

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

EFFET DE LA POLYPLOÏDIE SUR LES CAPACITÉS MÉTABOLIQUES
DE CLONES SUBARCTIQUES DU COMPLEXE *DAPHNIA PULEX*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN GESTION DE LA FAUNE ET DE SES HABITATS

PAR
THIERRY RATTÉ

AVRIL 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

L'aboutissement de ce projet ne fut pas chose simple. Heureusement, beaucoup de personnes m'ont permis d'y parvenir. D'abord, je tiens à remercier mes parents Anne et Garnier et ma sœur Julie-Alice pour avoir su m'encourager tout au long de mon cheminement.

Merci à toi Roland. Tu es un excellent collègue toujours prêt à rendre service, mais tu es surtout un chum qui sait lâcher son fou et sur qui on peut compter.

Merci France pour m'avoir permis d'intégrer ton labo dès ma deuxième année de baccalauréat. Les campagnes d'échantillonnage à Churchill et à Kuujjuaraapik m'ont permis de voir du pays et mon séjour dans ton labo m'a initié aux nombreuses possibilités de l'écologie moléculaire. Merci également à Pierre d'avoir répondu à mes nombreuses questions de physiologie.

Merci Caro, Étienne, Nico et Sophie d'avoir su agrémenter ma vie étudiante et sociale de conversations allant des problèmes de PCR aux performances des Samsonov dans la ligue de hockey cosom.

Merci également à tous mes autres amis et collègues pour les six belles années passées à Rimouski.

À bientôt !

RÉSUMÉ

La polyploïdie est souvent liée au phénomène de parthénogénèse géographique dans lequel les organismes asexués occupent des environnements plus extrêmes que leur vis-à-vis sexués. Chez les daphnies du complexe *Daphnia pulex*, la polyploïdie est généralement associée à des latitudes élevées. Plus précisément, la distribution de la polyploïdie chez ce complexe suit un patron géographique dans lequel les régions tempérées comportent uniquement des daphnies diploïdes et les régions arctiques, principalement des daphnies polyploïdes. Les capacités métaboliques des ectothermes en milieu froid devant être adaptées à la courte saison de croissance, il est logique de s'intéresser à celles-ci pour tenter d'expliquer la distribution des daphnies polyploïdes. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la polyploïdie sur le métabolisme de daphnies du complexe *D. pulex*. Pour ce faire, des mesures de consommation d'oxygène à 10 et 20 °C ont été effectuées sur des clones diploïdes et polyploïdes acclimatés à 10 et 20°C provenant des régions subarctiques de Kuujuaapik (Qc, Canada) et de Churchill (Mn, Canada). L'activité de la citrate synthase a été mise en parallèle avec les données de respiration. Les résultats montrent l'absence d'effet de la polyploïdie sur les capacités métaboliques des daphnies de l'étude. Cependant, les daphnies des deux niveaux de ploïdie montrent une grande variabilité interclonale pouvant s'expliquer par la diversité de leurs génomes nucléaire et mitochondrial. Le facteur expliquant la distribution des daphnies polyploïdes n'impliquant pas directement le métabolisme, d'autres avenues de recherche pourraient être explorées, soit au niveau du taux de croissance en relation avec l'ADNr ou au niveau du stade dormant des daphnies.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 La polyploïdie	1
1.1.1 Occurrence et formation	1
1.1.2 Conséquences génétiques	2
1.1.3 Effets phénotypiques	3
1.2 La parthénogénèse géographique	5
1.3 Les système des daphnies	6
1.4 La problématique	8
1.4.1 Le métabolisme	8
1.4.1.1 Effet de la température et de la taille	8
1.4.1.2 Acclimatation thermique chez les ectothermes	9
1.4.1.3 Effet de la polyploïdie	10
1.5 Objectif de l'étude et prédictions	12

CHAPITRE II

INVESTIGATION DU SUCCÈS ÉVOLUTIF DES CLADOCÈRES POLYPLOÏDES DANS L'ARCTIQUE : LE MÉTABOLISME N'EST PAS LA CLÉ	14
2.1 Résumé	15
2.2 Introduction	16
2.3 Matériel et méthodes	21
2.3.1 Provenance des daphnies	21
2.3.2 Identification des clones et de leur niveau de ploïdie	21
2.3.3 Conditions de maintenance	23
2.3.4 Consommation d'oxygène	24
2.3.5 Activité de la citrate synthase	26
2.3.6 Produits chimiques	27
2.3.7 Analyses statistiques	28
2.4 Résultats	29
2.4.1 Consommation d'oxygène.....	29
2.4.2 Masse et protéines totales.....	30
2.4.3 Activité de la citrate synthase.....	31
2.5 Discussion	39
2.5.1 Comparaison des capacités aérobies des clones polyploïdes et diploïdes. 39	
2.5.1.1 Consommation d'oxygène.....	39
2.5.1.2 Activité de la citrate synthase	40
2.5.2 Absence d'acclimatation thermique de la consommation d'oxygène.....	41
2.5.3 Hypothèse alternative à la présence de polyploïdes en Arctique.....	43
2.5.4 Variabilité interclonale phénotypique et génétique	45
2.6 Remerciements	47

CHAPITRE III

CONCLUSION GÉNÉRALE	48
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	53
ANNEXE 1 : Géotypes microsatellites de chaque clone utilisé dans l'étude.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Niveau de ploïdie, haplotype *ND5* (génom mitochondrial), génotype *LDH* (génom nucléaire) et localisation des clones du complexe *D. pulex* utilisés dans cette étude 33

Tableau 2. Analyses de covariance hiérarchiques à deux facteurs (ploïdie et clone) sur la consommation d'oxygène de daphnies du complexe *D. pulex* provenant de Kuujjuarapik et Churchill 35

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Consommation d'oxygène à 10 et 20°C des daphnies du complexe <i>D. pulex</i> diploïdes (cercles pleins) et triploïdes (cercles vides) acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujjuaraapik et Churchill.....	34
Figure 2. Moyenne ($\pm$ écart-type) de la masse (échantillons de 25 daphnies adultes pour mesure de l'activité de la citrate synthase) de clones du complexe <i>D. pulex</i> acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujjuaraapik et Churchill	36
Figure 3. Moyenne ($\pm$ écart-type) des protéines totales (mg/g tissus) chez des clones du complexe <i>Daphnia pulex</i> acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujjuaraapik et Churchill	37
Figure 4. Moyenne ($\pm$ écart-type) de l'activité de la citrate synthase (U/mg protéines) chez des clones du complexe <i>D. pulex</i> acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujjuaraapik et Churchill	38

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 La polyploïdie

1.1.1 Occurrence et formation

La polyploïdie est un phénomène évolutif qui se traduit par la présence de plus de deux séries complètes de chromosomes (Stebbins, 1950; 1971; cité dans Otto et Whitton, 2000). Elle est très répandue dans le règne végétal où elle constitue entre 30 et 80 % du nombre total d'espèces (Masterson, 1994; Otto et Whitton, 2000). Elle est également présente chez les animaux, mais de façon plus rare et sporadique (Muller, 1925 cité dans Orr, 1990). La polyploïdie survient suite à de rares accidents au niveau de la mitose ou de la méiose qui provoquent la formation de gamètes non réduites (Comai, 2005). Selon l'origine de leur formation, les organismes polyploïdes sont habituellement divisés en deux groupes distincts. Les autopolyploïdes sont formés suite à des mutations au sein d'un même génome menant à l'union de mêmes séries de chromosomes alors que les allopolyploïdes proviennent de l'hybridation entre deux espèces menant à l'union de deux séries ou plus de chromosomes différents (Otto, 2007). En réalité, il existe plutôt un gradient entre ces deux extrêmes qui dépend de la divergence existant entre les génomes qui s'unissent (Otto et Whitton, 2000; Comai, 2005).

1.1.2 Conséquences génétiques

Plusieurs conséquences génétiques sont liées à la formation d'organismes polyploïdes. Ainsi, le maintien de certains hybrides polyploïdes (allopolyploïdie) peut être lié au phénomène d'hétérosis dans lequel le fitness de l'hybride est supérieur à celui des deux espèces parentales. La formation d'un tel hybride peut toutefois provoquer la situation inverse où celui-ci sera moins bien adapté que les espèces parentales (Comai, 2005). La redondance de gènes et leur maintien peuvent avoir différentes explications. D'abord, les multiples copies d'un même gène possédées par un polyploïde permettent de masquer plus efficacement les allèles délétères comparativement aux diploïdes (Otto et Whitton, 2000; Frankham *et al.*, 2002). Parallèlement à cette situation, les polyploïdes ont également de plus fortes probabilités de porter un allèle bénéfique pour la population. En second lieu, la sélection envers une expression génique accrue pourrait favoriser le maintien de plusieurs copies d'un même gène (Otto et Whitton, 2000). Finalement, il est possible que certaines copies d'un gène acquièrent de nouvelles fonctions. Une copie du gène pourra être utilisée pour remplir une sous fonction déjà existante (subfonctionnalisation, i.e. expression génique différentielle selon les tissus; Lynch et Force, 2000; Adams *et al.*, 2003; Otto, 2003) ou générer une nouvelle fonction (néofonctionnalisation; Osborn *et al.*, 2003).

1.1.3 Effets phénotypiques

La polyploïdie est associée à une augmentation du contenu en ADN des cellules, donc de la taille du génome. Cette augmentation de la taille du génome est habituellement liée à quelques modifications phénotypiques. D'abord, l'observation la plus commune liée à celle-ci est l'augmentation du volume cellulaire (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001). Plusieurs espèces de plathelminthes et de copépodes montrent une relation allométrique positive entre leur volume cellulaire et leur taille de génome; ce qui se traduit également par une augmentation de leur taille corporelle (Gregory *et al.*, 2000). La relation entre le volume d'une cellule et son contenu en ADN est également retrouvée chez plusieurs vertébrés dont les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères, mais la nature de cette relation est variable d'un groupe à l'autre et selon l'environnement (Gregory, 2001; Otto, 2007). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la taille des cellules a été comparée entre quatre (4) souches ayant comme unique différence leur niveau de ploïdie (allant de $1n$ à $4n$); montrant ainsi une relation positive entre ce paramètre et le niveau de ploïdie (Galitski *et al.*, 1999). Bien que la polyploïdie soit liée à des cellules de plus grande taille, cette situation ne se traduit pas obligatoirement par une taille corporelle adulte supérieure : elle est associée de façon générale à une augmentation de la taille corporelle adulte chez les plantes et les invertébrés, mais pas chez les vertébrés (Otto et Whitton, 2000; Gregory et Mable, 2005).

Au niveau de la vitesse de développement, le contenu en ADN des cellules a une forte relation négative avec le taux de division cellulaire mitotique ou méiotique des cellules pour plusieurs groupes (Gregory, 2001). Cette situation tiendrait au fait qu'un plus grand contenu en ADN dans la cellule augmente le temps de réplication en prévision de la division cellulaire. De plus, les plus grandes cellules tendent à avoir un rapport surface/volume inférieur, ce qui se traduirait en faible taux de croissance des cellules polyploïdes (Otto, 2007). Chez les plantes, les polyploïdes tendent à montrer un développement ralenti lié à de faibles taux métaboliques (Levin, 1983). De plus, les stratégies de développement chez les plantes ont un lien avec la taille du génome. Les plantes annuelles doivent se développer rapidement pour compléter leur cycle de vie à l'intérieur d'une saison de croissance. Pour les vivaces, le développement est lent, car il s'étend sur plusieurs saisons de croissance. En association avec leur taux de développement, les vivaces ont habituellement des tailles de génome supérieures à celles des annuelles (Gregory, 2002). Chez plusieurs espèces d'amphibiens (grenouilles et salamandres), il y a une relation positive entre la taille du génome et le temps de développement (Gregory, 2002). Chez les arthropodes, les études s'intéressant à la variation de la taille du génome en lien avec ses effets phénotypiques sont rares. Quelques études concernant les copépodes ont toutefois montré une relation négative significative entre la taille du génome et la vitesse de développement (McLaren *et al.*, 1988; White et McLaren, 2000).

