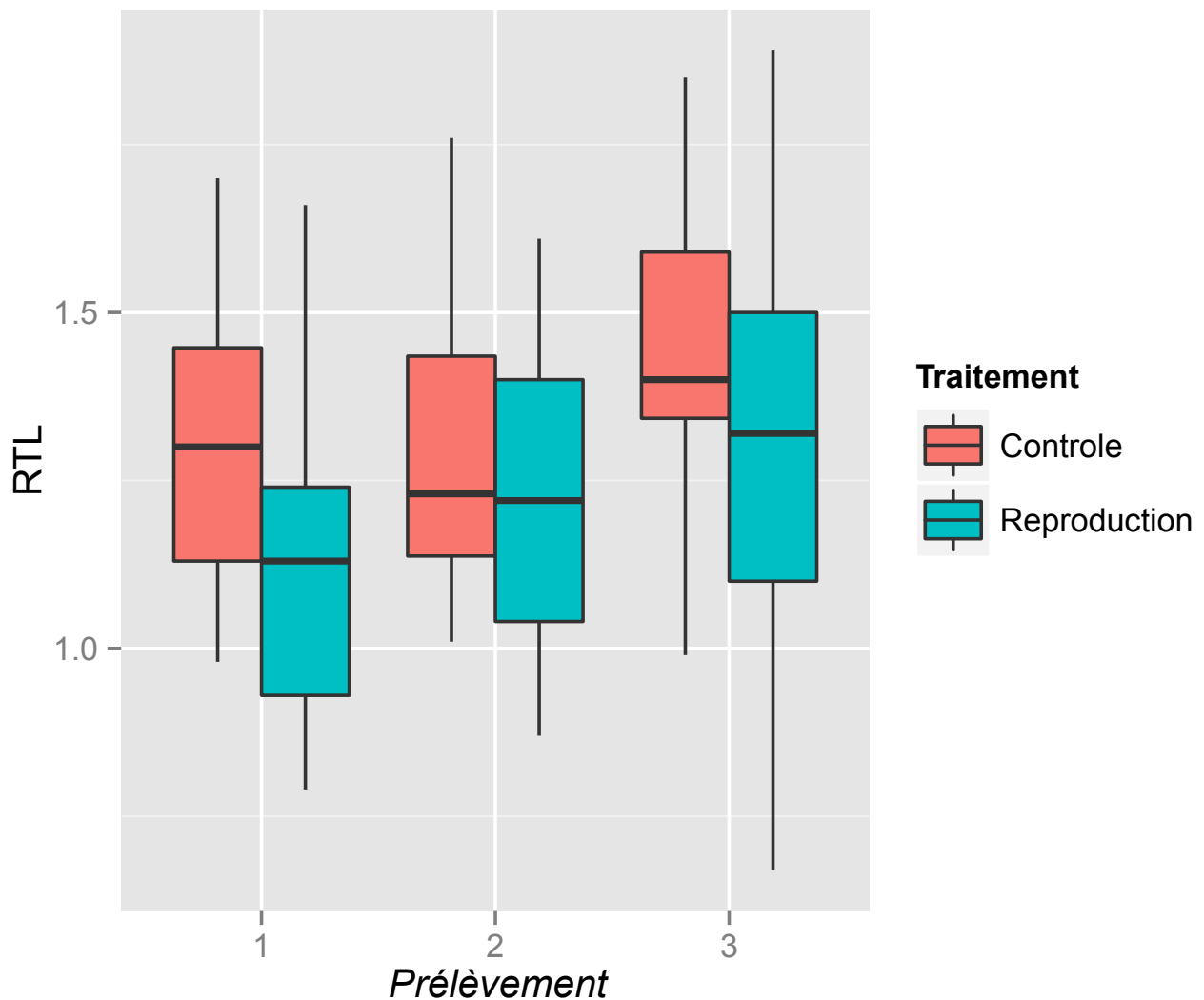


FIGURE 2.8 – Evolution de la longueur des télomères des femelles des groupes Contrôle et Reproduction au cours de la saison de reproduction : Prélèvement 1 à l’entrée dans la saison ; Prélèvement 2 peu de temps après l’accouchement des femelles gestantes ; Prélèvement 3 au moment du sevrage des juvéniles.

## Discussion

La seule conclusion robuste et pertinente que nous pouvons extraire de cette étude est que la longueur des télomères augmente au cours de la période de reproduction chez les femelles, sans forcément de lien avec la reproduction effective (puisque nous ne détectons pas de différence de dynamique temporelle entre les traitements « Contrôle » et « Reproduction »). Et s’il existe un lien avec l’effort reproducteur (nombre de petits produits), cette relation serait positive : plus une femelle fait de petits, plus ses télomères tendraient à s’allonger. Nous n’avons donc aucune indication que la reproduction induise des dommages biologiques via la dégradation de l’ADN, et compromette donc les chances de survie à moyen terme au travers d’un vieillissement biologique accéléré. Au contraire, les tendances observées sur les longueurs de télomères viennent conforter l’effet protecteur de la reproduction sur les chances de survie mis en évidence lors de l’analyse des relations reproduction-

mortalité (voir Chapitre 2.1).

L'accroissement des longueurs de télomères au cours de la période de reproduction – et quel que soit le statut reproducteur effectif – est également cohérent avec la seule étude réalisée sur un mammifère hibernant (Turbill *et al.* 2013). En effet, en captivité, des femelles adultes de loirs gris (*Glis glis*) montrent également un accroissement de la longueur des télomères au cours de la période de reproduction. Deux hypothèses mutuellement non-exclusives peuvent expliquer cette élongation (ou stase) des télomères chez les femelles en période de reproduction. Tout d'abord, la configuration physiologique et endocrinienne de l'organisme pour la reproduction pourrait augmenter l'efficacité des mécanismes de maintenance cellulaire (incluant potentiellement les réponses anti-oxydante et l'activité de la télomérase). En effet, la production d'œstradiol et/ou de progestérone semble avoir des effets positifs sur la maintenance cellulaire (Garcia-Segura *et al.* 2001 ; Singh 2006). Et il s'avère que le stress oxydatif peut être largement contrôlé en période de reproduction chez les femelles de plusieurs petits rongeurs (chez un écureuil hibernant, le tamia rayé *Tamias striatus*, Bergeron *et al.* 2011 , le campagnol roussâtre *Myodes glareolus*, Oldakowski *et al.* 2012, et des souris de laboratoire *Mus musculus*, Garratt *et al.* 2011). Par ailleurs, les mammifères hétérothermes pourraient posséder des mécanismes de maintenance cellulaire, notamment de contrôle du stress oxydatif et de restauration des télomères, plus efficaces que les mammifères homéothermes stricts. Alors que la littérature documente massivement les réductions de longueur des télomères au cours de la vie par divers mécanismes, il existe déjà plusieurs exemples d'accroissement saisonnier de la longueur des télomères chez des hibernants, que ce soit au cours de la période d'hypométabolisme hivernal (pourtant associé avec des pics de production de ROS très brefs, mais récurrents lors des réactivations périodiques ; Turbill *et al.* 2012 ; Giroud *et al.* 2014) et chez des femelles adultes en période de reproduction (Turbill *et al.* 2013). Ces hypothèses restent à valider à l'aide d'analyse fine des performances des mécanismes de contrôle du stress oxydatif et de restauration des télomères au cours du cycle annuel, dans des dispositifs expérimentaux manipulant l'effort reproducteur.

Un des défauts majeurs de la méthode de mesure des RTL par QPCR est la faible répétabilité entre mesures (Nussey *et al.* 2014). De fait, notre protocole de quantification (basé sur 3 dosages indépendants) et notre modélisation statistique des données ont permis de prendre en compte au mieux cette faible répétabilité. Il s'est avéré que la variabilité de RTL était aussi importante entre dosages qu'entre individus, et équivalente à la quantité de variabilité non-expliquée dans l'analyse (variance résiduelle). Cette faible répétabilité de la mesure de RTL a très certainement réduit la puissance statistique des modèles cherchant à détecter d'éventuelles dynamiques temporelles de longueur des télomères. Les prochaines études par QPCR devront s'efforcer de réduire la variabilité entre dosage et d'augmenter le nombre d'individus échantillonnés par traitement.

## Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié l'effet de la reproduction sur la mortalité future et un marqueur physiologique lié au vieillissement, la longueur des télomères, dans un environnement non limitant en ressources (la captivité). Nous avons montré une absence de coût de la reproduction pour les femelles microcèbes, que ce soit par l'étude corrélative des traits d'histoire de vie ou par notre approche expérimentale. La reproduction serait même liée à une meilleure survie future. Ces résultats suggèrent que les compromis entre traits d'histoire de vie ne sont pas intégrés avec un déterminisme fixe (génétique) mais sont dépendants de l'existence de contraintes environnementales. Notre étude contribue à l'identification des conditions dans lesquelles des compromis entre fonctions biologiques s'expriment.

# Chapitre 3

## Conditions de début de vie et mortalité adulte

### Objectif et résumé

L'objectif de ce troisième chapitre est de tester l'existence d'un compromis entre le développement précoce (jusqu'au sevrage), au travers de la croissance ou de l'effet des conditions environnementales en début de vie, et la mortalité adulte chez le microcèbe en captivité. Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une absence de coût de la reproduction en termes de survie pour la femelle microcèbe élevée en captivité où les ressources sont non limitantes et les pressions de prédation et d'infection nulles (ou très limitées). Dans ce contexte « idéal », les mères ont la possibilité d'allouer des soins et des ressources à leurs petits sans contraintes. Mais quelles sont les implications pour les petits ?

Chez de nombreuses espèces, la survie adulte est réduite par une croissance forte (grande différence de taille entre la naissance et la maturité) et/ou rapide. Or, la croissance dépend du contexte environnemental de début de vie, contexte qui peut lui-même avoir un effet sur la mortalité adulte, indépendamment de son effet sur la croissance. Nous avons cherché à caractériser les effets de la croissance et des conditions environnementales en début de vie sur la mortalité adulte, à partir des suivis de 295 microcèbes élevés sous un rythme saisonnier naturel. La croissance des petits avant leur sevrage ne s'avère pas coûteuse en termes de mortalité à l'âge adulte. En situation de ressources non limitantes (et absence de mortalité extrinsèque), il n'y a donc pas de coût de la croissance pour les jeunes microcèbes. En revanche, la composition en mâles versus femelles de la portée a un effet sur la mortalité adulte : un sexe-ratio de la portée élevé (en faveur des mâles) diminue la mortalité estivale (LD) adulte des femelles (et n'a pas d'effet sur la mortalité mâle). Ce résultat est cohérent avec plusieurs études précédentes démontrant une allocation maternelle plus élevée aux portées contenant des descendants mâles (ce qui bénéficie indirectement aux femelles ayant des frères). Ce biais d'allocation est répandu parmi les primates. Ces résultats confortent le fait que des différences d'allocation à la reproduction ne se répercutent sur la mortalité adulte que dans des conditions environnementales particulières.

## **Absence de compromis entre croissance et conditions de début de vie et mortalité adulte en captivité**

Cette étude fait l'objet d'un article en préparation :

### **Growing with no limit : no major trade-off between early-life conditions and adult mortality in a captive primate**

Julie LANDES<sup>1,2</sup>, Pierre-Yves HENRY<sup>2</sup>, Isabelle HARDY<sup>2</sup>, Martine PERRET<sup>2</sup>, Samuel PAVARD<sup>1</sup>

1- Eco-Anthropologie et Ethnobiologie, UMR 7206 CNRS, MNHN, Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75005 Paris, France ; 2- Mécanismes Adaptatifs et Evolution, UMR 7179, Sorbonne

#### **Introduction**

Vertebrate species display a large diversity of life histories. According to the life-history theory, this diversity is explained by the fact that an organism with limited resources available and biological constraints cannot maximize simultaneously reproduction, growth rate and maintenance, resulting in allocation trade-offs between these traits (Stearns 1989). The combinations of life history traits expressed by the different bird and mammal species can be ranked on a “slow-fast” continuum, once the effect of size is controlled for. Species with “fast” life histories exhibit fast growth, high reproductive success, low survival and a fast pace of aging (Promislow & Harvey 1990 ; Jones *et al.* 2008). At the opposite, “slow” living species are characterized by slow growth, lower reproductive success, high survival and a slow pace of aging. A high growth rate allows reaching maturity fast and starting reproduction early, what can increase fitness. However, fast growth is energetically costly and is responsible for cellular damages (Dmitriew 2011). Fast growth is therefore associated with rapid biological ageing of the organism. The trade-off between early-life performances in growth and later survival, formalized by the disposable soma theory of aging (Kirkwood 1977), is also visible at the intra-specific level. For example, large breeds of pet dogs grow faster and exhibit higher mortality (Kraus *et al.* 2013).