Il est souvent avancé que les organismes polyploïdes sont tolérants à une plus grande gamme de conditions environnementales grâce à l'augmentation de l'hétérozygotie permettant une plus grande flexibilité métabolique (Otto et Whitton, 2000). Chez les animaux, de meilleures performances métaboliques de polyploïdes comparativement à leurs vis-à-vis diploïdes ont été observées chez les artémies (Varo *et al.*, 1991, 1998) et chez les geckos du genre *Heteronotia* (Kearney *et al.*, 2005). Cependant, les cas répertoriés à ce sujet sont rares et il n'est pas possible de considérer la plus grande flexibilité métabolique comme une généralité.

1.2 La parthénogénèse géographique

Les organismes asexués ont souvent tendance à occuper des habitats aux conditions plus extrêmes que leurs progéniteurs sexués. Ainsi, les asexués sont souvent retrouvés à des altitudes et des latitudes plus élevées et occupent de plus vastes territoires que leurs vis-à-vis sexués. Ce phénomène est appelé parthénogénèse géographique (Vandel, 1928). La reproduction sexuée constitue une importante barrière à l'établissement des organismes polyploïdes du règne animal. De ce fait, la parthénogénèse, malgré sa faible fréquence, est étroitement liée à la polyploïdie chez les animaux (2/3 des animaux polyploïdes sont parthénogènes; Otto et Whitton, 2000).

Face au phénomène de la parthénogénèse géographique, quelques chercheurs se sont penchés sur le succès écologique et évolutif des asexués. Ainsi, ils ont voulu savoir si l'asexualité est la principale cause du succès évolutif de certaines espèces ou bien s'il s'agit de phénomènes étroitement liés à celle-ci, soit la polyploïdie et l'hybridation. Ils

en sont venus à la conclusion que ce n'est pas l'asexualité en elle-même qui explique le succès évolutif, car plusieurs plantes allopolyploïdes sexuées ont une répartition semblable aux patrons de parthénogénèse géographique (Kearney, 2005; Lundmark et Saura, 2006). Kearney (2005) suppose que l'hybridation constitue le principal facteur responsable du succès écologique des organismes parthénogènes dans la colonisation des nouveaux environnements laissés vacants par le retrait des glaces à la fin du Pléistocène. Cependant, cette prise de position a été critiquée et débattue (Lundmark, 2006). Selon Lundmark et Saura (2006), la polyploïdie est le facteur le plus important dans l'explication du succès évolutif des organismes clonaux et particulièrement des invertébrés parthénogènes. Ils considèrent plutôt l'hybridation comme une étape vers la polyploïdisation ou comme un phénomène complémentaire à la polyploïdie qui augmente l'effet de chacun (Lundmark et Saura, 2006). De cette façon, la polyploïdie semble expliquer une part importante du succès des organismes asexués, mais l'hybridation doit quand même être prise en considération.

1.3 Le système des daphnies

Dans l'est du Canada, le complexe *Daphnia pulex* est très répandu et il inclut les espèces *D. pulex*, *D. pulicaria* et *D. middendorffiana*. *D. pulex* est habituellement retrouvé dans les étangs peu profonds alors que *D. pulicaria* se retrouve dans les lacs. Ces deux espèces sont diploïdes, se retrouvent dans les zones tempérées et utilisent deux modes de reproduction, soit la parthénogénèse cyclique et la parthénogénèse obligatoire. Les hybrides de première génération entre *D. pulex* et *D. pulicaria* ne se reproduisent que par parthénogénèse obligatoire (Hebert *et al.*, 1993). La polyploïdie semble associée

à des latitudes élevées (Dufresne et Hebert, 1995), mais également à des altitudes élevées (Aguilera *et al.*, 2007). Dans les zones subarctiques, des populations de daphnies apomictiques diploïdes et polyploïdes coexistent alors qu'en milieu arctique, la plupart des clones du complexe *D. pulex* sont polyploïdes (Beaton et Hebert, 1988). *D. middendorffiana* est une espèce polyploïde circumarctique qui a une origine polyphylétique généralement liée à l'hybridation entre deux espèces : *D. pulicaria* comme espèce maternelle et *D. pulex* comme espèce paternelle (Dufresne et Hebert, 1994; 1997). Cependant, quelques cas de clones polyploïdes ayant un génome mitochondrial de *D. pulex*, donc n'étant pas de l'espèce *D. middendorffiana*, ont récemment été identifiés (Vergilino *et al.*, 2009).

La comparaison des traits d'histoire de vie entre des clones diploïdes et polyploïdes du complexe *D. pulex* a été initialement réalisée à 20°C sur des daphnies provenant de Churchill au Manitoba (Weider, 1987). À cette température, les daphnies polyploïdes atteignaient la maturité sexuelle à un âge et une taille supérieurs aux diploïdes. De plus, les clones polyploïdes donnaient naissance à de plus petites portées, mais à des néonates de plus grande taille que les diploïdes (Weider, 1987). La température a ensuite été ajoutée dans la comparaison entre diploïdes et polyploïdes (Dufresne et Hebert, 1998). Ainsi, trois températures ont été testées, soit 10, 17 et 24°C. Sous toutes ces températures, les individus polyploïdes avaient une plus grande taille adulte ainsi que des oeufs et des néonates plus gros que les diploïdes. Contrairement aux températures plus élevées, les polyploïdes élevés à 10°C ont atteint la maturité sexuelle plus rapidement que les diploïdes. Cette situation serait avantageuse pour les

polyploïdes qui peuvent coloniser les étangs plus rapidement à faible température (Dufresne et Hebert, 1998).

1.4 La problématique

La présence de clones de daphnies diploïdes et polyploïdes dans la région subarctique permet d'évaluer l'effet de la polyploïdie à plusieurs niveaux en vue d'identifier de potentiels avantages écologiques de celle-ci dans les environnements extrêmes comme l'Arctique. Le métabolisme représente un aspect important de la physiologie d'un organisme qui est susceptible d'expliquer son succès dans un environnement particulier. Il est donc intéressant de s'attarder à l'effet de la polyploïdie sur celui-ci.

1.4.1 Le métabolisme

1.4.1.1 *Effet de la température et de la taille*

La température et la taille corporelle affectent le métabolisme d'un organisme. Ces facteurs ont des effets comparables autant chez les microbes que chez les ectothermes et les endothermes, mais à différentes échelles (Gillooly *et al.*, 2001). L'augmentation de taille d'un organisme est associée avec une augmentation du métabolisme comme c'est le cas avec *Daphnia pulex* où la consommation d'oxygène est 16 fois plus élevée chez un organisme de 4 mm que celui de 1,4 mm (Paul *et al.*, 1997). Cependant, l'augmentation de taille reflète également une diminution du métabolisme relativement

à la masse. Gillooly *et al.* (2001) avancent que le taux métabolique chez un organisme est largement gouverné par deux facteurs interagissant entre eux : la relation allométrique décrivant comment le taux des processus métaboliques varie avec la masse corporelle (taux métabolique d'un organisme complet $\propto$ masse^{3/4}) et le facteur de Boltzmann décrivant la dépendance thermique des processus biochimiques impliqués dans le métabolisme. Une élévation de température provoque une augmentation du métabolisme par son effet sur les réactions biochimiques survenant au niveau cellulaire (Hochacka et Somero, 1984). Une étude réalisée sur le métabolisme de cinq (5) espèces de daphnies (*D. pulex*, *D. pulicaria*, *D. hyalina*, *D. obtusa* et *D. magna*) a révélé une augmentation du taux de respiration de celles-ci avec la température; l'accroissement le plus important étant chez les juvéniles (Simcic et Brancelj, 1997). Une comparaison du budget énergétique des daphnies arctiques et tempérées selon la température semble indiquer qu'elles ont les mêmes capacités métaboliques. Cependant, l'étalement thermique du taux de respiration se déplace d'environ 5 °C vers les températures plus froides chez les daphnies arctiques (Yurista, 1999).

1.4.1.2 *Acclimatation thermique chez les ectothermes*

Les environnements extrêmes comportent des éléments de nature physique, chimique ou climatologique y rendant la colonisation difficile. Les régions de latitudes élevées sont caractérisées par une faible température ambiante et une courte saison de croissance. La survie d'organismes ectothermes dans de telles régions dépend alors de leurs adaptations aux températures froides (Hochachka et Somero, 2002; Pörtner *et al.*, 2006). Les processus physiologiques sont directement liés à la température qui affecte

l'activité de plusieurs enzymes ainsi que la fluidité membranaire (Hochachka et Somero, 1984). Chez les ectothermes, de faibles températures ambiantes devraient donc correspondre à une diminution de leur taux métabolique. Cependant, des mécanismes de thermocompensation viennent contrecarrer les effets des basses températures. Une acclimation à ces conditions provoque une augmentation du métabolisme permettant d'adapter la croissance et la reproduction à la courte saison de croissance (Chown et Gaston, 2000; Pörtner *et al.*, 2006 ; Morley *et al.*, 2009).

1.4.1.3 Effet de la polyploïdie

Il ne semble pas y avoir de consensus quant à l'effet de la polyploïdie sur la consommation d'oxygène. Les quelques études qui s'intéressent au sujet ne mènent pas toutes à la même conclusion. Chez les artémies, l'élévation de température provoque une augmentation moins rapide de la consommation d'oxygène chez la souche tétraploïde parthénogène que chez les souches diploïdes parthénogène ou sexuée. La polyploïdie semble conférer une meilleure tolérance aux températures élevées et ce, tant au stade nauplii qu'au niveau adulte (Varo *et al.*, 1991; 1998). Une étude effectuée sur les geckos du genre *Heteronotia* a révélé que les souches parthénogènes triploïdes pouvaient atteindre un taux de respiration maximum supérieur comparativement aux deux souches parentales diploïdes (Kearney *et al.*, 2005). Cette observation n'est cependant pas généralisable. Aucun effet de la polyploïdie n'a été détecté chez les grenouilles du genre *Hyla* (Kamel *et al.*, 1985), chez les salamandres du genre *Ambystoma* (Licht et Bogart, 1990) et chez les lézards du genre *Cnemidophorus* (Cullum, 1997).

En milieu naturel, la polyploïdie est un phénomène observé sur une large gamme de poissons allant des Chondrichthyens aux Téléostéens intermédiaires (Leggatt et Iwama, 2003; Le Comber et Smith, 2004; Maxime, 2008). Il est également possible d'induire artificiellement la polyploïdie chez plusieurs espèces de poissons. L'application d'un choc thermique, chimique ou physique sur des oeufs fertilisés initialement diploïdes induit la formation de poissons triploïdes (Maxime, 2008; Piferrer *et al.*, 2009). De ce fait, plusieurs études ont comparé les capacités métaboliques d'individus triploïdes formés artificiellement avec celles des souches diploïdes ayant servi à leur formation. Chez les salmonidés, des analyses comparatives triploïdes-diploïdes au niveau de la consommation d'oxygène ont été réalisées tant aux stades adulte et juvénile (Bernier *et al.*, 2004; Atkins et Benfey, 2008) qu'aux stades embryonnaire et larvaire (Oliva-Teles et Kaushik, 1987 ; 1990). Celles-ci n'ont pas permis de détecter d'effet de la polyploïdie sur la consommation d'oxygène, ce qui est également le cas chez *Pomoxis annularis* (Centrarchidae; Parson, 1993) et chez *Silurus asotus* (Siluridae; Seol *et al.*, 2008).

1.5 Objectif de l'étude et prédictions

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la polyploïdie sur le métabolisme de daphnies subarctiques du complexe *D. pulex*. Pour y parvenir, les capacités métaboliques de clones diploïdes et polyploïdes préalablement acclimatés à 10 et 20°C ont été évaluées en mesurant leur consommation d'oxygène également à 10 et 20°C. Ce montage expérimental a permis d'émettre les prédictions suivantes :

1) Les clones polyploïdes auront une consommation d'oxygène (métabolisme aérobie) supérieure à celle des clones diploïdes à faible température (10°C). À température plus élevée (20°C), la situation inverse prévaudra. Cette prédiction est en lien avec les observations de Dufresne et Hebert (1998). Celles-ci montraient qu'à faible température, le taux de croissance supérieur des polyploïdes leur permettait l'atteinte hâtive de leur maturité sexuelle comparativement aux diploïdes; cette situation s'inversant aux températures plus élevées.

2) Pour les deux températures de respiration (10 et 20°C), les daphnies acclimatées à 10°C consommeront plus d'oxygène que celles ayant été acclimatées à 20°C. À 10°C, la réponse d'acclimation sera plus marquée chez les clones polyploïdes qui auront une consommation d'oxygène supérieure à celle des diploïdes. Cette prédiction vient du fait que des mécanismes de thermocompensation viennent améliorer les performances métaboliques chez les ectothermes. L'acclimation à de faibles températures aurait comme résultante une meilleure flexibilité métabolique permettant une bonne efficacité

à basse température et un maintien de celle-ci avec l'augmentation de température (Clarke, 1991; Pörtner *et al.*, 2006).

Les données de consommation d'oxygène ont été mises en parallèle avec des mesures d'activité de la citrate synthase. Cette enzyme constituant la voie d'entrée du carbone dans le cycle de Krebs, elle est un indicateur du métabolisme aérobie et du volume mitochondrial (Berges et Ballantyne, 1991), ce qui mène à la prédiction :

3) Les clones polyploïdes auront des niveaux plus élevés d'activité de la citrate synthase que les diploïdes. Cette situation reflètera un plus grand volume mitochondrial chez les daphnies polyploïdes lié à une acclimatation plus efficace face aux basses températures des régions de latitude élevée.

CHAPITRE II

Investigation du succès évolutif des cladocères polyploïdes dans l'Arctique : le métabolisme n'est pas la clé

Thierry Ratté ^a et France Dufresne ^{a †}

^a Laboratoire de Biologie évolutive, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, (Québec), Canada, G5L 3A1

[†] Auteur de correspondance: Tél. : (418) 723-1986 ext: 1223, Fax : (418) 724-1849
Courriel: france_dufresne@uqar.qc.ca

2.1 Résumé

La polyploïdie est souvent liée au phénomène de parthénogénèse géographique dans lequel les organismes asexués occupent des environnements plus extrêmes que leur vis-à-vis sexués. Chez les daphnies du complexe *Daphnia pulex*, la polyploïdie est généralement associée à des latitudes élevées. Plus précisément, la distribution de la polyploïdie chez ce complexe suit un patron géographique dans lequel les régions tempérées comportent uniquement des daphnies diploïdes et les régions arctiques, principalement des daphnies polyploïdes. Les capacités métaboliques des ectothermes en milieu froid devant être adaptées à la courte saison de croissance, il est logique de s'intéresser à celles-ci pour tenter d'expliquer la distribution des daphnies polyploïdes. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la polyploïdie sur le métabolisme de daphnies du complexe *D. pulex*. Pour ce faire, des mesures de consommation d'oxygène à 10 et 20°C ont été effectuées sur des clones diploïdes et polyploïdes acclimatés à 10 et 20°C provenant des régions subarctiques de Kuujuaapik (Qc, Canada) et de Churchill (Mn, Canada). L'activité de la citrate synthase a été mise en parallèle avec les données de respiration. Les résultats montrent l'absence d'effet de la polyploïdie sur les capacités métaboliques des daphnies de l'étude. Cependant, les daphnies des deux niveaux de ploïdie montrent une grande variabilité interclonale pouvant s'expliquer par la diversité de leurs génomes nucléaire et mitochondrial.

2.2 Introduction

La température est un facteur abiotique majeur affectant les organismes et un facteur de régulation des écosystèmes aquatiques (Mitchell et Lampert, 2000). Celle-ci a des impacts au niveau du taux des processus biochimiques et physiologiques des organismes (Hochachka et Somero, 1984). Les régions de latitudes élevées étant caractérisées par une faible température ambiante et une courte saison de croissance, les ectothermes qui vivent dans ces environnements froids sur une base saisonnière ou annuelle ont à faire face aux effets contraignants des basses températures sur les taux physiologiques tels que la diffusion des substrats et l'activité enzymatique (Pörtner *et al.*, 2006; Morley *et al.*, 2009). Face à ces contraintes physiologiques thermiques, les ectothermes ont deux possibilités : soit se soumettre à la réduction des taux de réaction en adoptant un style de vie qui limite les dépenses énergétiques, soit en développant des adaptations leur permettant de maintenir des taux d'activités supérieurs à ceux attendus aux températures froides (Morley *et al.*, 2009).

L'adaptation métabolique au froid ou la thermocompensation est le maintien de taux physiologiques et de leurs étendues face à des changements thermiques (Clarke, 1991; Pörtner *et al.*, 2006). Les mécanismes de thermocompensation viennent limiter les effets contraignants des basses températures. Ainsi l'acclimatation aux températures froides permet l'augmentation des taux métaboliques comparativement à ce qu'ils devraient être à ces températures. Ces mécanismes permettent d'adapter la croissance et la reproduction à la courte saison de croissance caractéristique des zones géographiques de latitude élevée (Chown et Gaston, 2000).

Parmi les mécanismes de thermocompensation, la prolifération mitochondriale est une réponse souvent observée face à la limitation thermique due au froid (Morley *et al.*, 2009). Pour compenser la diminution de la capacité mitochondriale due au froid, plusieurs espèces de poissons et certaines espèces de mollusques antarctiques maintiennent leur capacité de métabolisme aérobie par l'augmentation de la densité mitochondriale de leurs muscles (Pörtner, 2002; Morley *et al.*, 2009). Les mécanismes d'acclimatation ne se traduisent pas seulement par une augmentation de la densité mitochondriale. En effet, au niveau de la mitochondrie, des changements au niveau de la structure et de l'activité des enzymes (Guderley, 2004), de la densité des membranes internes (cristae) (St-Pierre *et al.*, 1998) et de la fluidité et de la composition des membranes (Hochahka et Somero, 2002) peuvent également survenir.

En réponse au froid, l'énergie d'activation estimée par les courbes d'Arrhénius peut être abaissée pour augmenter l'activité des enzymes (Guderley et Blier, 1988). Cependant, lorsque l'adaptation au froid est liée à la prolifération mitochondriale, la situation inverse (augmentation de l'énergie d'activation) peut survenir, produisant ainsi une dépression métabolique visant à limiter les coûts métaboliques associés à la prolifération mitochondriale (Pörtner *et al.*, 2007). Il s'agit là d'un compromis au niveau d'une adaptation thermique. Puisque les ressources énergétiques sont limitées, l'amélioration des caractéristiques d'un trait est atteignable seulement au détriment d'un ou d'autres traits (Pörtner, 2002; Pörtner *et al.*, 2006). Dans le cas de la prolifération mitochondriale, un des compromis possibles est l'augmentation du niveau d'énergie d'activation d'Arrhénius (Pörtner *et al.*, 2006).

Dans les régions froides de latitude élevée, des organismes asexués occupent de vastes territoires caractérisés par des conditions environnementales difficiles. Parallèlement à cette situation, leurs vis-à-vis sexués sont généralement situés dans les zones tempérées. Ce patron différentiel de distribution des organismes asexués et sexués correspond à la parthénogénèse géographique (Vandel, 1928). Chez les animaux, la polyploïdie est fréquemment associée à l'asexualité, car la reproduction sexuée constitue une barrière à l'établissement de celle-ci pour certains groupes mais non pour d'autres (2/3 des animaux polyploïdes sont parthénogènes ; Orr, 1990; Otto et Whitton, 2000). De ce fait, le patron de distribution géographique des animaux polyploïdes est souvent lié à la parthénogénèse géographique.

Les effets phénotypiques associés aux organismes polyploïdes sont liés à leur plus grande taille de génome. Face à l'augmentation de la taille du génome, l'augmentation du volume cellulaire est l'effet le plus communément observé (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001). Cette relation a été observée chez les invertébrés (plathelminthes et copépodes; Gregory *et al.*, 2000) et chez plusieurs vertébrés dont les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères, mais elle est variable selon le groupe et l'environnement (Gregory, 2001; Otto, 2007). Quatre (4) souches de la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec des niveaux de ploïdie différents (1n à 4n) ont montré une relation positive entre la taille de leur cellules et celle de leur génome (Galitski *et al.*, 1999). Si la polyploïdie est liée à de plus grandes tailles de cellules, cela ne se traduit pas obligatoirement par l'obtention d'une taille corporelle adulte supérieure. En effet, il y a généralement une augmentation de la taille corporelle adulte chez les plantes et les invertébrés, mais ce n'est pas le cas pour les vertébrés

(Otto et Whitton, 2000; Gregory et Mable, 2005). La taille du génome peut également influencer la vitesse de développement. Ainsi, une taille supérieure de génome se traduit par une diminution de la vitesse de développement notamment chez les plantes (Levin, 1983; Gregory, 2002), les amphibiens (Gregory, 2002) et les copépodes (McLaren *et al.*, 1988; White et McLaren, 2000). Face à cette relation, la taille du génome est un facteur contraignant de la vitesse de développement, parce qu'elle est associée à la vitesse de division cellulaire (Gregory, 2001; 2002). Pour expliquer le succès évolutif des organismes polyploïdes, il est souvent proposé que ces derniers sont tolérants à une plus grande gamme de conditions environnementales que leurs vis-à-vis diploïdes; cela étant dû à l'augmentation de l'hétérozygotie favorisant une flexibilité métabolique accrue (Otto et Whitton, 2000). Puisque seulement de rares cas viennent appuyer cette hypothèse (artémies :Varo *et al.*, 1991,1998; geckos : Kearney *et al.*, 2005), la plus grande flexibilité métabolique des polyploïdes ne peut pas être considérée comme une généralité.