The growth-survival trade-off has been mainly evidenced under laboratory conditions thanks to dietary restriction experiments (continuous restriction or temporary restriction followed by catch-up growth ; Dmitriew 2011), or by studying genetic strains selected for their little size or exhibiting size-related mutations (e.g. in laboratory mice and rats in Rollo 2002 and Miller *et al.* 2002). *In natura*, the expected correlation between growth and adult survival or longevity is still poorly documented. Indeed, long-term tracking is necessary and the rare data available gave mixed results (Dmitriew



2011 ; e.g. correlation detected by Bronikowski & Vleck 2010 but not by Marcil-Ferland *et al.* 2013).

At the intraspecific level, growth rate is determined by genetics, but also parental and environmental effects. Parents, and in particular mothers, determine offspring's size at birth, post-natal parental care quality and quantity, or the protection of the young against deleterious conditions or predation risk. All these components of parental allocation to reproduction can affect offspring's growth (Mousseau & Fox 1998). Many parental traits at offspring's birth (e.g. mass, age, health, etc.) also impact offspring's growth (Wang & vom Saal 2000). The early-life environmental context can also affect growth rate (Dmitriew 2011). For example, temperature (Lee *et al.* 2013), dietary manipulations (Lee *et al.* 2015) or predation risk (Abrams & Rowe 1996).

As for growth, parental effects and early-life conditions exhibit long-term effects and impact adult survival in mammals and birds (Lindstrom 1999). In humans, several studies also evidenced that early-development environmental conditions are linked to adult health and to the propensity to develop diseases (Hanson & Gluckman 2014). For instance, lifespan depends on the month of birth (Doblhammer & Vaupel 2001) or to food availability for the mother during gestation (Schulz 2010). Thus, both grow rate and early-life conditions can impact adult survival. But growth itself depends on early-life environment and disentangling both effects is complicated, both biologically and statistically. It is however crucial for understanding trade-offs in life-history traits between early- and late-life : is adult mortality influenced directly by maternal allocation and socio-ecological conditions during early-life, or indirectly, through a major effect of juvenile growth ?

To assess the respective effect of both factors on adult survival, we studied the mortality of captive born grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*), raised in optimal growth conditions. *In natura*, there is a strong trade-off between growth and adult mortality ; we wanted to know if it is the case under controlled conditions where resources are provided *ad libitum* and predation and parasites are virtually absent. Under these conditions, neonate growth rate is expected to depend only on maternal traits and care, as well as litter's characteristics. After describing the link between growth rate, maternal effect or litter's characteristics on adult mortality, we disentangled the parts of growth and early-life conditions in shaping this mortality.

## Material and methods

### Biological model and population study

The grey mouse lemur is a small primate (about 80g) from Madagascar. This seasonal species is exposed to two seasons per year, the wet and the dry season. During the dry season, mouse lemurs use energy-saving mechanism to survive resources scarcity, whereas the wet season corresponds to the reproductive period. At the end of the dry season, males become sexually active (testis development) and leave their territory to find females. At the beginning of the wet season, females exhibit a short estrus period (a few hours) when they mate with several males, while the males try to mate with several females (Huchard *et al.* 2012). Usually, the first males to mate with a female sire most or all her offspring (thanks to the use of mate-guarding behaviors, copulatory plugs and sperm competition in general ; Andrès *et al.* 2003 ; Eberle *et al.* 2007). After the estrus period, males leave females'

territories and bring no care to the offspring. Gestation lasts about two months and is followed by about 40 days of lactation. After weaning, the young males leave their mother's territory while the young females are philopatric and stay close to their mother's territory (Radespiel *et al.* 2001). This sex-specific dispersal pattern, often observed in primates species (Leturque & Rousset 2004), are linked to a preferential allocation from the mothers to their sons (Johnson 1988). It is the case in mouse lemurs. For example, the mothers move their male pups in priority to a safer place in case of danger. The presence of males in a litter also promotes maternal behavior, including for the benefits of females : in litters without males the female pups exhibit lower survival and growth (Perret & Colas 1997). While favoring their sons, the mothers favor the individuals that will not compete with them once weaned. The social context of the mothers also influences the sex-ratio of their litter : grouped females produce more sons and isolated ones have more daughters (Perret & Colas 1997).

We analyzed the longitudinal monitoring of a captive colony of grey mouse lemurs housed at Brunoy (France) over 10 years (2003-2012 ; see Landes *et al.* Submitted for a detailed description and history of the captive colony). All individuals were kept under constant environmental conditions (temperature, humidity, food and water provided *ad libitum*) except for the photoperiod. Indeed, seasonality of mouse lemurs is synchronized to photoperiodic changes *in natura*, which is reproduced in captivity thanks to photoperiod length manipulations. An alternation of periods of long days (LD periods ; 14h of light per day) and periods of short days (SD periods ; 10h of light per day) reproduces the alternation of wet and dry seasons respectively and trigger the physiological and behavioral seasonal changes associated in mouse lemurs.

In the colony, the individuals are housed in monosexual groups of one to five animals per cage. During the estrus period, selected males and females are grouped (about three males and three females per cages) for about two weeks. After the females' estrus period, the males return to their monosexual groups and the females are isolated in individual cages for all the gestation, and stay in it over the lactation period with their offspring. At the end of the LD period (weaning occurs earlier), the mothers return to their initial monosexual group and all the offspring are kept in heterosexual groups during their first SD period, before being assigned to monosexual groups with the other adults the next LD period, when sexually mature (maturity is reached at about 9 months-old).

## Data

Each individual has been monitored from birth to death or until it was excluded from the colony (if not dead at the last date of observation, individual survival data were right-censored at this date). Censored individuals were either dead from unnatural causes (15 individuals dead during manipulation and 7 were euthanized for experimental purpose), transferred to another laboratory (15 individuals) or still alive at the end of the period of monitoring (198 alive on 1<sup>st</sup> January 2013).

Demographic events have been recorded (dates of birth, death or censoring, dates of beginning of each season, reproductive events for females only since paternity is unknown). Body mass was also recorded over the individuals' life, with measures at birth, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 60 days-old, and every three to four weeks afterwards until their death or censoring.

Because the pace of season alternation affects mortality in captive grey mouse lemurs (Landes

*et al.* Submitted), we selected 295 individuals (142 males and 153 females, 72 dead and 223 censored) exposed to the alternation of 6 months of LD and 6 months of SD, a photoperiodic regimen similar to the one in Madagascar. Their mother was also exposed to this photoperiodic regimen.

### Covariates

**Sex and season** – According to Landes *et al.* (Submitted), males and females exhibit different mortality trajectories over age. Their mortality depends also of the season (LD or SD). Females have higher mortality than males in LD but lower in SD. Overall individuals' mortality is higher in LD than SD periods. Because the growth and early-life environment are likely to affect mortality of males and females in different ways, the analyses were conducted on each sex and season independently (see Statistical analyses).

**Growth** – Early growth rate (*Growth*) was estimated by the slope of the regression of body mass against age, from birth to weaning (averaged at 40 days-old). Growth rate is a measure of maternal resources allocation to each individual early in life, individual's quality, and individual's investment in growth (Canale *et al.* 2012). Growth rate may depend on the body mass at birth (*MassBirth*), an indicator of the mother's pre-partum allocation to each individual. Including *MassBirth* and *Growth* in a model allows decoupling their respective effect. We also incorporated the *Growth :MassBirth* interaction in our models (i.e. the mass at weaning) to test for an effect of achieved mass when offspring become independent from their mother.

Males and females exhibit the same growth rate on average ( $0.88 \pm 0.2$ ; Wilcoxon's test : p-value=0.225 ; with a slight difference of variance : F test p-value=0.001 ; Figure 3.1.A and C). Regarding *MassBirth*, it differs a little according to the sex (on average 6.77g for males and 6.53g for females ; Wilcoxon's test : p-value=0.017 ; Figure 3.1.B).

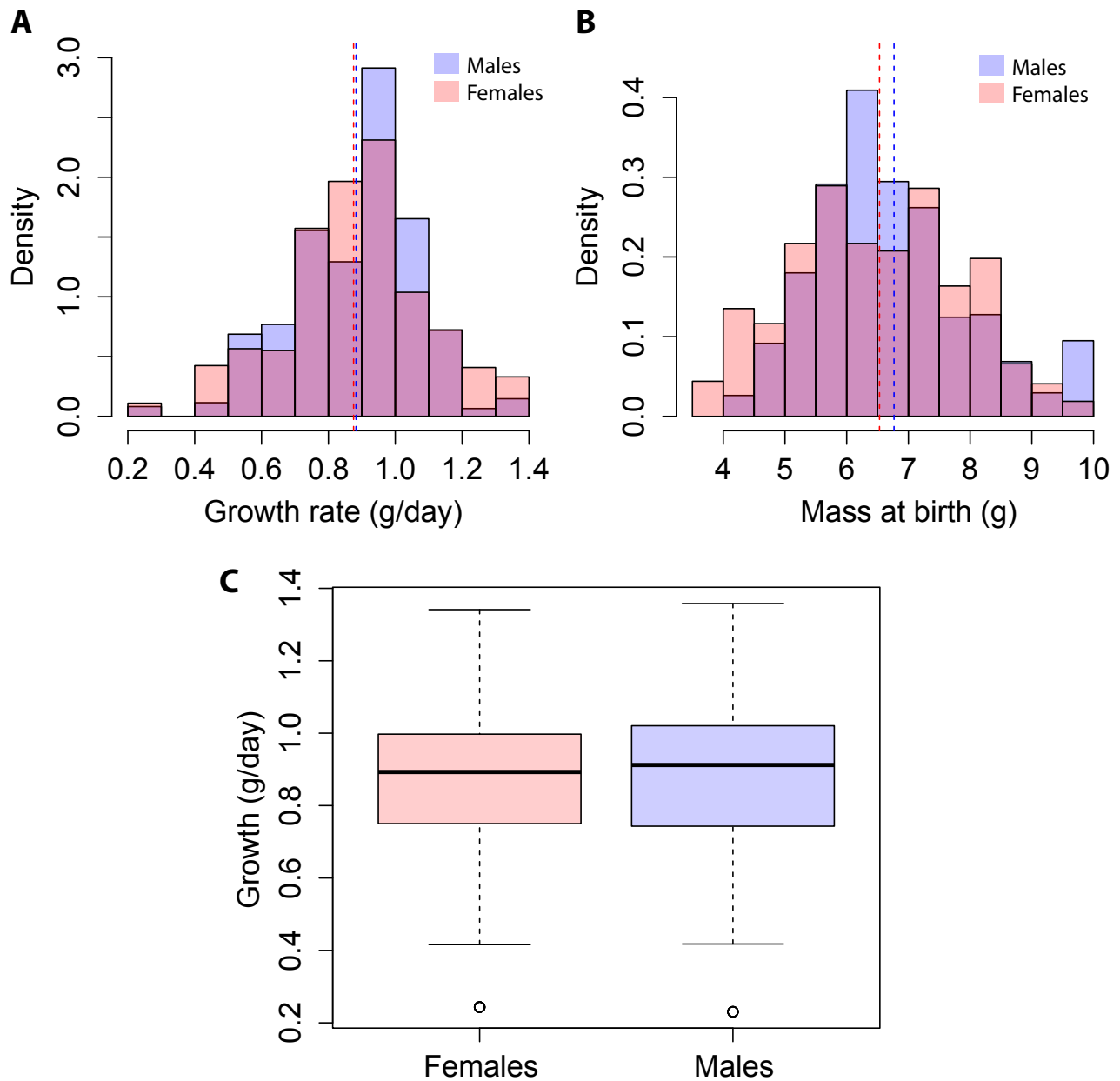


FIGURE 3.1 – Distribution of growth rate (A) and mass at birth (B), for males and females. Vertical dotted lines correspond to the mean for each sex. (C) Growth rate for males and females.

**Maternal effects** – Mother transmit genetic and epigenetic characters to their offspring that may impact their survival prospect (Perret & Colas 1997). They may also provide them different amount of resources and care during both gestation and lactation periods. To incorporate these maternal effects, we took into account the identity of the individuals' mother (*MatId*) and their maternal lineage (*Lineage*). All individuals descend from six known ancestral females, defining six maternal lineages. The age (*MotherAge*; 1.7 years-old on average,  $\pm 1.2$  years) and body mass (*MassMother*) of the mother at the birth of the individuals (after giving birth) can affect their growth and adult mortality and were also incorporated in our models.

**Litter's characteristics** – The characteristics of the litter affects the quantity of resources available for each individual and the level of competition between offspring. As mothers allocate more resources and care in males, individual's access to maternal care hence depends on the gender composition of the litter. These characteristics can affect adult mortality directly, or indirectly through an effect on postnatal growth rate. Thus, the number of individuals in the litter (*LitterSize* ; on average  $2.3 \pm 0.6$  offspring) and the number of brothers and sisters of each individual (*NbBrothers* and *NbSisters* respectively) were included in our models. The fact that an individual has no or at least one brother or sister was also incorporated (*Brothers* and *Sisters* ; with “No” as reference), as well as the sex-ratio of the litter (*SexRatio*). Sex-ratio can be estimated in several ways ; we chose to use the number of males over the total number of individuals of the litter. Overall considered litters, sex-ratio was equilibrated. The total mass of the litter at birth (*MassLitter*) was also considered as an indicator of the mother's pre-partum total investment. For the previous covariates, the individuals that died during the first days after birth were not taken into account, but their presence or absence was added to the models (*Deaths* ; with “No death” as reference). Finally, we took into account whether the litter was the first one for the mother or not (*Prim* ; with “No” as reference) to incorporate eventual adjustments of the females over subsequent reproductive events.

**Adjustment covariates** – Individuals from a same population can exhibit different risks of dying according to intrinsic individual's frailty (Vaupel *et al.* 1979). Thus, to take into account this heterogeneity, we defined a Frailty covariate as the identity of each individual. Its effect on mortality was considered as a gamma-shaped random effect in our models.

The years at birth and at entrance in a season were also incorporated as adjustment covariates to capture respectively the cohort effect and the potential slight changes in the colony management over the years of monitoring considered in the analysis. We used the same clustering of years of birth (*YearBirth*) and at entrance in seasons (*YearObs*) as defined in Landes *et al.* (Submitted). The years were clustered according to their corresponding relative risks of death to avoid computational convergence problems and a loss of statistical power that would emerge when incorporating variables with many independent levels (10 years of birth and at entrance into a season ; from 2002 to 2011 and 2003 to 2012 respectively). Two clusters were retained for the two variables, the ‘Bad years’ (2002 and from 2005 to 2010 for *YearBirth* ; 2004 and from 2007 to 2012 for *YearObs*) and the ‘Medium years’ (2003, 2004 and 2011 *YearBirth* ; 2003, 2005 and 2006 *YearObs* ; no individual born or alive during the so-called ‘Good years’ was selected for this study).

Finally, individuals were selected so that their seasonal rhythm (i.e. the number of seasons they experience per year), was 2 seasons per year ( $\pm 0.01$ ), a photoperiodic regimen close to the one in Madagascar. Short-term deviations from this seasonal rhythm can happen due to colony management. Landes *et al.* (Submitted) showed that male mortality is affected by these occasional deviations of seasonal rhythm. Thus, for the analyses including males, we incorporated the  $\Delta.SR$  covariate (Landes *et al.* submitted), defined as the difference between the seasonal rhythm of the past seasonal cycle (a LD and a SD season) and the mean seasonal rhythm experienced over the individual's life.

**Correlations between covariates describing growth and early-life conditions**

In captive grey mouse lemurs, growth depends on early-life environment (Figure 3.2 and 3.3). Concerning the maternal effects on growth rate, the more the mother is aged and heavy after giving birth, the more growth rate of the offspring is high. Moreover, the heavier they are at birth, the faster they grow. Fast growth is associated with low mass and size of the litter, few (or no) sisters and a male-biased sex-ratio. For the males only, the more brothers they have, the less they grow. There is no effect of the number of brothers on the growth of females. Increasing the number of males in a litter compromises males' growth, likely due to a higher level of competition between males, or a bet-hedging allocation of care by the mother.

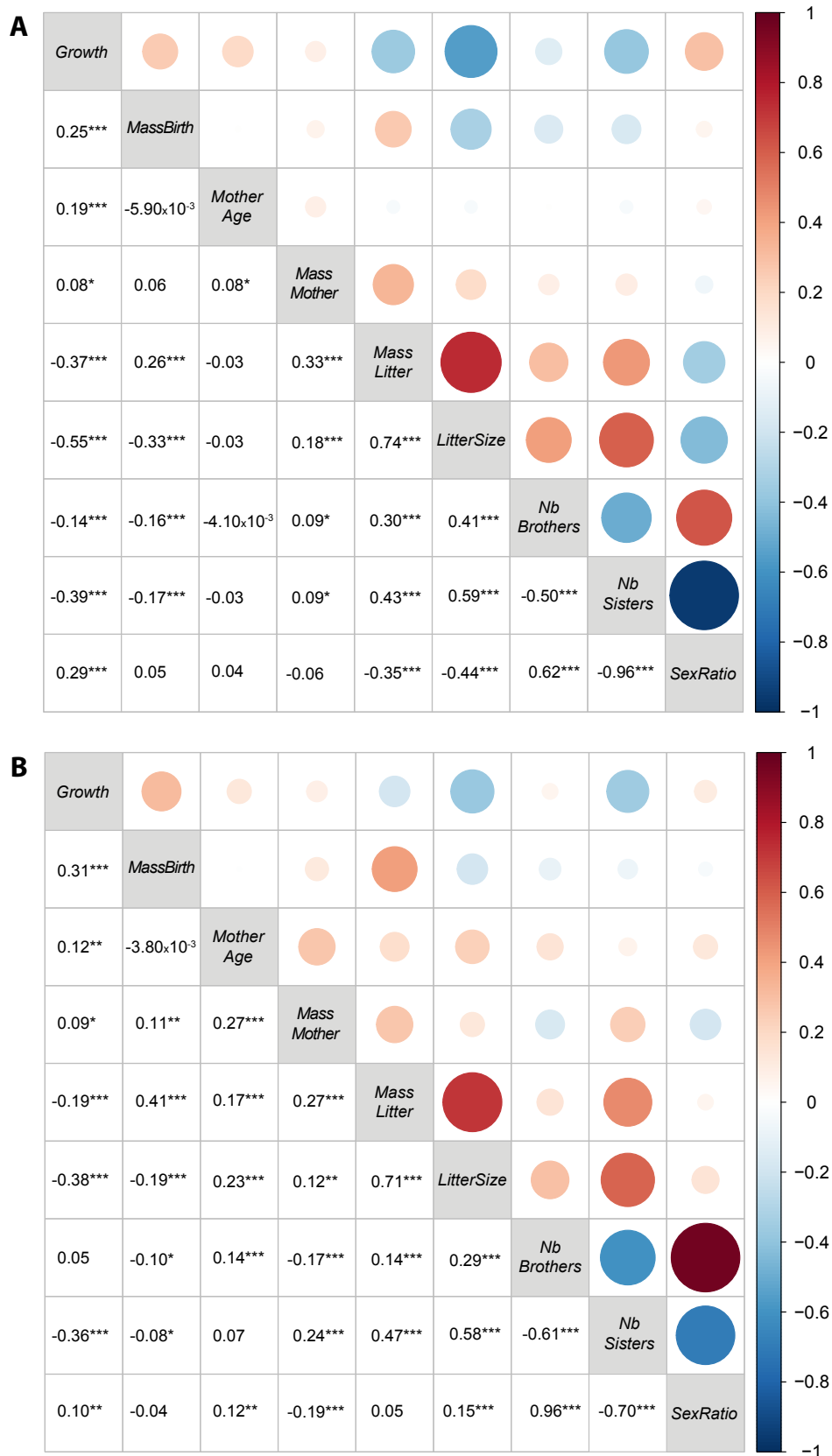


FIGURE 3.2 – Correlation matrixes of the quantitative covariates describing growth and early-life environment, for males (A) and females (B). (Lower panel) Correlation coefficients and significance symbolized by : 0-0.001 '\*\*\*'; 0.001-0.01 '\*\*'; 0.01-0.05 '\*'; 0.05-0.1 '.'. (Upper panel) Correlogram. Each circle's size is proportional to the corresponding correlation coefficient. Negative correlations are represented in blue and the positive ones in red.

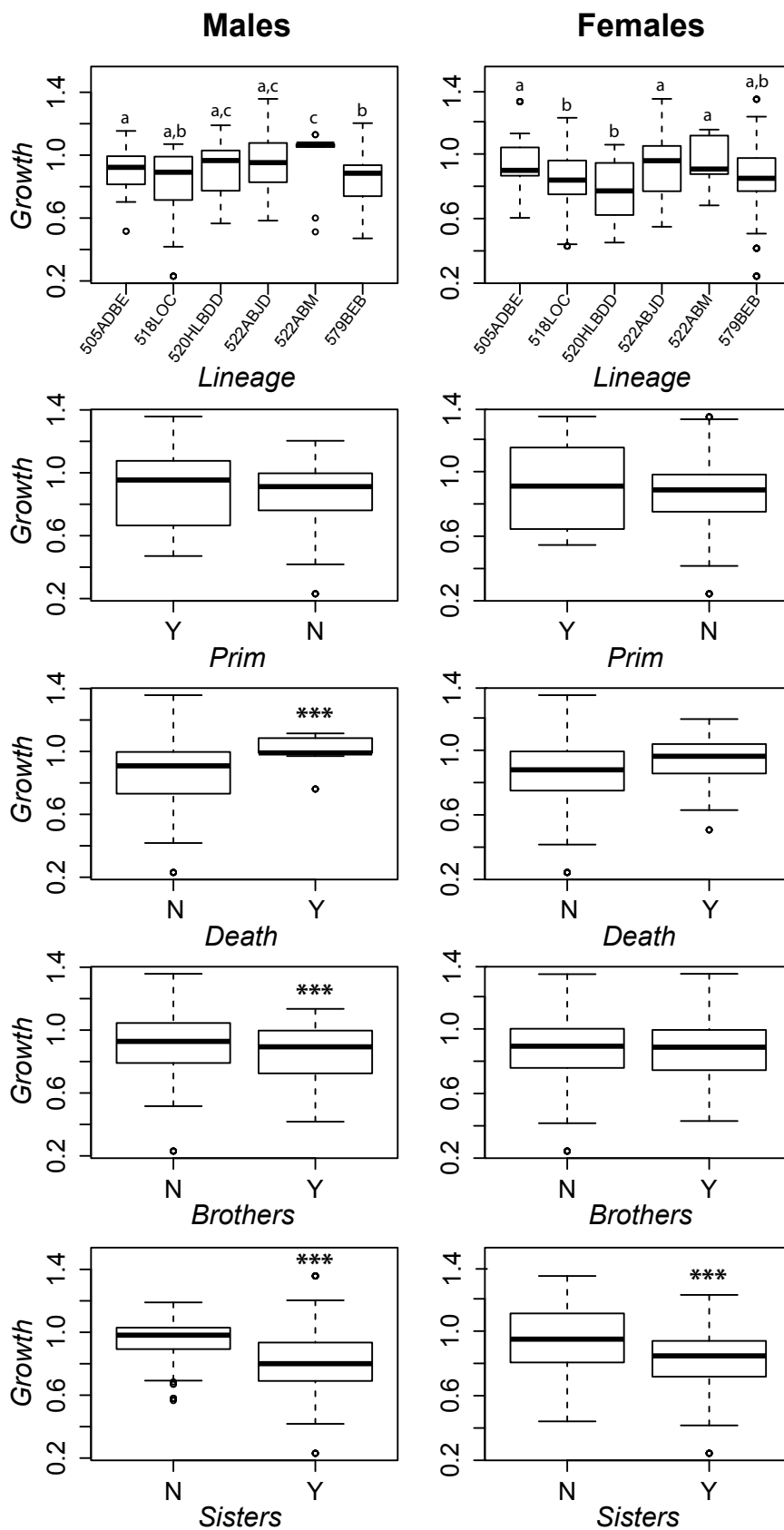


FIGURE 3.3 – Growth rate for the qualitative covariates that describe early-life environment, for males and females. "Y" and "N" stand for "Yes" and "No" respectively. The letters correspond to the groups that do not differ and the stars means that the groups are very significantly different from Wilcoxon tests.