Les différentes espèces de daphnies du complexe *Daphnia pulex* constituent un bon système pour tenter d'élucider le succès évolutif des organismes polyploïdes dans les régions de latitude élevée. La distribution des daphnies polyploïdes de ce complexe est liée aux régions de latitude élevée (Dufresne et Hebert, 1995). Dans les régions arctiques, les populations de daphnies sont apomictiques et majoritairement polyploïdes alors qu'au niveau subarctique, des clones diploïdes et polyploïdes coexistent (Beaton et Hebert, 1988). Dans l'est du Canada, les trois principales espèces du complexe *D. pulex* sont *D. pulex*, *D. pulicaria* et *D. middendorffiana*. *D. pulex* et *D. pulicaria* sont diploïdes et dans les régions tempérées, elles peuvent se reproduire par parthénogénèse

cyclique ou obligatoire; ce qui n'est pas le cas de leurs hybrides de première génération qui se reproduisent uniquement par parthénogénèse obligatoire (Hebert *et al.*, 1993). *D. middendorffiana* est une espèce polyploïde circumarctique ayant une origine polyphylétique liée à l'hybridation entre *D. pulicaria* comme espèce maternelle et *D. pulex* comme espèce paternelle (Dufresne et Hebert, 1994; 1997). Récemment, des clones polyploïdes ayant un génome mitochondrial de *D. pulex* (espèce maternelle) ont été identifiés, ce qui ne correspond pas à la structure génétique habituelle de *D. middendorffiana* (Vergilino *et al.*, 2009).

Chez les daphnies du complexe *D. pulex*, les polyploïdes possèdent de plus grands néonates et une plus grande taille adulte, mais de plus petites portées que leurs vis-à-vis diploïdes (Weider, 1997; Dufresne et Hebert, 1998). À faible température, les polyploïdes atteignent leur maturité sexuelle plus rapidement que les diploïdes; cette situation s'inversant aux températures plus élevées (Dufresne et Hebert, 1998).

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la polyploïdie sur le métabolisme de daphnies subarctiques du complexe *D. pulex*. Pour y parvenir, des mesures de consommation d'oxygène à 10 et 20°C et des mesures d'activité de la citrate synthase ont été effectuées sur des clones diploïdes et polyploïdes acclimatés à deux températures, soit 10 et 20°C. En considérant les observations de Dufresne et Hebert (1998), nous prédisons que les polyploïdes auront une consommation d'oxygène supérieure à celle des clones diploïdes à faible température (10°C) et qu'à température plus élevée (20°C), la situation inverse prévaudra. Parallèlement à cette prédiction, les clones polyploïdes devraient avoir une réponse d'acclimatation plus marquée que les

diploïdes à 10°C, leur permettant ainsi d'avoir une consommation d'oxygène supérieure à ces derniers. En considérant une thermocompensation (Clarke, 1991; Pörtner *et al.*, 2006) plus efficace chez les polyploïdes, ceux-ci devraient avoir une activité plus importante de la citrate synthase que les diploïdes, ce qui reflèterait un plus grand volume mitochondrial (Berges et Ballantyne, 1991). Cette situation serait potentiellement explicable par la prolifération mitochondriale comme adaptation métabolique au froid (Pörtner, 2002; Morley *et al.*, 2009).

2.3 Matériel et méthodes

2.3.1 Provenance des daphnies

Les daphnies utilisées dans cette étude appartiennent au complexe *D. pulex* et proviennent d'étangs peu profonds de deux régions subarctiques bordant la Baie d'Hudson. Dix (10) clones proviennent d'un échantillonnage de juillet 2006 dans la région de Kuujuaapik, Nunavik, Canada (55° 19' N; 77° 29' O et 55° 18' N; 77° 44' O). Quatre (4) clones proviennent d'échantillonnage de juillet 2005 et 2006 dans la région de Churchill, Manitoba, Canada (58° 44' N; 99° 03' O).

2.3.2 Identification des clones et de leur niveau de ploïdie

Plusieurs clones diploïdes et triploïdes ont été utilisés pour s'assurer d'une bonne représentation de chaque niveau de ploïdie. Ceux-ci ont été identifiés à l'aide de deux méthodes conjointes. Initialement, les différentes lignées clonales ont été caractérisées par électrophorèse de protéines sur acétate de cellulose. La variation de trois (3) allozymes (amino aspartate transférase (AAT), phosphoglucomutase (PGM) et glucose-

6-phosphate isomérase (GPI)) a été évaluée selon la méthode de Hebert et Beaton (1993).

L'identification des clones a également été réalisée à l'aide de sept (7) marqueurs microsatellites (Dp183, Dp502, Dp512, Dp514, Dp514a, Dp519, Dp523; Colbourne *et al.*, 2004). L'ADN d'une daphnie par lignée clonale a été extrait en utilisant 50 µl de solution d'extraction d'ADN QuickExtract (Epicentre Biotechnologies). Les réactions en chaîne de la polymérase (PCR) ont été effectuées dans un volume réactionnel de 12 µl contenant 10 ng d'ADN extrait, 1x de tampon PCR avec 25 nmol de MgCl₂, 0,5 unité de Taq polymérase, 2,5 nmol de chaque dNTP (nucléotides), 2 pmol d'amorce «forward» étiqueté des marqueurs fluorescents HEX, FAM ou TET (Alpha DNA) et 2 pmol d'amorce «reverse». Les programmes thermiques des PCR incluaient une phase initiale de dénaturation à 94°C pendant 3 min pour chaque marqueur microsatellite, suivie de 35 cycles thermiques successifs comprenant 3 phases, soit une phase de dénaturation de 45 s à 94°C, une phase d'hybridation de 60 s à 52°C pour Dp183, Dp502, Dp512, Dp514a, Dp519, Dp523 ou à 62°C pour Dp514 et une phase d'élongation de 60 s à 72°C. Les cycles se terminaient par une phase d'élongation finale à 72°C pendant 10 min. Les produits PCR ont été dénaturés à 95°C pendant 3 min avant de procéder à des migrations sur gel de polyacrylamide 6 % à 50 watts et 40°C pendant trois heures. Les allèles présents sur les gels ont été détectés avec un scanneur de fluorescence Hitachi modèle FMBIO III (Yokohama, Japon), puis analysés à l'aide du logiciel ImageAnalysis, version 3.0.0.21 (Miraibio).

Les microsatellites ont permis d'identifier la plupart des clones polyploïdes par la présence de trois allèles à un ou plusieurs loci, indiquant que ceux-ci sont triploïdes

(voir annexe 1 pour les génotypes des clones). Les niveaux de ploïdie des clones ont été confirmés par des données de taille de génome mesurée par cytométrie en flux; ces données provenant de l'étude de Vergilino *et al.* (2009). Six (6) clones diploïdes et huit (8) clones triploïdes ont été identifiés (tableau 1).

L'étude de Vergilino *et al.* (2009) fournit également de l'information sur l'origine du génome mitochondrial de clones du complexe *D. pulex* par des analyses phylogénétiques basées sur des séquences du gène mitochondrial NADH déshydrogénase, sous-unité 5 (*ND5*). L'analyse de la lactate déshydrogénase (*LDH*) permet de poser un diagnostic sur l'origine du génome nucléaire : *D. pulex* est homozygote pour l'allèle S, *D. pulicaria* est homozygote pour l'allèle F, alors que les hybrides entre ces deux espèces sont des hétérozygotes SF (Hebert *et al.*, 1993). Les données du génome mitochondrial (Vergilino *et al.*, 2009) et celles de la *LDH* (Vergilino et Dufresne, en préparation) étaient disponibles pour les clones utilisés dans cette étude et sont présentées dans le tableau 1.

2.3.3 Conditions de maintenance

Les clones ont été élevés dans des contenants de 1000 ml à l'intérieur de chambres environnementales (ThermoForma Diurnal Growth Chamber) à 10 et 20°C avec une luminosité continue de 24 h/jour. Un minimum de trois générations a été considéré pour enlever l'effet maternel et permettre l'acclimatation des daphnies à leurs nouvelles conditions (Lynch et Ennis, 1983). L'eau utilisée était changée toutes les deux

semaines. Les daphnies étaient nourries avec l'algue *Scenedesmus obliquus* deux fois par semaine à une concentration finale d'environ 300 000 cellules/l.

2.3.4 Consommation d'oxygène

La concentration d'oxygène dissous dans l'eau peut être facilement mesurée par l'utilisation d'une variante spectrophotométrique de la titration de Winkler (Broenkow et Cline, 1969; Roland *et al.*, 1999; Lemos *et al.*, 2003). Cette méthode a récemment été adaptée pour effectuer des mesures individuelles de consommation d'oxygène chez *D. magna* (Chopelet *et al.*, 2008).

Pour chaque température d'élevage (10 et 20°C), des mesures de consommation d'oxygène ont été effectuées à 10 et 20°C. Pour les daphnies acclimatées à 20°C, 14 clones du complexe *D. pulex* (6 diploïdes et 8 triploïdes) ont été utilisés pour les mesures à 10 et 20°C, tandis que pour celles acclimatées à 10°C, 12 clones ont été utilisés (6 diploïdes et 6 triploïdes; les clones K232 et K233 n'ont pas été utilisés vue leurs difficultés de croissance à 10°C). Préalablement aux mesures, des daphnies représentant la gamme complète de taille de chaque clone étaient isolées en évitant de sélectionner des individus avec des oeufs. Afin de s'assurer d'utiliser uniquement des daphnies ayant le tube digestif rempli, celles-ci étaient exposées à une concentration d'environ 1 000 000 cellules/l de *Scenedesmus obliquus* pendant deux heures avant la prise de mesure.

Pour chaque clone et chaque combinaison de mesure de consommation d'oxygène, 15 tubes Eppendorf de 2,0 ml fermés hermétiquement et contenant de l'eau stérile ont été utilisés. Un rinçage des daphnies dans l'eau stérile était préalablement effectué avant la mise en tube. Les daphnies étaient placés individuellement dans les tubes, sauf pour celles de petites tailles où trois individus étaient utilisés pour obtenir un changement de concentration d'oxygène mesurable. Les temps d'incubation ont été ajustés en fonction de la taille et de la température afin de rester au-delà de 80 % de saturation d'oxygène dissous dans le tube (Lemos *et al.*, 2003), mais également afin d'obtenir une consommation d'oxygène détectable. Pour les mesures à 20°C, les daphnies de petite et moyenne tailles ont respiré pendant 18 heures et celles de grande taille pendant 12 heures. Pour les mesures à 10°C, les daphnies de petite, moyenne et grande tailles ont respiré respectivement 24, 18 et 12 heures.

Après la période d'incubation, 1,5 ml de l'eau contenue dans chaque tube étaient prélevés à l'aide d'une seringue pour éviter tout contact avec l'oxygène de l'air ambiant, puis mélangés aux solutions suivantes en suivant la séquence suivante : 7 µl MnCl₂ (3 M) et 7 µl de NaOH (8 N) et NaI (4 M) dans un premier temps, puis 7 µl de H₂SO₄ (10 N) après la formation d'un précipité jaune (Chopelet *et al.*, 2008). L'absorbance de la solution jaune obtenue était alors mesurée à une longueur d'onde de 440 nm avec un spectrophotomètre UV/visible Ultrospec modèle 3100 pro. La relation entre l'absorbance de la solution jaune et la concentration d'oxygène a été déterminée suivant l'équation suivante :

$$\text{O}_2 \text{ (mg/l)} = 13,686 \times \text{Absorbance} - 0,6249$$

$$(r^2 = 0,9993; P < 0,001)$$

La relation existant entre l'absorbance de la solution jaune et la concentration d'oxygène a été construite selon la méthode décrite par Chopelet *et al.* (2008) impliquant la titration avec le thiosulfate.

L'oxygène consommé par une daphnie correspond à la différence de niveau d'oxygène contenue dans un tube contrôle et dans celui contenant la daphnie. Pour obtenir de mesures de consommation d'oxygène en fonction de la masse, les daphnies ont été mises à sécher à 60°C pendant une période de 24 heures. Leur masse sèche a été déterminée à l'aide d'une microbalance Mettler-Toledo modèle UMX 2 (précision de 0,1 µg).