## Statistical analyses

We used event history analysis to study the effect of the covariates on age-specific mortality hazard, a measure of the propensity to fail (here, to die) as a function of individual's age (Lee & Go 1997). These methods allow to use all data (censored and truncated included). They also allow accounting for the periodicity of the mouse lemurs' mortality resulting from their seasonality.

We used semi-parametric Cox's proportional hazard models, a flexible method that assumes that the effect of the covariates is proportional to the baseline mortality level at all ages (i.e. PH hypothesis; Klein & Moeschberger 2003). The analyses were performed on males and females independently because : (i) mortality trajectories over age have been proved to vary between sexes (Landes *et al.* Submitted); and (ii) growth rate do not vary according to sex, so we do not expect any difference in its effect on mortality in males and females. Preliminary analyses also showed that Season is involved in complex interactions with the other covariates. Hence, we analyzed separately mortality in LD and SD. Growth and early-life conditions may affect mortality over a restricted period of life (e.g. only at old ages). Thus, we performed our analyses on all adult life (from entrance in their second SD season, 'SD2', when fully grown and mature), on young adult life only (from entrance in SD2 and censored at 3.5 years old) and on late adult life (truncated at 3.5 years-old). The threshold age of 3.5 years-old was chosen because it corresponds to the life expectancy of individuals alive at their entrance in SD2 period; Landes *et al.* Submitted). Analyses on late adult life were possible only in females for LD periods because of the insufficient number of individuals that died after 3.5 years-old.

We analyzed the effects of growth, maternal effects and the effects of litter's characteristics on adult mortality independently. We first constructed the univariate models including each one of the covariates separately. After AIC based selection (Burnham & Anderson 1998), each unselected covariate was added independently to the retained models (which  $\Delta AIC \leq 2$ ) to verify that its effect was negligible. This procedure was repeated until no new covariate could improve the statistical support (AIC) of the best model. Cox models were performed using the 'coxph' function from the 'survival' package for 'R', except those including *Frailty* or *MatId* for whose we used the 'cph' function from the 'rms' package (Therneau 2015; Harrell 2015; R Core Team 2013). Highly correlated covariates were never included in the same models during the covariate selection procedure (e.g. *Sisters* and *NbSisters*).

## Results

### Effect of mass at birth and postnatal growth on adult mortality

Regarding the males, all the 82 tested Cox models converged. When considering all the adult life or young adults only, the best model describing mortality in LD over age (verified the PH hypothesis except for analyses on young adult life where a slight deviation from the PH is detected) included only an effect of *YearBirth* (Table 3.1 and 3.2). However, when taking into account SD periods only, the best Cox model (verified the PH hypothesis) also incorporated the effects of *Growth* (almost significant) and  $\Delta.SR$ . The effect of *Growth* is not significant but tends to impact negatively mortality ; the males that grow faster seem to exhibit a lower early adult mortality (before 3.5 years-old) in SD.

Concerning females, all the 87 tested Cox models converged. According to the best models (verified the PH hypothesis), mortality in SD periods depends only on year effects (*YearBirth* or *YearObs*), overall the adult life or for young adults only (Table 3.1 and 3.2). In LD periods, no tested covariate was selected when considering these two life periods. After 3.5 years old, the selected model included the effects of *Growth* and *MassBirth* (but not their interaction ; almost significant) on mortality. Among females living older than the average lifespan, the faster female grew, and the heavier their mass at birth, the older they would die.

### Mother effects on adult mortality

No mother effect was evidenced on adult mortality. Regarding the males, among the 102 tested Cox models, 16 did not converge (all including *MatId*). When considering all the adult life or early adult life, the best models describing mortality both in LD and in SD over age (respected the PH hypothesis) included only adjustment covariates (*YearBirth* and  $\Delta.SR$  and *YearObs* respectively ; Table 3.1 and 3.2).

Concerning females, among the 111 tested Cox models, 20 did not converge (all including *MatId*). Regarding adult mortality in LD, no maternal effect was observed neither, considering all adult life, early as well as late adult life (Table 3.1 and 3.2). The selected models were the null models. In SD, however, mortality tends to be positively impacted by *MotherAge* (almost significant ; Table 3.1 and 3.2), over all their adult life and when considering early adult life only. The best models (respected the PH hypothesis) also included an effect of *YearBirth*. When their mother is more aged, females tends to exhibit a higher mortality in SD periods.

### Effect of early-life environment on adult mortality

Regarding the males, among the 227 tested Cox models, all converged. The only selected effect of early-life environment was a non-significant negative effect of *Prim* in LD overall adult life (best models respected the PH hypothesis).

In females, among the 263 tested Cox models, all converged. Characteristics of the litter have consequences on adult mortality in LD but not SD periods (best models respected the PH hypothesis). When considering all the adult life, in LD periods, having one or more sister(s) has a negative effect on mortality (Table 3.1 and 3.2). In other words, when a female is not the only female in the litter, its

TABLE 3.1 – Estimation of the coefficients corresponding to the effects of the covariates describing growth, maternal effects and the characteristics of the litter on mortality from the best Cox models, for males and females and for each season independently. The analyses considered either all adult life (from the entrance in SD2 period to death or censoring; "Life"), young adult life (from the entrance in SD2 to 3.5 years old; "Young"), or late life (from 3.5 years old to death or censoring; "Old"). For the adjustment covariates, the reported coefficients are averaged from their estimations by the three models. Significance is symbolized such as : 0-0.001 '\*\*\*'; 0.001-0.01 '\*\*'; 0.01-0.05 '\*'; 0.05-0.1 '.'. Reference levels are "Medium years" for *YearBirth* and *YearObs*, and "No" for *Sisters*, *Brothers*, *Deaths* and *Prim*.

	Growth		Maternal effects		Litter's characteristics			Adjustment covariates (mean)			
	<i>Growth</i>	<i>MassBirth</i>	<i>MotherAge</i>	<i>Sisters</i>	<i>SexRatio</i>	<i>Deaths</i>	<i>Prim</i>	<i>Frailty</i>	$\Delta$ . <i>SR</i>	<i>YearBirth</i>	<i>YearObs</i>
<b>Males</b>											
LD	Life						-18.97			2.19**	
	Young									2.24**	
SD	Life								-25.13*	2.67**	
	Young	-3.03.								2.38**	
<b>Females</b>											
LD	Life				-0.98*						
	Young					2.37*					
	Old	2.15.					3.99***				
		-0.34.							-0.05.		
SD	Life		0.54.							2.16**	
	Young		0.55.							2.35**	2.03**

TABLE 3.2 – Summary table of the effects of growth, maternal effects and early-life environment on adult mortality, and the biological mechanisms associated to the covariates. In case of possible effects, i.e. included in the selected models but with no significant effect, the direction is indicated as (+) and (-) for positive and negative effects respectively.

Covariate	Captured biological mechanisms	Effect on mortality	
		Males	Females
<b>Growth</b>			
<i>Growth</i>	Maternal allocation, individual's quality, individual's investment in growth	Possible (-) (Young, SD)	Possible (+) (Old, LD)
<i>MassBirth</i>	Maternal allocation	None	Possible (-) (Old, LD)
<b>Maternal effects</b>			
<i>MatID</i>	Genetic/epigenetic	None	None
<i>Lineage</i>	Genetic/epigenetic	None	None
<i>MotherAge</i>	Mother's reproductive senescence, care learning	None	Possible (+) (SD)
<i>MassMother</i>	Mother's quality, resources available for the litter	None	None
<b>Litter's characteristics</b>			
<i>LitterSize</i>	Mother's allocation, siblings' competition	None	None
<i>NbBrothers</i>	Mother's preferential allocation	None	None
<i>NbSisters</i>	Mother's preferential allocation	None	None
<i>Brothers</i>	Mother's preferential allocation	None	None
<i>Sisters</i>	Mother's preferential allocation	None	Negative (LD)
<i>SexRatio</i>	Mother's preferential allocation	None	Positive (Young, LD)
<i>MassLitter</i>	Mother's allocation	None	None
<i>Deaths</i>	Mother's allocation	None	Positive (Old, LD)
<i>Prim</i>	Mother's reproductive senescence, care learning	Possible (-) (LD)	None

mortality is higher than if it is alone or has only one or more brother(s). When considering only early adult life, in LD, our best model included a positive effect of *SexRatio* on mortality (Table 3.1 and 3.2). A high *SexRatio* corresponds to a litter composed mostly by males. For females, a litter with a high *SexRatio*, and thus brothers, results in higher mortality. Finally, in late adult life, in LD periods, mortality is affected by *Death* and potentially *Frailty* (almost significant ; Table 3.1 and 3.2). When a pup dies during its first days, the other females from its litter exhibit higher mortality in LD periods when they are aged.

## Discussion

Globally, we did not detect any effect of growth rate or early-life conditions on adult mortality. Under optimal growth conditions, growing bears therefore no cost for the mouse lemurs. These results, along with the ones from Chapter 2.1, support the hypothesis of an environment-dependance of the trade-offs between life-history traits.

When looking at the sex- and age- specific effects of growth rate on mortality, we observe non-significant tendencies. The effect of early growth is not significant but is taken into account in selected models. We discuss here the tendencies. Growth rate would negatively impact young males' mortality in SD, but positively affect old females' mortality in LD. According to the life-history theory, a fast

growth leads to earlier death resulting from important allocation in growth over maintenance. This potential negative effect of growth on mortality would be observed in old females, which would support the presence of such trade-off in females. Growth would affect the mortality in LD seasons only. During SD, mouse lemurs use energy-saving mechanisms that enhance survival, maintenance and repair of the organism, which may protect the organism from the negative effect of growth. Growth would impact females' mortality after 3.5 years-old, when senescence is more important due to the accumulation of damages over the life. In males, at the opposite, growing fast would lead to lower mortality in SD periods during early adult life. This result would not support a trade-off between growth and maintenance, but rather suggest that a fast growth before their first SD season would allow the young males to be better prepared to the following SD periods. This effect would concern only the young adults (not detected by analyses on all life). Males died too young to allow us to perform analyses on late adult life only. It is therefore possible that old males would suffer from the cost of growth, in the same way as the old females. But why would the females not show any beneficial effect of growth on their SD survival at young ages? This may be linked to the fact that females fatten faster than males (Schmid 1999). Even slowly growing females may have enough time to anticipate the following SD seasons.

However, we found an effect of early-life environment on the mortality of females in LD. The composition of the litter in terms of sex-ratio impacts females' mortality in LD when adult. Overall their life, they exhibit lower mortality in LD if they have one or several sister(s). Moreover, females' mortality increases in LD when young adults, when their litter's sex-ratio increases (i.e. with increasing number of brothers). Because the differences in mortality reflects quality and maternal allocation, and because males do not seem to be sensitive from the composition of their litter, these results support the fact that mothers allocate more to their young males, at the expense of the females. But it also evidence that having more than one female promotes maternal allocation to all the young females. It is also possible that intra-litter competition is responsible from individual's quality when adult, in addition to directed maternal allocation. In that case, between-sisters competition may be lighter than sister-brother competition for the mother's resources. When considering only late adult life, females' mortality is higher in LD for individuals that lost a brother or sister during the first days after their birth. The presence of death in the litter may reflect a poor quality of the mother or of the litter, which could have this long-term deleterious effect.

Our analyses detected no effect of the characteristics of the mother (identity, lineage or mass after giving birth), except a positive effect of the mother's age when giving birth on the mortality of females in SD seasons. The more a mother is aged when it reproduces, the more its female offspring dies in SD when adult. This could reflect a reproductive senescence of the mothers with a decreasing ability to produce high quality offspring. This pattern is not observed in males, which could be due to the sex-biased allocation from the mothers towards their male offspring. The fact that only mortality in SD is affected in females emphasizes the different energetic strategies used during the two seasons by mouse lemurs. For example, MotherAge could affect the ability to maintain and repair the organism during SD periods.

In the literature, many studies evidence a cost of growth in natura or through experimental mani-

pulations. We show here that growth may bear no cost for the organism under favorable conditions (captivity where food and water are provided *ad libitum* and predation is absent). Moreover, showing a negative correlation between mortality and growth can in fact be the result from the effect of early-life conditions. The growth-maintenance trade-off is thus absent in optimal conditions, an early-life can have a direct impact on adult mortality.

## Conclusion

Nous avons mis en évidence une absence de coût de la croissance juvénile sur la survie future. La femelle microcèbe semble donc pouvoir allouer autant de ressources que nécessaire à la croissance de ses petits en conditions de captivité. En revanche, le contexte dans lequel les femelles juvéniles se développent a une influence sur leur mortalité adulte. Comme pour le chapitre précédent, cette étude rappelle que l'expression des compromis n'est pas systématique mais dépendante de la présence de contraintes environnementales.

La généralité de cette absence de compromis entre le développement initial et la mortalité adulte serait à vérifier dans de futures analyses prenant en compte l'ensemble de la croissance juvénile, et non pas uniquement la croissance pendant la période d'allocation maternelle. En effet, les conditions favorables de croissance pourraient limiter l'apparition d'hétérogénéité développementale entre individus, hétérogénéité qui ne s'exprimerait que lorsque la croissance des individus ne dépend plus que de leurs performances intrinsèques (c.-à-d. leur 'qualité'). Par ailleurs, notre analyse n'a porté que sur la mortalité adulte, c'est-à-dire sur les individus encore vivants à l'entrée dans leur seconde période de SD. Nous n'avons donc pas pu tester l'existence d'un compromis s'exprimant à court terme sur la mortalité aux jeunes âges. Cette analyse serait à reproduire sur l'intégralité du suivi des individus, sans cette troncature.

# Discussion générale

## Captivité et compromis entre traits d'histoire de vie

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les déterminants de la mortalité chez une espèce maintenue en captivité, et nous avons montré une absence de compromis entre allocation à la reproduction et survie. C'est également le cas pour plusieurs autres espèces de mammifères et d'oiseaux, qui ne montrent pas de lien entre reproduction et longévité en captivité (Ricklefs & Cadena 2007). La captivité s'accompagne d'une disponibilité alimentaire non limitante et d'un allègement de la mortalité extrinsèque (p. ex. prédation, transmission de pathogènes). Une première question générale est donc : l'absence de compromis serait-elle la conséquence de cette absence de pressions environnementales, théoriquement à l'origine des compromis ?

Cette question est importante car l'origine des mécanismes sous-jacents aux compromis observés *in natura* est débattue depuis plus de trois décades : (i) des contraintes biologiques fonctionnelles (par exemple, chez l'humain, l'accouchement est lié à une forte mortalité des mères du fait de l'anatomie du bassin ; Rosenberg & Trevathan 2005) ; (ii) la variance génétique (par exemple issue d'un polymorphisme génétique favorisant la reproduction précoce au détriment de la survie tardive, c.-à-d. les phénomènes de pléiotropie antagoniste ; Flatt & Promislow 2007) ; (iii) l'allocation interne aux différentes fonctions selon la disponibilité des ressources environnementales (stratégies d'acquisition-allocation ; van Noordwijk & de Jong 1986). Si des ressources non-limitées et des pressions environnementales allégées entraînent une disparition des compromis, cela suggère que ces compromis sont en fait dépendants de l'environnement.

Il est en outre attendu que cette variabilité des compromis réalisés en fonction des conditions environnementales soit particulièrement cruciale chez les organismes saisonniers tels que le microcèbe. Exposés à des fluctuations environnementales importantes, il est en effet important pour ces organismes d'ajuster finement leur allocation aux différentes fonctions selon les conditions extérieures. Lorsque les ressources sont peu limitantes, ils pourraient parvenir à allouer suffisamment de ressources tant à la fonction reproductrice qu'à la maintenance et la survie. Cette hypothèse est à mettre en regard des développements récents concernant la robustesse ou la labilité des traits démographiques d'une espèce aux fluctuations de l'environnement (Koons *et al.* 2009). Certaines espèces optimiseraient leur valeur sélective en permettant à leur fécondité ou leur survie de larges fluctuations dans le temps alors que d'autres, au contraire, ont un avantage à maintenir leur survie et leur fécondité les plus indépendantes possibles des fluctuations environnementales. L'apport de cette théorie à la détection et la compréhension des compromis entre traits d'histoire de vie n'a, à notre connaissance, jamais été



étudié. Pourtant, une étude récente a montré que, dans le cas d'une population d'océanites de Monteiro (*Oceanodroma monteiroi*), le compromis entre reproduction et survie future n'est détecté que les années où les conditions environnementales sont favorables à la reproduction (Robert *et al.* 2015). Les compromis entre traits d'histoire de vie semblent donc, non seulement dépendants des conditions environnementales, mais pourraient être perçus comme une stratégie adaptative à ces fluctuations.

En plus de la non-limitation des ressources, la captivité réduit fortement la mortalité extrinsèque, en particulier grâce à une absence de prédation et une faible transmission de pathogènes. La mortalité extrinsèque peut être une pression particulièrement importante sur les traits d'histoire de vie. Il est déjà connu, par exemple, que la prédation a un effet sur l'âge et la taille à la maturité chez plusieurs espèces (Abrams & Rowe 1996). La mortalité extrinsèque peut également jouer sur la présence ou l'absence de compromis, comme chez l'eider à duvet (*Somateria mollissima*), chez qui la taille des portées a un effet négatif sur la survie uniquement en présence d'un pathogène (Descamps *et al.* 2009). Les compromis entre traits d'histoire de vie seraient donc conditionnés par les risques de mortalité extrinsèque, avec une allocation différentielle aux fonctions biologiques dépendantes de la force de ces pressions. La mortalité extrinsèque est particulièrement importante chez les petits mammifères en période de reproduction. Les microcèbes mâles sont très sensibles à la prédation durant la période de reproduction (Kraus *et al.* 2008). Chez cette espèce solitaire, la période de reproduction est également la période de plus forte exposition aux parasites, notamment du fait du système de reproduction polygynandrique (Nunn *et al.* 2015).

Pour comprendre si c'est la non-limitation des ressources ou l'absence de mortalité extrinsèque qui explique l'absence de compromis reproduction / survie dans les études en captivité (telles que la nôtre), une première approche serait de mettre en place une expérience de restriction calorique à moyen terme sur des femelles. Ce type de paradigme expérimental est déjà mis en œuvre sur les microcèbes (Dal-Pan *et al.* 2011 ; Marchal *et al.* 2013). Si la restriction calorique restaure des coûts de la reproduction ou de la croissance postnatale en termes de survie, cela démontrerait que la limitation des ressources est suffisante pour expliquer l'existence de compromis, et que ce compromis ne s'exprimerait donc que dans des conditions défavorables (limitantes). Dans la nature, ces compromis s'exprimeraient chez la majeure partie des individus, vu qu'il est probable que les animaux sauvages soient majoritairement en condition de ressources limitées. A défaut, si la restriction calorique ne restaure pas le compromis reproduction / survie, cela signifierait soit que la ressource limitante n'est pas l'énergie (p. ex., plutôt des nutriments ; Vuarin & Henry 2014), soit que la mortalité extrinsèque (prédation, parasitisme) génère les compromis.

Des résultats préliminaires chez le microcèbe murin suggèrent que c'est bien la limitation des ressources qui génère le compromis reproduction / survie chez cet organisme. Des femelles ont été soumises soit à une disponibilité alimentaire 'contrôle' (proche de l'*ad libitum*), soit à une restriction calorique prolongée (réduction de 40% en comparaison aux femelles contrôles) depuis le début de l'hiver précédant la période de reproduction jusqu'à la fin de l'élevage des jeunes (Expérience 1 de Canale *et al.* 2012). Cette expérience a montré que les femelles maintenaient un effort reproducteur initial (gestation) similaire entre traitements (bien que minimisant la polyandrie ; Huchard *et al.* 2012), mais par contre qu'elles allouaient moins de ressources à la croissance de leurs jeunes (lactation) en

situation de restriction calorique. Le sevrage intervient environ huit jours plus tôt chez les portées dépendant de mères en restriction calorique que chez les portées contrôles. Et après le sevrage, les jeunes issus de mères restreintes ont montré une croissance compensatoire de condition corporelle (et non pas de taille) marquée (Canale *et al.* 2012). Cinq ans plus tard, 82% des individus dont la mère a été nourrie *ad libitum* sont en vie contre 30% des individus dont la mère était restreinte ( $\chi^2(1) = 6,03$ ,  $P = 0,014$ ; C. I. Canale *et al.*, données non publiées). La restriction calorique des mères serait donc suffisante pour restaurer un compromis entre croissance postnatale et survie des descendants.

## Saisonnalité et compromis entre traits d'histoire de vie

Au cours du premier chapitre de ce travail de thèse, nous avons détecté une influence forte de la saisonnalité sur la mortalité. L'accélération de la fréquence d'alternance des saisons s'accompagne d'une accélération du vieillissement chez les microcèbes. Les implications de ce résultat ont déjà été discutées dans le chapitre correspondant (Chapitre 1). Mais ces résultats sont-ils généralisables aux autres espèces saisonnières ? Le microcèbe peut sembler être un organisme idéal pour tester cet effet de la saisonnalité sur la mortalité car il présente des états physiologiques très contrastés entre les saisons, avec une saison d'activité métabolique intense, et une autre caractérisée par un hypométabolisme et un engraissement important. Ces transitions saisonnières sont très flexibles, au moins d'un point de vue temporel, étant ajustées en fonction des contraintes alimentaires (p. ex. grâce à l'utilisation de la torpeur ; Canale & Henry 2011 ; Vuarin *et al.* 2013b ; Vuarin *et al.* 2015). Notre théorie basée sur les transitions fait l'hypothèse qu'il existe une transition physiologique entre saisons. Pour confirmer que ce sont bien les transitions qui sont responsables du coût physiologique proximal réduisant les chances de survie, une perspective serait d'appliquer le même protocole expérimental d'accélération du rythme saisonnier à des espèces avec peu ou pas de changements physiologiques majeurs entre saisons (donc peu ou pas de transitions). Selon notre théorie, l'effet du rythme saisonnier sur la mortalité devrait faiblir avec la diminution de l'écart entre états physiologiques saisonniers. Des espèces à moindre saisonnalité physiologique pourraient être de petits mammifères homéothermes, qui ont donc une plus faible amplitude de variation métabolique entre saisons, voire des animaux de milieux tropicaux humides, écosystèmes dans lesquels la saisonnalité des ressources pourrait être moindre qu'aux latitudes élevées et que dans les écosystèmes tropicaux secs.

Une autre perspective pour explorer le champ de validité de notre théorie serait de procéder au traitement expérimental inverse : ralentir (au lieu d'accélérer) le rythme saisonnier. Des transitions saisonnières moins fréquentes devraient entraîner une diminution de la mortalité. Toutefois, l'exposition de microcèbes à un rythme saisonnier de 1.3 saisons par an (soit des saisons de 9.3 mois chacune) n'a pas induit de ralentissement flagrant de leur vieillissement biologique relativement aux autres traitements expérimentaux (Pifferi *et al.* 2015). Si ce résultat préliminaire est reproductible (et reproduit sur un nombre d'individus suffisant pour conclure à une absence d'effet sur la mortalité), cela soulève une question importante : pourquoi la mortalité n'est affectée que par une accélération du rythme saisonnier, et pas par son ralentissement ?

## Flexibilité saisonnière et compromis entre traits d'histoire de vie

Dans le Chapitre 1.1, nous avons mis en évidence que l'augmentation de la mortalité due à l'accélération du rythme saisonnier s'accompagne d'une accélération de la perte de la saisonnalité des fluctuations de masse chez les microcèbes mâles. La masse fluctue entre les saisons (engraissement automnal), ce qui contribue à permettre aux microcèbes de survivre à la saison sèche (voir Introduction). C'est un marqueur physiologique de la réponse de l'organisme à la saisonnalité chez cette espèce, et l'amplitude de l'engraissement automnal diminue au cours du vieillissement chez les individus en rythme saisonnier naturel (voir Introduction). Plusieurs mécanismes physiologiques sont dépendants de la masse dans cette espèce, comme l'entrée en torpeur (p. ex. Vuarin *et al.* 2013a).