2.3.5 Activité de la citrate synthase

Les mesures d'activité de la citrate synthase ont été effectuées chez les daphnies acclimatées à 10 et 20°C pour douze (12) clones du complexe *D. pulex* (6 diploïdes et 6 triploïdes; les clones K232 et K233 n'ont pas été utilisés).

Pour chaque température et chaque clone, les mesures ont été effectuées en triplicats si le nombre de daphnies disponible était suffisant. Pour chaque échantillon, 25 individus adultes étaient choisis aléatoirement, mis dans un tube eppendorf où le maximum d'eau était prélevé, puis pesés sur une microbalance Mettler modèle A200 (résolution 100 µg). Les échantillons frais ont été homogénéisés dans 1 ml d'un tampon d'homogénéisation refroidi sur glace (0,1 M de tampon sodium phosphate, 75 µM de MgSO₄, 0,15 % (m/v) de polyvinyl pyrrolidone et 0,2 % (v/v) de triton X-100; pH 8,4)

quatre fois durant 5s avec un homogénéisateur Tekmar. Les homogénats ont ensuite été centrifugés à 9300 g à 4°C pendant 4 minutes; le surnageant étant utilisé pour mesurer l'activité de la citrate synthase (Jose *et al.*, 2009).

L'activité de la citrate synthase a été mesurée à 20°C en utilisant un spectrophotomètre UV/visible Ultrospec modèle 3100 pro comportant un système de refroidissement du support à cuvette lié à un bain thermostaté. L'activité de chaque homogénat a été mesurée en duplicats et est exprimée en U/mg de protéines (U correspondant au nombre de μmol de substrat transformé par minute). Les conditions réactionnelles pour l'activité de la citrate synthase sont les suivantes : 100 mM de tampon imidazole-HCl (pH 8,0), 0,1 mM de 5,5'-Dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB), 0,1 mM d'acétyl CoA et 0,15 mM d'oxaloacétate. L'activité enzymatique a été mesurée durant 4 minutes suivant l'augmentation d'absorbance due à l'oxydation du DTNB à 412 nm ($\epsilon_{412} = 13,6 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) (Thibeault *et al.*, 1997).

Les protéines totales de chaque homogénat ont été dosées par la méthode de l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985).

2.3.6 Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés pour mesurer la consommation d'oxygène (modification spectrophotométrique de la titration de Winkler) proviennent de chez Laboratoire MAT (Beauport, Québec, Canada). Ceux utilisés pour les mesures

d'activité de la citrate synthase et de dosage de protéines proviennent de Sigma Chemical Co (St-Louis, Missouri, États-Unis).

2.3.7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant la procédure des modèles généraux linéaires (GLM) du logiciel SYSTAT 12.0 (SPSS inc., 2007). Au niveau des conditions d'application des GLM, la normalité des résidus a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov/Lilliefors et l'égalité des variances a été vérifiée avec le test de Levene. Pour satisfaire aux conditions d'application, toutes les variables quantitatives ont été transformées en logarithme naturel. Les données de consommation d'oxygène ont été comparées par des ANCOVA hiérarchiques à deux facteurs (ploïdie et clone(ploïdie)) et une variable concomitante (masse sèche). Les F-ratio liés à la ploïdie ont été redéfinis en utilisant la variance de clone(ploïdie) comme terme d'erreur. Deux ANCOVA ont été réalisées par température d'acclimatation (10 ou 20°C), soit une pour les données de consommation d'oxygène à 10°C et l'autre, pour celles à 20°C. Les pentes des régressions de consommation d'oxygène en fonction de la masse sèche des quatre conditions citées ci-haut ont été comparées par une ANCOVA à deux facteurs croisés (T° acclimatation et T° respiration) et une variable concomitante (masse sèche). Pour simplifier l'analyse, les facteurs ploïdie et clone(ploïdie) n'ont pas été intégrés à cette ANCOVA vue l'absence d'effet significatif de la ploïdie dans les quatre premières ANCOVA.

Au niveau des données d'activité de la citrate synthase (CS), l'ANOVA partiellement hiérarchique à trois facteurs (ploïdie, clone(ploïdie) et T° acclimatation) a été utilisée pour comparer les données de masse et celles de protéines totales. La masse était significativement corrélée avec l'activité de la CS. De ce fait, une ANCOVA partiellement hiérarchique à trois facteurs (ploïdie, clone(ploïdie) et T° acclimatation) et une variable concomitante (masse) a été utilisée pour comparer les données d'activité de la CS. Pour les trois analyses, les F-ratio liés à la ploïdie ont été redéfinis en utilisant la variance de clone(ploïdie) comme terme d'erreur. Lorsque possible, des tests de comparaisons multiples (Tukey) ont été effectués. Le seuil de signification utilisé pour tous les tests effectués dans cette étude est $p < 0,05$.

2.4 Résultats

2.4.1 Consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène à 10 et 20°C pour les clones de daphnies acclimatés à 10 et 20°C ne varie pas significativement entre les diploïdes et les triploïdes (figure 1; tableau 2). Sur la figure 1, la consommation d'oxygène à 20°C des daphnies acclimatées à 20°C est légèrement inférieure chez les individus triploïdes de plus grande taille que chez les diploïdes. Cependant, l'ANCOVA ne montre aucun effet significatif de la ploïdie sur la consommation d'oxygène à ce niveau (tableau 2). Les sources de variation testées dans les ANCOVA montrent des réponses similaires pour les quatre conditions testées (tableau 2). La consommation d'oxygène n'est pas influencée par le niveau de ploïdie ni par son interaction avec la masse, mais elle est toujours influencée très significativement ($p < 0,001$) par la masse et les clones (tableau 2).

Vue l'absence d'effet de la ploïdie sur la consommation d'oxygène et pour simplifier l'analyse, les facteurs ploïdie et clone(ploïdie) n'ont pas été intégrés dans la comparaison de la consommation d'oxygène selon les températures d'acclimatation et de respiration. L'ANCOVA montre que la consommation d'oxygène est influencée par la température de respiration ($F_{1, 671} = 359,857$; $p < 0,001$) et par son interaction avec la masse ($F_{1, 671} = 97,514$; $p < 0,001$). Elle n'est pas influencée par la température d'acclimatation ($F_{1, 671} = 1,640$; $p = 0,201$), $0,001$) mais par son interaction avec la masse ($F_{1, 671} = 4,631$; $p = 0,032$). La consommation d'oxygène est également influencée par la masse ($F_{1, 671} = 4767,794$; $p < 0,001$) et par l'interaction entre la température de respiration et celle d'acclimatation ($F_{1, 671} = 29,042$; $p < 0,001$). Au niveau de cette ANCOVA, les données ne respectaient pas les conditions d'application (la normalité des résidus et l'égalité des variances), mais elle a tout de même été utilisée vue la difficulté de procéder à d'autres types d'analyses statistiques sur ces données pour comparer la consommation d'oxygène selon les températures d'acclimatation et de respiration.

2.4.2 Masse et protéines totales

L'ANOVA effectuée au niveau de la masse des échantillons de daphnies (pour la mesure des protéines totales et de l'activité de la CS) montre que celle-ci est influencée par la température d'acclimatation ($F_{1, 41} = 25,536$; $p < 0,001$), mais pas par son interaction avec la ploïdie ($F_{1, 41} = 0,911$; $p = 0,362$). L'interaction entre la température d'acclimatation et clone(ploïdie) est légèrement au-dessus du seuil de signification ($F_{10, 41} = 1,967$; $p = 0,063$). La masse est également influencée par le clone ($F_{10, 41} = 5,340$; p

$< 0,001$), mais pas par la ploïdie ($F_{1, 41} = 0,363$; $p = 0,566$). Aucun clone ne présente de différence significative de leur masse entre les deux températures d'acclimatation. À 10°C , il n'y a pas de différence interclonale au niveau de la masse alors qu'à 20°C , la seule différence significative se situe entre les clones C88 et B141-201 (figure 2).

L'ANOVA effectuée au niveau des protéines totales montre que celles-ci sont influencées par la température d'acclimatation ($F_{1, 41} = 34,658$; $p < 0,001$), son interaction avec clone(ploïdie) ($F_{10, 41} = 2,656$; $p = 0,013$), mais pas avec son interaction avec la ploïdie ($F_{1, 41} = 0,017$; $p = 0,900$). Les protéines totales sont également influencées par le clone ($F_{10, 41} = 2,632$; $p = 0,014$), mais pas par la ploïdie ($F_{1, 41} = 0,080$; $p = 0,783$). Les protéines totales sont significativement plus élevées à 10°C qu'à 20°C pour les deux niveaux de ploïdie. À 20°C , il n'y a pas de différence interclonale au niveau des protéines totales alors qu'à 10°C , la seule différence significative se situe entre les clones K228 et A35-201 (figure 3).

2.4.3 Activité de la citrate synthase

L'ANCOVA effectuée au niveau de l'activité de la CS montre que celle-ci est influencée par la température d'acclimatation ($F_{1, 38} = 4,552$; $p = 0,039$), son interaction avec clone(ploïdie) ($F_{10, 38} = 9,919$; $p < 0,001$), mais pas avec son interaction avec la ploïdie ($F_{1, 38} = 0,073$; $p = 0,792$). L'activité de la CS est également influencée par le clone ($F_{10, 38} = 7,076$; $p < 0,001$), mais pas par la ploïdie ($F_{1, 38} = 0,122$; $p = 0,734$). De plus, l'activité de la CS est influencée par la masse ($F_{1, 38} = 262,820$; $p < 0,001$) et son interaction avec la température d'acclimatation ($F_{1, 38} = 4,536$; $p = 0,040$), mais pas avec son interaction avec la ploïdie ($F_{1, 38} = 0,073$; $p = 0,792$).

Malgré l'effet significatif de la température d'acclimatation sur l'activité de la CS, les valeurs de celle-ci ne diffèrent pas significativement selon la température pour les deux niveaux de ploïdie. De plus, K154 est le seul clone présentant une différence significative de l'activité de la CS entre 10 et 20°C. Plusieurs différences significatives interclonales sont notées. À 20°C, l'activité de la CS de K154 est significativement plus élevée que celles des clones K9, K52, K86 et K207, celle de B141-201 est significativement inférieure à celle de K92, K95 et A35-201 et celle de K52 est significativement inférieure à celle de K92. À 10°C, l'activité de la CS de K95 est significativement supérieure à celle de K86, K154, A17-200 et C88 et inférieure à celle de A35-201 et celle de K86 est significativement inférieure à celle de K9 et K92 (figure 4).

Tableau 1. Niveau de ploïdie, haplotype *ND5* (génom mitochondrial), génotype *LDH* (génom nucléaire) et localisation des clones du complexe *D. pulex* utilisés dans cette étude.