L'amplitude de l'engraissement saisonnier pourrait être un indicateur de la sensibilité physiologique individuelle à la saisonnalité. Mais est-ce que cette flexibilité de la saisonnalité physiologique des microcèbes est impliquée dans un compromis avec la survie ? En d'autres termes, les individus qui investissent le plus dans leurs transitions saisonnières (ceux qui engraisent le plus) vieillissent-ils plus vite que les individus avec une moindre saisonnalité de la masse (qui engraisent peu) ? Différentes stratégies physiologiques semblent d'ailleurs coexister dans les populations naturelles de microcèbes pour survivre à la saison sèche, et se reproduire juste après. Il y aurait un gradient entre des individus engraisant fortement et utilisant intensivement la torpeur (en particulier chez les femelles), et d'autres qui engraisent peu, utilisent moins la torpeur et maintiennent une activité de prospection alimentaire tout au long de la saison sèche (en particulier chez les mâles ; Vuarin *et al.* 2015). Ces différentes stratégies saisonnières physiologiques sont-elles associées à des équilibres différents entre investissement reproducteur et maintenance de l'organisme (survie) ? Pour répondre à cette question, les fluctuations saisonnières de masse pourraient être utilisées comme marqueur de la vitesse du vieillissement biologique et du rythme de vie. Une première étape serait d'étendre le modèle de référence pour la mortalité calibré au cours de cette thèse, en y incluant l'effet de l'amplitude des changements de masses saisonniers sur la trajectoire de mortalité des individus. Cela révélerait s'il semble y avoir un gradient intra-spécifique « vie courte – vie rapide » associé à l'intensité de la saisonnalité physiologique. Cette question était l'un des thèmes fondateurs du présent projet de thèse, mais elle n'a pu être étudiée dans le temps imparti.

## Coût de la reproduction et de la croissance

Nous n'avons détecté ni coût de la reproduction, ni coût de la croissance sur la mortalité. Ces résultats sont robustes et l'absence de coût de la reproduction est détectée à la fois par l'analyse du suivi démographique des individus et la description expérimentale de l'effet de la reproduction sur un marqueur proximal du vieillissement physiologique.

De nombreuses études qui ont mis en évidence des coûts de la reproduction ont été faites en milieu naturel, où les ressources sont a priori limitantes et la mortalité extrinsèque élevée. Dans ces conditions, un organisme peut en théorie ne pas avoir d'allocation optimale vers ses différentes fonctions biologiques, entraînant l'émergence de compromis et de coûts de la reproduction. La sur-représentation des études mettant en évidence des coûts de la reproduction par rapport à celles qui

n'en détectent pas, pourrait être liée au fait que la majorité des études sont faites en milieu naturel.

D'autre part, de nombreuses études démontrant la présence des coûts de la reproduction s'appuient sur des manipulations expérimentales de l'effort de reproduction, par exemple en empêchant des individus de se reproduire (p. ex. en utilisant la contraception ; Gélén *et al.* 2015) ou en manipulant l'intensité des soins parentaux via des modifications du nombre de jeunes (p. ex. Koivula *et al.* 2003 ; Santos & Nakagawa 2012 ; Boonekamp *et al.* 2014 ; Plumel *et al.* 2014). De même, les coûts de la croissance sont surtout connus à travers des études de l'effet de la croissance compensatoire après une restriction calorique en début de vie (Dmitriew 2011 ; Marcil-Ferland *et al.* 2013). Au final, relativement peu d'études ont détecté ces compromis sur des individus non manipulés, ce qui pose la question de l'importance de ces compromis dans des environnements auxquels sont adaptés les organismes. Par exemple, les études en nature portant sur les effets des performances reproductrices en début de vie sur les reproductions futures et la survie ont donné des résultats variables (pas de relation, relation positive ou négative) selon les espèces, ou au sein d'une même espèce selon les études, les traits étudiés ou les caractéristiques des individus (Lemaître *et al.* 2015). Il demeure important de comprendre les mécanismes responsables de l'expression de compromis entre traits d'histoire de vie, et de caractériser les déterminants intrinsèques responsables du fait que les compromis sont détectés dans certaines conditions et pas d'autres.

Une hypothèse alternative à l'absence de coûts de la reproduction serait une spécificité de la reproduction chez les microcèbes femelles. Elles pourraient subir des pressions de sélection responsables de l'émergence de mécanismes de contrôle des coûts de la reproduction ou de réparation de l'organisme particulièrement efficaces. Nous pouvons par exemple émettre l'hypothèse que l'absence d'effet de la reproduction et de la croissance sur la survie des femelles microcèbe soit liée à leur utilisation de la torpeur en période hivernale. En effet, les mammifères hétérothermes utilisent des mécanismes de réparation et de maintenance de l'organisme pendant la période d'hypométabolisme (Stuart & Brown 2006 ; Turbill *et al.* 2012 ; Turbill *et al.* 2013). Les dommages accumulés pendant la saison d'activité (reproduction, croissance, engraissement automnal) pourraient être réparés au cours de la saison d'inactivité. Il serait intéressant d'étudier conjointement ces compromis et les mécanismes physiologiques associés (p. ex. des marqueurs de stress oxydatifs ou la dynamique des longueurs de télomères) tout au long du cycle annuel, pour mettre en évidence une éventuelle balance entre des dommages lors de la saison de reproduction, et une maintenance, voire une réparation des dommages, au cours de la période d'hypométabolisme, en hiver (étudié actuellement au laboratoire par J. Terrien, comm. perso.).

# Références bibliographiques

- Aalen O.O., Borgan Ø., Gjessing H.K. (2008) *Survival and event history analysis - A process point of view*. Springer New York.
- Abrams P.A., Rowe L. (1996) The effects of predation on the age and size of maturity of prey. *Evolution*, **50**, 1052–1061.
- Andrès M., Solignac M., Perret M. (2003) Mating system in mouse lemurs: theories and facts, using analysis of paternity. *Folia Primatologica*, **74**, 355–366.
- Aubry L.M., Cam E., Koons D.N., Monnat J.Y., Pavard S. (2010) Drivers of age-specific survival in a long-lived seabird: contributions of observed and hidden sources of heterogeneity. *The Journal of animal ecology*, **80**, 375–83.
- Aujard F., Dkhissi-Benyahya O., Fournier I. *et al.* (2001) Artificially accelerated aging by shortened photoperiod alters early gene expression (Fos) in the suprachiasmatic nucleus and sulfatoxymelatonin excretion in a small primate, *Microcebus murinus*. *Neuroscience*, **105**, 403–12.
- Aujard F., Perret M., Vannier G. (1998) Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character? *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, **168**, 540–8.
- Aujard F., Vasseur F. (2001) Effect of ambient temperature on the body temperature rhythm of male gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *International Journal of Primatology*, **22**, 43–56.
- Barnes A.I., Partridge L. (2003) Costing reproduction. *Animal Behaviour*, **66**, 199–204.
- Beaulieu M., Reichert S., Le Maho Y., Ancel A., Criscuolo F. (2011) Oxidative status and telomere length in a long-lived bird facing a costly reproductive event. *Functional Ecology*, **25**, 577–585.
- Bergeron P., Careau V., Humphries M.M., Réale D., Speakman J.R., Garant D. (2011) The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Functional Ecology*, **25**, 1063–1071.
- Blair C., Heckman K.L., Russell A.L., Yoder A.D. (2014) Multilocus coalescent analyses reveal the demographic history and speciation patterns of mouse lemur sister species. *BMC Evolutionary Biology*, **14**, 1–12.
- Blount J.D., Vitikainen E.I.K., Stott I., Cant M.A. (2015) Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biological Reviews*, **44**, n/a–n/a.
- Boonekamp J.J., Salomons M., Bouwhuis S., Dijkstra C., Verhulst S. (2014) Reproductive effort accelerates actuarial senescence in wild birds: An experimental study. *Ecology Letters*, **17**, 599–605.
- Brock M.A. (1991) Chronobiology and aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, **39**, 74–91.

- Bronikowski A., Vleck D. (2010) Metabolism, body size and life span: A case study in evolutionarily divergent populations of the Garter Snake (*Thamnophis elegans*). *Integrative and Comparative Biology*, **50**, 880–887.
- Bronikowski A.M., Altmann J., Brockman D.K. *et al.* (2011) Aging in the natural world: Comparative data reveal similar mortality patterns across primates. *Science*, **331**, 1325–1328.
- Burnham K.P., Anderson D.R. (1998) *Model Selection and Inference: A Practical Information-theoretic Approach*. New-York.
- Canale C.I., Henry P.Y. (2011) Energetic costs of the immune response and torpor use in a primate. *Functional Ecology*, **25**, 557–565.
- Canale C.I., Huchard E., Perret M., Henry P.Y. (2012) Reproductive resilience to food shortage in a small heterothermic primate. *PloS one*, **7**, e41477.
- Canale C.I., Perret M., Théry M., Henry P.Y. (2011) Physiological flexibility and acclimation to food shortage in a heterothermic primate. *The Journal of experimental biology*, **214**, 551–60.
- Cayetanot F., Van Someren E.J.W., Perret M., Aujard F. (2005) Shortened seasonal photoperiodic cycles accelerate aging of the diurnal and circadian locomotor activity rhythms in a primate. *Journal of biological rhythms*, **20**, 461–9.
- Charmantier A., Perrins C., McCleery R.H., Sheldon B.C. (2006) Quantitative genetics of age at reproduction in wild swans: Support for antagonistic pleiotropy models of senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 6587–6592.
- Charnov E.L. (2002) Reproductive effort, offspring size and benefit-cost ratios in the classification of life histories. *Evolutionary Ecology Research*, **4**, 749–758.
- Charnov E.L., Berrigan D. (1993) Why do female primates have such long lifespans and so few babies? or Life in the slow lane. *Evolutionary Anthropology*, **1**, 191–194.
- Cole L.C. (1954) The population consequences of life history phenomena. *The Quarterly review of biology*, **29**, 103–137.
- Conner J.K. (2012) Quantitative genetic approaches to evolutionary constraint: How useful? *Evolution*, **66**, 3313–3320.
- Dal-Pan A., Terrien J., Pifferi F. *et al.* (2011) Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, **33**, 15–31.
- Dammhahn M., Kappeler P.M. (2008) Comparative feeding ecology of sympatric *Microcebus berthae* and *M. murinus*. *International Journal of Primatology*, **29**, 1567–1589.
- Dausmann K.H. (2014) Flexible patterns in energy savings : heterothermy in primates. *Journal of Zoology*, **292**, 101–111.
- Descamps S., Gilchrist H.G., Bêty J., Buttlar E.I., Forbes M.R. (2009) Costs of reproduction in a long-lived bird: large clutch size is associated with low survival in the presence of a highly virulent disease. *Biology letters*, **5**, 278–81.
- Dmitriew C.M. (2011) The evolution of growth trajectories: what limits growth rate? *Biological Reviews*, **86**, 97–116.

- Doblhammer G., Vaupel J.W. (2001) Lifespan depends on month of birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 2934–9.
- Dowling D.K., Simmons L.W. (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **276**, 1737–45.
- Eberle M., Kappeler P.M. (2004a) Selected polyandry: female choice and inter-sexual conflict in a small nocturnal solitary primate (*Microcebus murinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57**, 91–100.
- Eberle M., Kappeler P.M. (2004b) Sex in the dark: determinants and consequences of mixed male mating tactics in *Microcebus murinus*, a small solitary nocturnal primate. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57**, 77–90.
- Eberle M., Perret M., Kappeler P.M. (2007) Sperm competition and optimal timing of matings in *Microcebus murinus*. *International Journal of Primatology*, **28**, 1267–1278.
- Escobar L.a., Meeker W.Q. (2006) A Review of Accelerated Test Models. *Statistical Science*, **21**, 552–577.
- Fabian D., Flatt T. (2012) Life history evolution. *Nature Education Knowledge*, **3**, 24.
- Finkel T., Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239–247.
- Fischer K.E., Austad S.N. (2011) The development of small primate models for aging research. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, **52**, 78–88.
- Flatt T., Promislow D.E.L. (2007) Still pondering an age-old question. *Science*, **318**, 1255–1256.
- Gaillard J.M., Viallefont a., Loison a., Festa-Bianchet M. (2004) Assessing senescence patterns in populations of large mammals. *Animal Biodiversity and Conservation*, **27**, 47–58.
- Garcia-Segura L.M., Azcoitia I., DonCarlos L.L. (2001) *Neuroprotection by estradiol*, vol. 63.
- Garratt M., Vasilaki A., Stockley P., McArdle F., Jackson M., Hurst J.L. (2011) Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **278**, 1098–1106.
- Geiser F. (2004) Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor. *Annual Review of Physiology*, **66**, 239–274.
- Geiser F. (2013) Hibernation. *Current Biology*, **23**, 188–193.
- Gélin U., Wilson M.E., Coulson G., Festa-Bianchet M. (2015) Experimental manipulation of female reproduction demonstrates its fitness costs in kangaroos. *Journal of Animal Ecology*, **84**, 239–248.
- Génin F. (2007) Energy-dependent plasticity of Grey Mouse Lemur social systems: lessons from field and captive studies. *Revue d'Ecologie - La Terre et la Vie*, **62**, 245–256.
- Génin F., Perret M. (2000) Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs. *Physiology & behavior*, **71**, 315–21.
- Giroud S., Blanc S., Aujard F., Bertrand F., Gilbert C., Perret M. (2008) Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **294**, 1958–1967.