Clone	Ploïdie ¹	Haplotype <i>ND5</i> (ADNmt) ²	Génotype <i>LDH</i> (ADNnu) ³	Localisation
A17-200	2n	<i>pulex</i>	SS - <i>pulex</i>	Churchill, Manitoba, Canada
C88	2n	<i>pulex</i>	SS - <i>pulex</i>	Churchill, Manitoba, Canada
K52	2n	<i>pulex</i>	SF - hybride	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K86	2n	<i>pulex</i>	SF - hybride	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K92	2n	<i>pulex</i>	SF - hybride	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K207	2n	<i>pulicaria</i> (ouest)	FF - <i>pulicaria</i>	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K9	3n	<i>pulex</i>	SF - hybride	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K154	3n	<i>pulex</i>	SF - hybride	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
A35-201	3n	<i>middendorffiana</i> (Clade I)	SS - <i>pulex</i>	Churchill, Manitoba, Canada
B141-201	3n	<i>middendorffiana</i> (Clade I)	SF - hybride	Churchill, Manitoba, Canada
K233	3n	<i>middendorffiana</i> (Clade IIB)		Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K95	3n	<i>middendorffiana</i> (Clade III)	FF - <i>pulicaria</i>	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K228	3n	<i>middendorffiana</i> (Clade III)	SF - hybride	Kuujjuaraapik, Québec, Canada
K232	3n	<i>middendorffiana</i> (Clade III)	SF - hybride	Kuujjuaraapik, Québec, Canada

¹ Niveau de ploïdie déterminé à partir de microsatellites et de taille du génome (cytométrie en flux; Vergilino *et al.*, 2009).

² Données issues de Vergilino *et al.*, 2009.

³ Données issues de Vergilino et Dufresne (en préparation).

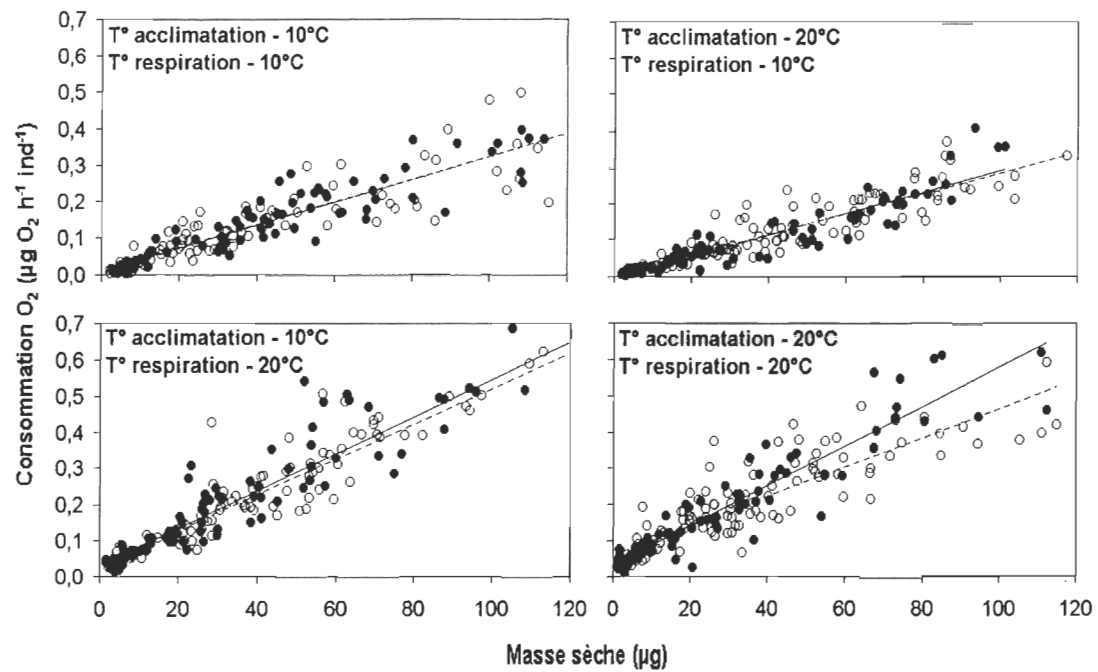


Figure 1. Consommation d'oxygène à 10 et 20°C des daphnies du complexe *D. pulex* diploïdes (cercles pleins) et triploïdes (cercles vides) acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujuaaraapik et Churchill (température d'acclimation - 10°C: 12 clones (6 diploïdes et 6 triploïdes); température d'acclimation - 20°C: 14 clones (6 diploïdes et 8 triploïdes)).

Tableau 2. Analyses de covariance hiérarchiques à deux facteurs (ploïdie et clone) sur la consommation d'oxygène de daphnies du complexe *D. pulex* provenant de Kuujjuarapik et Churchill. Les données ont été transformées en logarithme naturel.

Traitement	Source	dl	MS	F-ratio	p (valeur)
T° acclimatation - 10°C	ploïdie	1	0,143	0,275	0,612
T° respiration - 10°C	clone(ploïdie)	10	0,520	4,055	0,000
	masse	1	159,409	1242,369	0,000
	ploïdie x masse	1	0,173	0,332	0,577
	erreur	149	0,128		
T° acclimatation - 10°C	ploïdie	1	0,000	0,000	0,990
T° respiration - 20°C	clone(ploïdie)	10	0,421	5,822	0,000
	masse	1	107,871	1493,185	0,000
	ploïdie x masse	1	0,002	0,005	0,947
	erreur	162	0,072		
T° acclimatation - 20°C	ploïdie	1	0,000	0,000	0,994
T° respiration - 10°C	clone(ploïdie)	12	0,368	3,708	0,000
	masse	1	175,328	1765,649	0,000
	ploïdie x masse	1	0,005	0,013	0,912
	erreur	184	0,099		
T° acclimatation - 20°C	ploïdie	1	0,000	0,001	0,974
T° respiration - 20°C	clone(ploïdie)	12	0,285	3,508	0,000
	masse	1	110,289	1355,595	0,000
	ploïdie x masse	1	0,021	0,073	0,791
	Erreur	178	0,081		

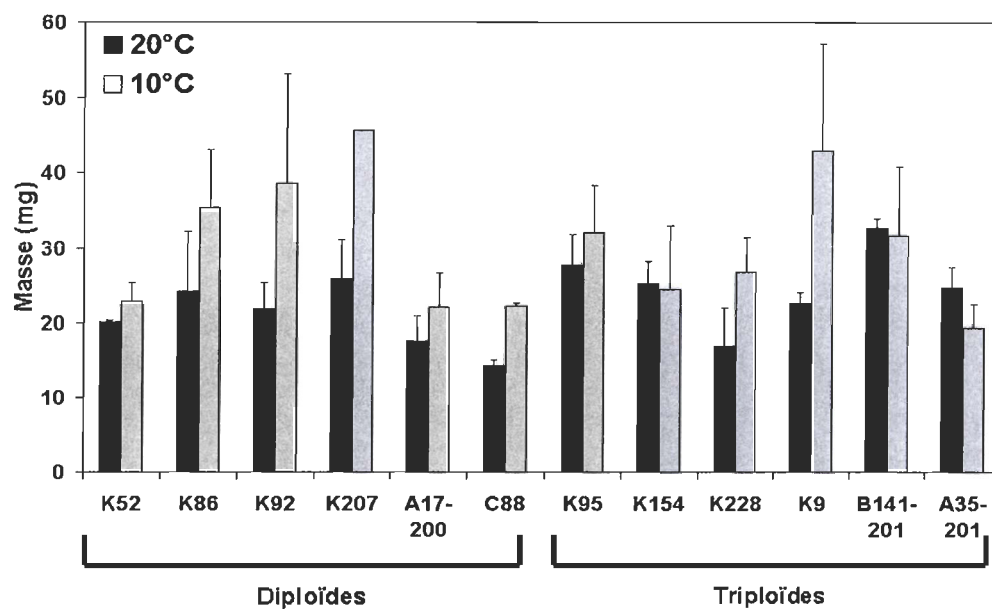


Figure 2. Moyenne ($\pm$ écart-type) de la masse (échantillons de 25 daphnies adultes pour mesure de l'activité de la citrate synthase) de clones du complexe *D. pulex* acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujuaapik et Churchill. (Les résultats des tests de comparaisons multiples liés à l'ANOVA partiellement hiérarchique à trois facteurs (ploïdie, clone(ploïdie) et T° acclimatation) sont décrits dans la section résultats).

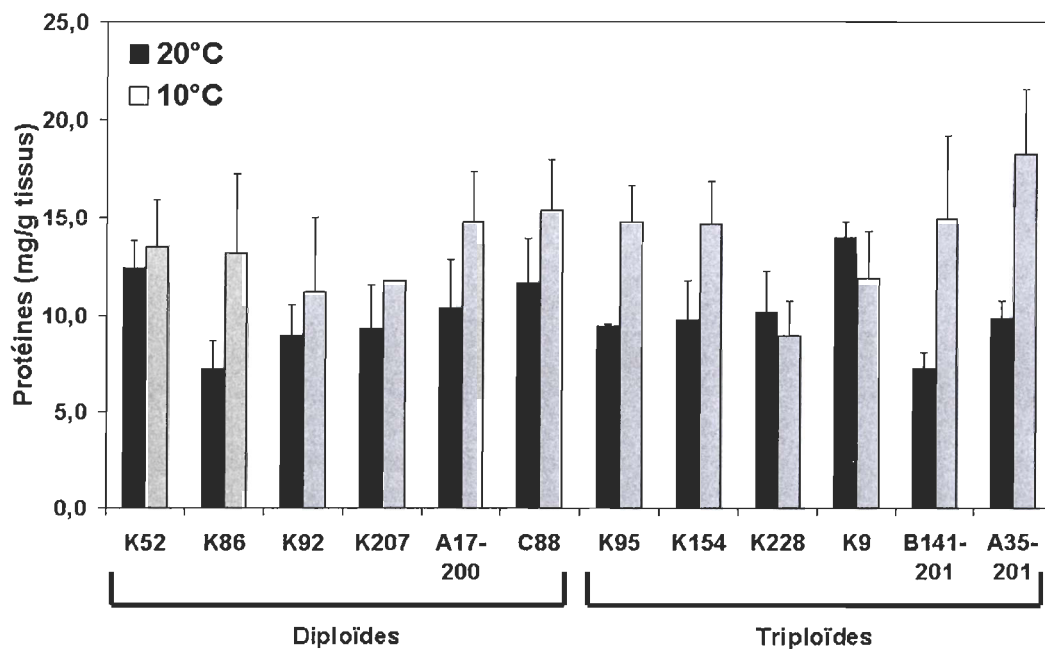


Figure 3. Moyenne ($\pm$ écart-type) des protéines totales (mg/g tissus) chez des clones du complexe *D. pulex* acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujjuaraapik et Churchill (Les résultats des tests de comparaisons multiples liés à l'ANOVA partiellement hiérarchique à trois facteurs (ploïdie, clone(ploïdie) et T° acclimation) sont décrits dans la section résultats).

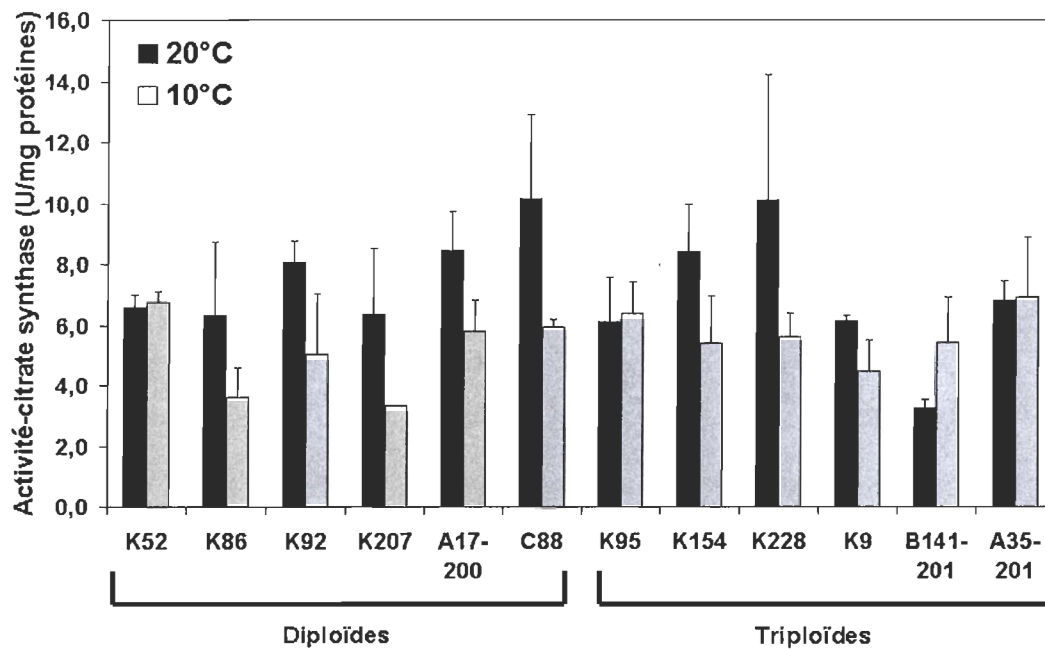


Figure 4. Moyenne ($\pm$ écart-type) de l'activité de la citrate synthase (U/mg protéines) chez des clones du complexe *D. pulex* acclimatés à 10 et 20°C provenant de Kuujuaapik et Churchill (Les résultats des tests de comparaisons multiples liés à l'ANCOVA partiellement hiérarchique à trois facteurs (ploïdie, clone(ploïdie) et T° acclimatation) et une variable concomitante (masse) sont décrits dans la section résultats).

2.5 Discussion

2.5.1 Comparaison des capacités aérobie des clones polyploïdes et diploïdes

2.5.1.1 *Consommation d'oxygène*

Les résultats des mesures de consommation d'oxygène et d'activité de la citrate synthase (CS) effectuées sur des clones de daphnies subarctiques diploïdes et polyploïdes ne révèlent aucun effet significatif de la polyploïdie sur le métabolisme. Contrairement à l'hypothèse émise au départ, les clones polyploïdes de cette étude n'ont pas une consommation d'oxygène supérieure à celle des diploïdes à 10°C et à 20°C, la ploïdie n'a également pas d'impact sur le métabolisme.

En ce qui a trait à l'effet de la polyploïdie sur la consommation d'oxygène, les études comparatives menées sur d'autres systèmes diploïde-polyploïde ne permettent pas d'arriver à un consensus. Au niveau des artémies, les souches polyploïdes sont plus tolérantes aux températures élevées à cause d'une augmentation moins importante de leur consommation d'oxygène tant au stade nauplii qu'au stade adulte (Varo *et al.*, 1991, 1998). Chez les geckos du genre *Heteronotia*, la souche polyploïde affiche un taux maximal de respiration supérieur à celui des souches parentales diploïdes (Kearney *et al.*, 2005). Ces performances métaboliques accrues chez les organismes polyploïdes ne sont donc pas généralisables. Mis à part ces deux exemples, plusieurs études comparatives n'ont pas détecté d'effet significatif de la polyploïdie sur la consommation d'oxygène. C'est le cas chez les grenouilles du genre *Hyla* (Kamel *et al.*, 1985), chez les salamandres du genre *Ambystoma* (Licht et Bogart, 1990), chez les lézards du genre *Cnemidophorus* (Cullum, 1997). Il en est de même pour plusieurs poissons dont la

polyploïdie a été induite, soit les salmonidés (stade adulte - Bernier *et al.*, 2004; stade juvénile - Atkins et Benfey, 2008 ; stades embryonnaire et larvaire - Oliva-Teles et Kaushik, 1987 ; 1990), les centrarchidés (*Pomoxis annularis* ; Parson, 1993) et les siluridés (*Silurus asotus*; Seol *et al.*, 2008).

2.5.1.2 *Activité de la citrate synthase*

Parallèlement aux données de consommation d'oxygène, l'activité de la citrate ne diffère pas selon le niveau de ploïdie, ce qui concorde avec les résultats d'une étude antérieure ayant comparé les capacités métaboliques de clones diploïdes et polyploïdes du complexe *D. pulex* sous diverses conditions de pH et de température en vérifiant l'activité de plusieurs enzymes liées au métabolisme dont la citrate synthase (Jose *et al.*, 2009).

L'intégration de plusieurs niveaux d'organisation biologique serait nécessaire à la compréhension des mécanismes intervenant dans l'adaptation thermique (Pörtner *et al.*, 2006). À ce niveau, pour faire un lien entre les adaptations thermiques métaboliques et les niveaux d'organisation supérieurs, une hypothèse a été développée par Pörtner (2001). Cette hypothèse stipule que la tolérance thermique des animaux est limitée par les niveaux d'oxygène disponible et par la capacité fonctionnelle des mitochondries et, consécutivement, celles des cellules et des tissus (au niveau des capacités ventilatoire et circulatoire) (Pörtner *et al.*, 2006; Pörtner *et al.*, 2007). Lorsque la tolérance thermique est limitée par le froid, les mitochondries ne parviennent plus à fonctionner efficacement et leur capacité à fournir de l'ATP est altérée (Pörtner *et al.*, 2006). Puisque les ectothermes des régions de latitude élevée doivent composer avec une

courte saison de croissance, ils doivent développer des mécanismes d'adaptation au froid leur permettant de contrebalancer les effets liés à la faible efficacité des mitochondries et d'augmenter la quantité d'énergie fournie par les cellules (Morley *et al.*, 2009). Un des mécanismes de thermocompensation permettant d'y parvenir est la prolifération mitochondriale, car la faible efficacité métabolique de chaque mitochondrie est compensée par leur plus grand nombre (Pörtner, 2002; Morley *et al.*, 2009).

Par des niveaux plus élevés d'activité de la citrate synthase chez les clones polyploïdes, on s'attendait à ce qu'ils soient mieux adaptés aux basses températures que les diploïdes. Cette hypothèse s'est avérée inexacte, donc il est improbable que la prolifération mitochondriale fasse partie de l'explication du succès évolutif de polyploïdes à des latitudes élevées.

2.5.2 Absence d'acclimatation thermique de la consommation d'oxygène

Dans un contexte de thermocompensation, on devrait s'attendre à ce que les clones de daphnies s'acclimatent aux nouvelles conditions thermiques auxquelles ils sont soumis. L'acclimatation d'un clone à une diminution de température devrait se traduire par une augmentation de ses capacités métaboliques pour contrecarrer les contraintes physiologiques liées au froid. Dans cette étude, les deux températures d'acclimatation (10 et 20°C) auxquelles les clones ont été soumis mènent à des niveaux de consommation d'oxygène équivalents que ce soit à une température de respiration de

10 ou de 20°C. De cette manière, aucun mécanisme de thermocompensation ne semble entrer en ligne de compte pour permettre l'acclimatation à une autre température.

Les populations de daphnies subarctiques sont intermittentes. L'émergence du stade planctonique est réglée pour survenir uniquement avec la mise en place de conditions environnementales favorables et ce, particulièrement au niveau de la photopériode et de la température (Stross, 1966; Davison, 1969; Schwartz et Hebert, 1987). Lorsque les conditions environnementales ne sont plus favorables, les daphnies produisent des œufs dormants appelés éphippies pour entrer en diapause (Cáceres, 1997). Dès le retour des conditions favorables, il y a éclosion d'éphippies et les traits d'histoire de vie permettent aux daphnies de recoloniser rapidement la colonne d'eau. Dans le cas des daphnies parthénogènes obligatoires, l'émergence d'un seul individu est alors suffisante pour la recolonisation.

La diapause récurrente chez les populations de daphnies pourrait remplacer la nécessité d'une adaptation thermique physiologique face aux changements de température. Chez *D. magna*, cette éventualité a été soulevée tant au niveau de l'étalement thermique du taux de croissance (Mitchell et Lampert, 2000) qu'au niveau de la tolérance thermique (Mitchell *et al.*, 2004). Au lieu de s'acclimater aux changements de température survenant dans leur territoire, les daphnies entrent en diapause jusqu'au retour des conditions thermiques favorisant leur croissance et leur reproduction. Cette situation favoriserait également le maintien d'une diversité phénotypique liée à la réduction du temps pendant lequel des interactions compétitives se produisent (Mitchell *et al.*, 2004).

Dans le cas des faibles taux de reproduction des clones polyploïdes K232 et K233 à 10°C, il est probable que les conditions de maintenance auxquelles ils étaient soumis leur aient causé un stress trop important pour qu'ils puissent produire des néonates en quantité importante (ce qui a conséquemment empêché leur utilisation pour certaines mesures puisqu'ils étaient en nombre insuffisant). À ce niveau, ces clones n'ont pas démontré une plasticité phénotypique leur permettant de croître dans ces conditions.

2.5.3 Hypothèse alternative à la présence des polyploïdes en Arctique

Les résultats de cette étude montrent que la distribution des clones polyploïdes de daphnies subarctiques n'est pas liée à un métabolisme aérobie plus performant que celui des clones diploïdes à basse température. À ce niveau, il y a une hypothèse alternative quant au patron de distribution observé chez les clones polyploïdes.

Durant la dernière glaciation du Pléistocène, certaines régions sont demeurées libres de glace, formant ainsi des refuges glaciaires pour plusieurs espèces animales et végétales. Au niveau du complexe *D. pulex*, le retrait de glaces aurait créé des zones de contact entre les différents refuges glaciaires. Cette situation aurait favorisé des événements récurrents d'hybridation entre différentes espèces de daphnies et subséquemment la formation de polyploïdes (Jose et Dufresne, 2010). De ce fait, les clones polyploïdes sont susceptibles d'avoir été les premiers à coloniser les nouveaux habitats vacants formés après le retrait des glaces.

Chez les organismes aquatiques tels que les daphnies, la dispersion se fait via le transport passif de propagules dormants (éhippies) (Hairston et Cáceres, 1996; Cáceres, 1997). Ceux-ci sont résistants aux conditions environnementales sévères et permettent le transport sur des distances relativement longues par le vent, l'eau ou des vecteurs animaux tels que les oiseaux et les insectes aquatiques (De Meester, 1996; De Meester *et al.*, 2002). Les daphnies ont par conséquent un potentiel de dispersion significatif qui n'est pas limitant au niveau de la composition de populations. En effet, la distribution couvrant plus de 1000 km de certaines lignées clonales obligatoirement parthénogènes du complexe *D. pulex* confirme ce potentiel de dispersion (Weider et Hobaek, 1994). Parallèlement à la capacité de dispersion, les daphnies obligatoirement parthénogènes ont un bon potentiel de colonisation. Puisque l'éclosion d'un seul œuf dormant est suffisante pour générer une population, une colonisation rapide des habitats nouvellement disponibles est possible (De Meester *et al.*, 2002).

Par les capacités de dispersion et de colonisation des daphnies obligatoirement parthénogènes, un pool régional de génotypes préadaptés est disponible pour la colonisation des habitats nouvellement vacants (De Meester, 1996; De Meester *et al.*, 2002). Selon les conditions environnementales de l'habitat, le clone le mieux préadapté à celles-ci colonisera l'étang en premier. Ce clone produira une importante banque de propagules dormants qui constitue un puissant tampon contre les génotypes envahisseurs en maintenant la population à des tailles élevées. Par conséquent, le premier clone a tendance à monopoliser l'habitat par de forts effets fondateurs (De Meester *et al.*, 2002).

Dans cette optique, il est possible d'émettre une hypothèse sur la distribution des clones polyploïdes de daphnies au niveau des latitudes élevées. Si les clones polyploïdes de daphnies sont les premiers à avoir colonisé certains étangs subarctiques et arctiques suite au retrait des glaces, il est possible que leur présence soit liée au fait qu'ils aient monopolisé l'habitat disponible.