- Giroud S., Zahn S., Criscuolo F. *et al.* (2014) Late-born intermittently fasted juvenile garden dormice use torpor to grow and fatten prior to hibernation : consequences for ageing processes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **281**, 1–8.
- Gogarten J.F., Brown L.M., Chapman C.A. *et al.* (2012) Seasonal mortality patterns in non-human primates: implications for variation in selection pressures across environments. *Evolution*, **66**, 3252–3266.
- Gross M.R. (2005) The evolution of parental care. *The Quarterly review of biology*, **80**, 37–45.
- Gwinner E. (1986) *Circannual rhythms*. Berlin, Germany.
- Hämäläinen A., Dammhahn M., Aujard F. *et al.* (2014) Senescence or selective disappearance? Age trajectories of body mass in wild and captive populations of a small-bodied primate. *Proceedings of the Royal Society B*, **281**, 1–10.
- Hamel S., Côté S.D., Gaillard J.M., Festa-Bianchet M. (2009) Individual variation in reproductive costs of reproduction: high-quality females always do better. *Journal of Animal Ecology*, **78**, 143–151.
- Hanson M.a., Gluckman P.D. (2014) Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological reviews*, **94**, 1027–76.
- Harrell F.E.J. (2015) *rms: Regression Modeling Strategies*. R package version 3.3-1.
- Harshman L.G., Zera A.J. (2007) The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends in ecology & evolution*, **22**, 80–6.
- Horvitz C., Tuljapurkar S. (2008) Stage Dynamics, Period Survival, and Mortality Plateaus. *The American Naturalist*, **172**, 203–215.
- Huchard E., Canale C.I., Le Gros C., Perret M., Henry P.Y., Kappeler P.M. (2012) Convenience polyandry or convenience polygyny? Costly sex under female control in a promiscuous primate. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **279**, 1371–9.
- Hut R., Paolucci S., Dor R., Kyriacou C., Daan S. (2013) Latitudinal clines: an evolutionary view on biological rhythms. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **280**, 20130433.
- Jiang J., Rao J.S., Gu Z., Nguyen T. (2008) Fence methods for mixed model selection. *The Annals of Statistics*, **36**, 1669–1692.
- Johnson C.N. (1988) Dispersal and the sex ratio at birth in primates. *Nature*, **332**, 726–728.
- Jones O.R., Gaillard J.M., Tuljapurkar S. *et al.* (2008) Senescence rates are determined by ranking on the fast-slow life-history continuum. *Ecology letters*, **11**, 664–73.
- Jones O.R., Scheuerlein A., Salguero-Gómez R. *et al.* (2014) Diversity of ageing across the tree of life. *Nature*, **505**, 169–175.
- Kappeler P.M. (2000) Ecologie des microcèbes. *Primatologie*, **3**, 145–171.
- Kengeri S.S., Maras A.H., Suckow C.L., Chiang E.C., Waters D.J. (2013) Exceptional longevity in female Rottweiler dogs is not encumbered by investment in reproduction. *Age*, **35**, 2503–2513.
- King E.G., Roff D.A., Fairbairn D.J. (2011) Trade-off acquisition and allocation in *Gryllus firmus*: a test of the Y model. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**, 256–264.



- Kirkwood T. (1977) Evolution of ageing. *Nature*, **270**, 301–304.
- Klein J.P., Moeschberger M.L. (2003) *Survival Analysis - Techniques for censored and truncated data, 2nd ed.* Springer-Verlag, New York.
- Koivula M., Koskela E., Mappes T., Oksanen T. (2003) Cost of reproduction in the wild: manipulation of reproductive effort in the bank vole. *Ecology*, **84**, 398–405.
- Koons D.N., Pavard S., Baudisch A., Metcalf C.J.E. (2009) Is life-history buffering or lability adaptive in stochastic environments ? *Oikos*, **118**, 972–980.
- Kraus C., Eberle M., Kappeler P.M. (2008) The costs of risky male behaviour: sex differences in seasonal survival in a small sexually monomorphic primate. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **275**, 1635–44.
- Kraus C., Pavard S., Promislow D.E.L. (2013) The size-life span trade-off decomposed: why large dogs die young. *The American naturalist*, **181**, 492–505.
- Lahann P., Schmid J., Ganzhorn J.U. (2006) Geographic variation in populations of *Microcebus murinus* in Madagascar: Resource seasonality or Bergmann’s rule? *International Journal of Primatology*, **27**, 983–999.
- Landes J., Henry P.Y., Hardy I., Camarda C.G., Perret M., Pavard S. (????) Seasonal transitions: a major mortality risk for seasonal species. *Submitted*.
- Languille S., Blanc S., Blin O. *et al.* (2012) The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. *Ageing research reviews*, **11**, 150–62.
- Law R. (1979) Optimal life histories under age-specific predation. *American Naturalist*, **114**, 399–417.
- Lee E.T., Go O.T. (1997) Survival analysis in public health research. *Annual review of public health*, **18**, 105–134.
- Lee W.S., Monaghan P., Metcalfe N.B. (2013) Experimental demonstration of the growth rate–lifespan trade-off. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **280**, 20122370.
- Lee W.S., Monaghan P., Metcalfe N.B. (2015) Perturbations in growth trajectory due to early diet affect age-related deterioration in performance. *Functional Ecology*, pp. n/a–n/a.
- Lemaître J.F., Berger V., Bonenfant C. *et al.* (2015) Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **282**, 20150209.
- Lemaitre J.F., Gaillard J.M., Lackey L.B., Clauss M., Muller D.W. (2013) Comparing free-ranging and captive populations reveals intra-specific variation in aging rates in large herbivores. *Experimental gerontology*, **48**, 162–167.
- Leturque H., Rousset F. (2004) Intersexual competition as an explanation for sex-ratio and dispersal biases in polygynous species. *Evolution*, **58**, 2398–2408.
- Leung K.M., Elashoff R.M., Afifi A.A. (1997) Censoring Issues in Survival Analysis. *Annual Review of Public Health*, **18**, 83–104.
- Lindstrom J. (1999) Early development and fitness in birds and mammals.
- Liow L.H., Fortelius M., Lintulaakso K., Mannila H., Stenseth N.C. (2009) Lower Extinction Risk in Sleep-or-Hide Mammals. *The American Naturalist*, **173**, 264–272.

- López-Otín C., Blasco M.a., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, **153**, 1194–217.
- Lovegrove B.G. (2012) The evolution of endothermy in Cenozoic mammals : a plesiomorphic-apomorphic continuum. *Biological Reviews*, **87**, 128–162.
- Luckinbill L., Arking R., Clare M.J., Cirocco W., Buck S. (1984) Selection for Delayed Senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **38**, 996–1003.
- Lutermann H., Verburgt L., Rendigs A. (2010) Resting and nesting in a small mammal: sleeping sites as a limiting resource for female grey mouse lemurs. *Animal Behaviour*, **79**, 1211–1219.
- Madsen T., Shine R. (1994) Costs of reproduction influence the evolution of sexual size dimorphism in snakes. *Evolution*, **48**, 1389–1397.
- Maechler M., Rousseeuw P., Struyf A., Hubert M., Hornik K. (2015) *cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions*. R package version 2.0.3 — For new features, see the 'Changelog' file (in the package source).
- Marchal J., Dal-Pan a., Epelbaum J. *et al.* (2013) Calorie restriction and resveratrol supplementation prevent age-related DNA and RNA oxidative damage in a non-human primate. *Experimental Gerontology*, **48**, 992–1000.
- Marcil-Ferland D., Festa-Bianchet M., Martin A.M., Pelletier F. (2013) Despite catch-up, prolonged growth has detrimental fitness consequences in a long-lived vertebrate. *The American naturalist*, **182**, 775–85.
- Martin R. (2000) Origins, diversity and relationships of lemurs. *International Journal of Primatology*, **21**, 1021–1049.
- Martinussen T., Scheike T.H. (2006) *Dynamic Regression Models for Survival Data*. New York, USA.
- Mason G.J. (2010) Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**, 713–721.
- Maynard Smith J. (1958) The effects of temperature and of egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *Journal of Experimental Biology*, **35**, 832–842.
- McLean J.a., Speakman J.R. (2000) Effects of body mass and reproduction on the basal metabolic rate of brown long-eared bats (*Plecotus auritus*). *Physiological and biochemical zoology : PBZ*, **73**, 112–121.
- Melvin R.G., Andrews M.T. (2009) Torpor induction in mammals: Recent discoveries fueling new ideas. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **20**, 490–498.
- Michalakakis Y., Charmantier A., Gaillard J.M., Sorci G., Tully T., Ronce O. (2010) Evolution des traits d'histoire de vie. In *Biologie évolutive* (edited by F Thomas, T Lefèvre, M Raymond), chap. 10, pp. 339–386. De boeck s edn..
- Miller R., Harper J., Galecki A., Burke D. (2002) Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. *Aging cell*, **1**, 22–29.
- Mitchell G.W., Wheelwright N.T., Guglielmo C.G., Norris D.R. (2012) Short- and long-term costs of reproduction in a migratory songbird. *Ibis*, **154**, 325–337.
- Mittermeier R.A. (2010) *Lemurs of Madagascar*. Conservation International, 3rd edn..

- Mittermeier R.a., Ganzhorn J.U., Konstant W.R. *et al.* (2008) Lemur Diversity in Madagascar. *International Journal of Primatology*, **29**, 1607–1656.
- Møller A.P. (2007) Senescence in relation to latitude and migration in birds. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 750–757.
- Monaghan P., Haussmann M.F. (2006) Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 47–53.
- Monaghan P., Metcalfe N.B., Torres R. (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*, **12**, 75–92.
- Morris W.F., Doak D.F. (2004) Buffering of life histories against environmental stochasticity: accounting for a spurious correlation between the variabilities of vital rates and their contributions to fitness. *American Naturalist*, **163**, 579–90.
- Mousseau T.A., Fox C.W. (1998) The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, **13**, 403–407.
- Neveu H., Hafen T., Zimmermann E., Rumpler Y. (1998) Comparison of the genetic diversity of wild and captive groups of *Microcebus murinus* using the random amplified polymorphic DNA method. *Folia primatologica; international journal of primatology*, **69 Suppl 1**, 127–135.
- van Noordwijk A., de Jong G. (1986) The University of Chicago's Underpowered Campaign to Achieve Racial Diversity. *The American Naturalist*, **128**, 137–142.
- Nunn C.L., Craft M.E., Gillespie T.R., Schaller M., Kappeler P.M. (2015) The sociality–health–fitness nexus: synthesis, conclusions and future directions. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **370**.
- Nussey D.H., Baird D., Barrett E. *et al.* (2014) Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods in Ecology and Evolution*, **5**, 299–310.
- Nussey D.H., Pemberton J.M., Pilkington J.G., Blount J.D. (2009) Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Functional Ecology*, **23**, 809–817.
- Obeso J.R. (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, **155**, 321–348.
- Oldakowski L., Piotrowska Z., Chrzascik K.M., Sadowska E.T., Koteja P., Taylor J.R.E. (2012) Is reproduction costly? No increase of oxidative damage in breeding bank voles. *Journal of Experimental Biology*, **215**, 1799–1805.
- Partridge L., Gems D., Withers D.J. (2005) Sex and death: what is the connection? *Cell*, **120**, 461–472.
- Partridge L., Harvey P.H. (1985) Costs of reproduction. *Nature*, **316**, 20.
- Perret M. (1997) Change in photoperiodic cycle affects life span in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). *Journal of Biological Rhythms*, **12**, 136–145.
- Perret M. (2000) Reproduction saisonnière et succès reproducteur chez un prosimien malgache, *Microcebus murinus*. *Primatologie*, **3**, 45–84.
- Perret M. (2005) Relationship between urinary estrogen levels before conception and sex ratio at birth in a primate, the gray mouse lemur. *Human reproduction (Oxford, England)*, **20**, 1504–10.

- Perret M., Aujard F. (2001a) Daily hypothermia and torpor in a tropical primate: synchronization by 24-h light-dark cycle. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **281**, R1925–R1933.
- Perret M., Aujard F. (2001b) Regulation by photoperiod of seasonal changes in body mass and reproductive function in gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*): differential responses by sex. *International journal of primatology*, **22**, 5–24.
- Perret M., Aujard F. (2006) Vieillissement et rythmes biologiques chez les primates. *M/S: médecine sciences*, **22**, 279–283.
- Perret M., Colas S. (1997) Manipulation of sex ratio at birth and maternal investment in female mouse lemurs (*Microcebus murinus*, Primates). *Applied Animal Behaviour Science*, **51**, 275–283.
- Pifferi F., Aujard F., Perret M. (2015) L'horloge biologique est-elle au centre du processus de vieillissement ? Études chez un primate non humain. *Biologie Aujourd'hui*, **208**, 281–287.
- Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D., R Core Team (2015) *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-122.
- Plard F., Gaillard J.M., Coulson T. *et al.* (2015) Quantifying the influence of measured and unmeasured individual differences on demography. *Journal of Animal Ecology*, **84**.
- Plot V., Criscuolo F., Zahn S., Georges J.Y. (2012) Telomeres, Age and Reproduction in a Long-Lived Reptile. *PLoS ONE*, **7**, e40855.
- Plumel M.I., Stier A., Thiersé D., van Dorsselaer A., Criscuolo F., Bertile F. (2014) Litter size manipulation in laboratory mice: an example of how proteomic analysis can uncover new mechanisms underlying the cost of reproduction. *Frontiers in Zoology*, **11**, 41.
- Proaktor G., Coulson T., Milner-Gulland E.J. (2008) The demographic consequences of the cost of reproduction in ungulates. *Ecology*, **89**, 2604–11.
- Promislow D., Harvey P. (1990) Living fast and dying young: A comparative analysis of life-history variation among mammals. *Journal of Zoology*, **220**, 417–437.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing.
- Radespiel U., Cepok S., Zietemann V., E. Z. (1998) Sex-specific usage patterns of sleeping sites in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*) in northwestern Madagascar. *American journal of primatology*, **46**, 77–84.
- Radespiel U., Sarikaya Z., Zimmermann E., Bruford M.W. (2001) Sociogenetic structure in a free-living nocturnal primate population: Sex-specific differences in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **50**, 493–502.
- Reznick D. (1985) Costs of Reproduction: An Evaluation of the Empirical Evidence. *Oikos*, **44**, 257–267.
- Ricklefs R.E. (2008) The evolution of senescence from a comparative perspective. *Functional Ecology*, **22**, 379–392.
- Ricklefs R.E., Cadena C.D. (2007) Lifespan is unrelated to investment in reproduction in populations of mammals and birds in captivity. *Ecology letters*, **10**, 867–72.

- Ricklefs R.E., Scheuerlein A. (2001) Comparison of aging-related mortality among birds and mammals. *Experimental gerontology*, **36**, 845–57.
- Ricklefs R.E., Wikelski M. (2002) The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 462–468.
- Robert A., Bolton M., Jiguet F., Bried J. (2015) The survival – reproduction association becomes stronger when conditions are good. *Proceedings of the Royal Society B*, **282**.
- Rogers J., Gibbs R.A. (2014) Comparative primate genomics : emerging patterns of genome content and dynamics. *Nature*, **15**, 347–359.
- Rollo C.D. (2002) Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evolution & development*, **4**, 55–61.
- Rosenberg K., Trevathan W. (2005) Bipedalism and Human Birth: The Obstetrical Dilemma Revisited. *Evolutionary Anthropology*, **4**.
- Ross C. (1998) Primate life histories. *Evolutionary Anthropology*, pp. 54–63.
- Ruf T., Bieber C., Arnold W., Millesi E. (2012) *Living in a seasonal world. Thermoregulatory and metabolic adaptations*. Berlin.
- Ruf T., Geiser F. (2014) Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biological Reviews*, pp. 1–38.
- Santos E.S.A., Nakagawa S. (2012) The costs of parental care: a meta-analysis of the trade-off between parental effort and survival in birds. *Journal of evolutionary biology*, **25**, 1911–7.
- Schmid J. (1999) Sex-Specific Differences in Activity Patterns and Fattening in the Gray Mouse Lemur ( *Microcebus murinus* ) in Madagascar. *Journal of Mammalogy*, **80**, 749–757.
- Schmid J. (2001) Daily torpor in free-ranging gray mouse lemurs (*Microcebus murinus*) in Madagascar. *International Journal of Primatology*, **22**, 1021–1031.
- Schmid J., Kappeler P. (1998) Fluctuating sexual dimorphism and differential hibernation by sex in a primate, the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **43**, 125–132.
- Schmid J., Speakman J.R. (2000) Daily energy expenditure of the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*): a small primate that uses torpor. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, **170**, 633–41.
- Schmid J., Speakman J.R. (2009) Torpor and energetic consequences in free-ranging grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*): a comparison of dry and wet forests. *Die Naturwissenschaften*, **96**, 609–20.
- Schulz L.C. (2010) The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 16757–16758.
- Séguy M., Perret M. (2005) Factors affecting the daily rhythm of body temperature of captive mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, **175**, 107–15.
- Selman C., Blount J.D., Nussey D.H., Speakman J.R. (2012) Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends in ecology & evolution*, **27**, 570–7.

- Simmen B., Darlu P., Marcel C., Pasquet P. (2015) Physiology & Behavior Scaling of free-ranging primate energetics with body mass predicts low energy expenditure in humans. *Physiology & Behavior*, **138**, 193–199.
- Singh M. (2006) Progesterone-Induced Neuroprotection. *Endocrine*, **29**, 271–274.
- Speakman J.R. (2008) The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **363**, 375–398.
- Speakman J.R., Garratt M. (2014) Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays*, **36**, 93–106.
- Stearns S. (1989) Trade-offs in life-history evolution. *Functional ecology*, **3**, 259–268.
- Steinert S., White D.M., Zou Y., Shay J.W., Wright W.E. (2002) Telomere biology and cellular aging in nonhuman primate cells. *Experimental Cell Research*, **272**, 146–152.
- Stier A., Reichert S., Massemin S., Bize P., Criscuolo F. (2012) Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Frontiers in zoology*, **9**, 37.
- Stuart J.a., Brown M.F. (2006) Energy, quiescence and the cellular basis of animal life spans. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, **143**, 12–23.
- Sudyka J., Arct A., Drobniak S., Dubiec A., Gustafsson L., Cichoń M. (2014) Experimentally increased reproductive effort alters telomere length in the blue tit ( *Cyanistes caeruleus* ). *Journal of Evolutionary Biology*, **27**, 2258–2264.
- Tackney J., Cawthon R.M., Coxworth J.E., Hawkes K. (2014) Blood cell telomere lengths and shortening rates of chimpanzee and human females. *American Journal of Human Biology*, **26**, 452–460.
- Tarin J.J., Gomez-Piquer V., Garcia-Palomares S., Garcia-Perez M.A., Cano A. (2014) Absence of long-term effects of reproduction on longevity in the mouse model. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **12**.
- Terrien J., Zizzari P., Bluet-Pajot M.T. *et al.* (2008) Effects of age on thermoregulatory responses during cold exposure in a nonhuman primate, *Microcebus murinus*. *American Journal of ...*, **295**, 696–703.
- Thalib L., Doi S.A.R., Hall P. (2005) Multiple births and breast cancer prognosis: A population based study. *European Journal of Epidemiology*, **20**, 613–617.
- Therneau T. (2015) A Package for Survival Analysis in S.
- Tieleman B.I., Dijkstra T.H., Lasky J.R., Mauck R.a., Visser G.H., Williams J.B. (2006) Physiological and behavioural correlates of life-history variation: a comparison between tropical and temperate zone House Wrens. *Functional Ecology*, **20**, 491–499.
- Trochet D., Mergui X., Ivkovic I. *et al.* (2015) Telomere regulation during ageing and tumorigenesis of the grey mouse lemur. *Biochimie*, **113**, 100–110.
- Turbill C., Bieber C., Ruf T. (2011) Hibernation is associated with increased survival and the evolution of slow life histories among mammals. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **278**, 3355–63.

- Turbill C., Ruf T., Smith S., Bieber C. (2013) Seasonal variation in telomere length of a hibernating rodent. *Biology letters*, **9**.
- Turbill C., Smith S., Deimel C., Ruf T. (2012) Daily torpor is associated with telomere length change over winter in Djungarian hamsters. *Biology letters*, **8**, 304–7.
- Vaupel J., Manton K., Stallard E. (1979) The impact of heterogeneity in individual frailty on the dynamics of mortality. *Demography*, **16**, 439–454.
- Vaupel J.W., Carey J.R., Christensen K. *et al.* (1998) Biodemographic Trajectories of Longevity. *Science*, **280**, 855–860.
- Vaupel J.W., Yashin A.I. (1985) Heterogeneity's ruses: some surprising effects of selection on population dynamics. *The American Statistician*, **39**, 176–185.
- Vuarin P., Dammhahn M., Henry P.Y. (2013a) Individual flexibility in energy saving: body size and condition constrain torpor use. *Functional Ecology*, **27**, 793–799.
- Vuarin P., Dammhahn M., Henry P.Y. (2013b) Torpor-based compensation of energy shortage: a review of evidences from field experiments. *Integrative and Comparative Biology*, **53**.
- Vuarin P., Dammhahn M., Kappeler P.M., Henry P.Y., Henry P.Y. (2015) When to initiate torpor use ? Food availability times the transition to winter phenotype in a tropical heterotherm. *Oecologia*.
- Vuarin P., Henry P.Y. (2014) Field evidence for a proximate role of food shortage in the regulation of hibernation and daily torpor: a review. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, **184**, 683–97.
- Wang M.H., vom Saal F.S. (2000) Maternal age and traits of offspring. *Nature*, **407**, 469–470.
- Wiersma P., Walker A., Williams J.B. (2007) Tropical birds have a slow pace of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 1–6.
- Wilkinson G.S., South J.M. (2002) Life history, ecology and longevity in bats. *Aging cell*, **1**, 124–131.
- Williams G.C. (1957) Pleiotropy, Natural-Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution*, **11**, 398–411.
- Wright P.C. (1999) Lemur traits and Madagascar ecology: coping with an island environment. *Yearbook of physical anthropology*, **42**, 31–72.
- Zera A.J. (2005) Intermediary Metabolism and Life History Trade-offs: Lipid Metabolism in Lines of the Wing-polymorphic Cricket, *Gryllus firmus*, Selected for Flight Capability vs. Early Age Reproduction. *Integrative and Comparative Biology*, **45**, 511–524.

# Annexe 1 - Production scientifique

## Articles scientifiques

### Soumis

**Julie Landes**, Pierre-Yves Henry, Isabelle Hardy, Carlo-Giovanni Camarda, Martine Perret & Samuel Pavard, 2015, Seasonal transitions: a major mortality risk for seasonal species.  
Soumis à Nature.

### En préparation

**Julie Landes**, Pierre-Yves Henry, Isabelle Hardy, Martine Perret & Samuel Pavard, Reproducing in heaven: female reproduction bears no survival cost in a small primate under captivity.  
Journaux envisagés : Functional Ecology, Journal of Animal Ecology.

**Julie Landes**, Pierre-Yves Henry, Isabelle Hardy, Martine Perret & Samuel Pavard, Early-life environment rather than growth rate determines adult mortality in a primate species.  
Journaux envisagés : Functional Ecology, Journal of Animal Ecology, Oikos.

**Julie Landes**, Pierre-Yves Henry, Isabelle Hardy, Martine Perret & Samuel Pavard, Effect of time spent in unfavorable season on mortality.  
Journaux envisagés : PlosOne.

## Communications

**Julie Landes**, Pierre-Yves Henry, Isabelle Hardy, Carlo-Giovanni Camarda, Martine Perret & Samuel Pavard. Accelerated seasonal rhythm leads to accelerated aging in a primate species. YNHM meeting, Février 2015, Paris, France. Poster.

**Julie Landes**, Pierre-Yves Henry, Isabelle Hardy, Carlo-Giovanni Camarda, Martine Perret & Samuel Pavard. Accelerated seasonal rhythm leads to accelerated aging in a primate species. Journées du GDR Ecologie Statistique, Mars 2015, Lyon, France. Présentation orale.

**Julie Landes**, Pierre-Yves Henry, Isabelle Hardy, Carlo-Giovanni Camarda, Martine Perret & Samuel Pavard. Accelerated seasonal rhythm leads to accelerated aging in a primate species. EvoDemoS meeting, Novembre 2014, Stanford, USA. Présentation orale et poster.