2.5.4 Variabilité interclonale phénotypique et génétique

Bien qu'il n'y ait pas d'effet significatif du niveau de ploïdie sur le métabolisme dans cette étude, les analyses effectuées pour la consommation d'oxygène (figure 1 et tableau 2) et l'activité de la citrate synthase (figure 4 et section 2.4.3 des résultats) montrent un effet très hautement significatif du clone tant chez les clones diploïdes que chez les clones polyploïdes. À l'intérieur de chaque niveau de ploïdie, on dénote donc une variabilité phénotypique au niveau du métabolisme aérobie. Parallèlement, les données disponibles sur les génomes mitochondrial et nucléaire des clones utilisés dans cette étude montrent une importante diversité génétique (tableau 1). Vue l'importance capitale de la mitochondrie dans le métabolisme aérobie, la variabilité au niveau du génome mitochondrial se traduit en variabilité au niveau des réponses phénotypiques associées à ce paramètre. À ce niveau, six des huit clones polyploïdes de cette étude ont un haplotype mitochondrial (ND5) liée à l'espèce *D. middendorffiana*, soit les clones A35-201, B141-201, K233, K95, K228, K232. Cependant, K9 et K154 sont des clones polyploïdes ayant un haplotype mitochondrial lié à *D. pulex*; ils sont donc des clones polyploïdes du complexe *D. pulex*, mais ils n'appartiennent pas à l'espèce *D. middendorffiana* (Vergilino *et al.*, 2009). La variabilité phénotypique du métabolisme

entre ces deux types de clones polyploïdes du complexe *D. pulex* est probablement liée en partie à leur divergence de génome mitochondrial.

Pour minimiser les variations de métabolisme associées aux différences d'haplotypes mitochondriaux, il serait approprié de comparer des clones de daphnies diploïdes et polyploïdes possédant des génomes mitochondriaux apparentés. En minimisant cette variabilité, d'éventuelles différences de métabolisme entre les clones diploïdes et polyploïdes seraient plus facilement détectables et attribuables au niveau de ploïdie.

La théorie «frozen niche variation» (FNV) soutient que l'origine multiple des asexués contribue à la formation de clones dont le génotype des ancêtres parentaux reste figé dans le temps, ce qui confère une spécialisation de niche écologique des différents clones (Vrijenhoek, 1979; 1984). La situation des daphnies obligatoirement parthénogènes du complexe *D. pulex* pourrait concorder avec cette théorie (De Meester, 1996). Sans phase de reproduction sexuée, il n'y a pas de brassage génétique des populations pouvant mener à des adaptations locales. Conséquemment, un clone obligatoirement parthénogène colonise un étang avec succès parce qu'il est préadapté aux conditions de celui-ci (De Meester, 1996; De Meester *et al.*, 2002). La variabilité phénotypique au niveau du métabolisme des clones de cette étude suggère que le pool régional de daphnies obligatoirement parthénogènes de la région subarctique lui permettra de survivre aux effets des changements thermiques. Vue la diversité métabolique des clones, ceux qui sont le mieux adaptés aux nouvelles conditions

environnementales prendront la niche écologique de clones dont le fitness aura diminué avec le changement des conditions.

2.6 Remerciements

Cette étude a été supportée par une subvention de recherche du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et par une subvention d'équipement de la Fondation canadienne pour l'innovation (FCI) détenues par France Dufresne. Nous tenons à remercier Roland Vergilino et Pierre Rioux pour l'aide apportée au niveau de la mesure de l'activité de la citrate synthase et également Alain Caron, pour l'aide apportée au niveau des analyses statistiques. Thierry Ratté a été supporté financièrement par le CRSNG et le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

CHAPITRE III

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la polyploïdie sur le métabolisme de daphnies subarctiques du complexe *D. pulex* afin de trouver une explication relative à la distribution des polyploïdes dans les régions de latitudes élevées. Pour ce faire, des mesures de consommation d'oxygène à 10 et 20°C ont été effectuées sur des clones diploïdes et polyploïdes acclimatés à 10 et 20°C provenant des régions subarctiques de Kuujuaapik (Qc, Canada) et de Churchill (Mn, Canada). L'activité de la citrate synthase a été mise en parallèle avec les données de respiration. Les résultats montrent l'absence d'effet de la polyploïdie sur les capacités métaboliques des daphnies de l'étude. Cependant, les daphnies des deux niveaux de ploïdie montrent une grande variabilité interclonale pouvant s'expliquer par la diversité de leurs génomes nucléaire et mitochondrial.

Dans cette étude, la grande variabilité mitochondriale des clones de daphnies du complexe *D. pulex* pour les deux niveaux de ploïdie se traduisait par une variabilité phénotypique du métabolisme (consommation d'oxygène et activité de la citrate synthase). De ce fait, si une part importante de la variation du métabolisme des clones est causée par des différences au niveau mitochondrial, il serait avvenu d'utiliser des clones ayant des génomes mitochondriaux plus homogènes. À ce niveau, les analyses phylogénétiques de Vergilino et Dufresne (sous presse) ont permis le regroupement de clones diploïdes et polyploïdes (dont ceux de cette étude) ayant des génomes apparentés. Il serait alors possible de refaire une comparaison des capacités

métaboliques en utilisant des clones diploïdes et polyploïdes génétiquement apparentés de daphnies subarctiques du complexe *D. pulex*, ce qui permettrait possiblement de mieux cerner des différences potentielles de métabolisme dues au niveau de ploïdie.

Une hypothèse stipule que le possible avantage sélectif des organismes polyploïdes des régions de latitude élevée serait basé sur la plus grande taille de leurs cellules (Dufresne et Hebert, 1998). Pour tenter d'exploiter cette hypothèse au niveau des daphnies, il faudrait vérifier si les clones polyploïdes ont réellement des cellules de plus grande taille que les diploïdes. Pour les clones du complexe *D. pulex* utilisés dans cette étude, des analyses microsatellites ont confirmé que les clones polyploïdes sont triploïdes ($3n$) (Vergilino *et al.*, 2009). De plus, des analyses de cytométrie en flux ont permis de mesurer le contenu total d'ADN nucléaire (*2C-value*) de chaque clone, confirmant ainsi que les clones triploïdes du complexe *D. pulex* utilisés ont réellement une taille de génome supérieure à celle des clones diploïdes (Vergilino *et al.*, 2009). Puisque les clones triploïdes ont une plus grande taille de génome que les diploïdes, on devrait s'attendre à ce qu'ils aient des cellules de plus grande taille que ces derniers (Gregory, 2001). Il serait important de confirmer cette possibilité, car si les clones polyploïdes de daphnies n'ont pas de plus grandes cellules que les diploïdes, l'hypothèse d'un avantage sélectif lié à la taille des cellules n'est plus valide.

Le facteur expliquant la distribution des daphnies polyploïdes n'impliquant pas directement le métabolisme, d'autres avenues de recherche pourraient être explorées.

Au cours de cette étude, nous avons tenté de trouver un avantage évolutif à la polyploïdie pour les organismes des régions de latitude élevée. Pour y parvenir, les capacités métaboliques de clones diploïdes et polyploïdes de daphnies du complexe *D. pulex* ont été évaluées au niveau du stade planctonique adulte, mais celles-ci n'ont pas permis de détecter de différences métaboliques entre les niveaux de ploïdie. De ce fait, il serait intéressant de considérer le stade de dormance des daphnies. Quelques études montrent que le taux d'éclosion des éphippies est variable. Weider et Hebert (1987) ont montré que certains clones obligatoirement parthénogènes du complexe *D. pulex* provenant de la région de Churchill au Manitoba avaient des taux de succès d'éclosion variables selon la salinité. De plus, le développement de méthodes d'éclosion des éphippies de *D. pulex* ont permis de constater que les éphippies des clones de daphnies arctiques requièrent une température d'éclosion plus basse que les clones des régions plus chaudes (Schwartz et Hebert, 1987). Face à la variabilité du taux d'éclosion des œufs dormants, il serait intéressant de vérifier si les clones polyploïdes ont une température d'éclosion plus basse de leurs éphippies que les diploïdes ou s'ils ont un meilleur succès d'éclosion à basse température. Alternativement, l'observation de daphnies ovigères très rapidement après la fonte des glaces suggère également une possibilité de survie du stade planctonique sous la glace (France Dufresne, communication personnelle).

À faible température, les polyploïdes atteignent la maturité plus hâtivement que les diploïdes, ce qui pourrait refléter un taux de croissance supérieur dans cette situation (Dufresne et Hebert, 1998). Puisqu'il semble y avoir une différence au niveau du taux de

croissance, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de synthèse protéique selon le niveau de ploïdie.

Des variations au niveau de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) peuvent être impliquées au niveau du taux de croissance. D'abord, le nombre de copies d'ADNr varie en fonction de la taille du génome (Prokopowich *et al.*, 2003). Les polyploïdes ayant une taille de génome supérieure aux diploïdes, ceux-ci possèderaient plus de copies d'ADNr. Les portions codantes de l'ADNr sont séparées par des espaceurs intergéniques (IGS) dont la longueur est variable entre les populations et les individus (Gorokhova *et al.*, 2002; Weider *et al.*, 2005a); cette variabilité de longueur ayant été observée sur les clones utilisés dans notre étude. L'espaceur intergénique est composé de répétitions de 330 paires de base chez *Daphnia* et chacune de celles-ci comporterait des éléments régulateurs de la transcription de l'ADNr, soit un promoteur, un activateur et un terminateur (Gorokhova *et al.*, 2002). Une longueur accrue de IGS favoriserait par conséquent une transcription accrue et des meilleurs taux de croissance (Gorokhova *et al.*, 2002; Weider *et al.*, 2004). La longueur d'IGS a été corrélée avec le taux de croissance chez *D. pulex*, *D. pulicaria* et *D. magna* en présence suffisante de phosphore (Gorokhova *et al.*, 2002; Weider *et al.*, 2004). Par conséquent, il serait intéressant de comparer le nombre de copies d'ADNr et la longueur d'IGS chez des clones de daphnies diploïdes et triploïdes afin d'évaluer leur capacité potentielle de synthèse protéique et ce, en couplant ces données avec des mesures de croissance à températures faible et élevée.

Chez plusieurs espèces animales et végétales, l'Arctique a été une source facilitant la formation d'hybrides polyploïdes. Avec le réchauffement climatique, le contact entre des espèces venant du sud et celles des régions arctiques provoque la formation d'hybrides à un rythme rapide, ce qui entraîne la formation d'hybrides mésadaptés (Kelly *et al*, 2010). Cette situation liée à l'homme risque de contribuer à l'accélération de la disparition d'espèces venant du Nord. Alors que les mécanismes d'adaptation expliquant le succès évolutif des polyploïdes en Arctique ne sont pas encore résolus, le réchauffement climatique risque d'en faire disparaître un nombre important bien avant qu'ils nous aient révélé leurs secrets.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, K.L., R. Cronn, R. Percifield et J.F. Wendel. 2003. «Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing». **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100: 4649-4654.
- Aguilera, X., J. Mergeay, A. Wollebrants, S. Declerck et L. De Meester. 2007. «Asexuality and polyploidy in *Daphnia* from the tropical Andes». **Limnol. Oceanogr.** 52(5): 2079-2088.
- Atkins, M.E. et T.J. Benfey. 2008. «Effect of temperature on routine metabolic rate in triploid salmonids». **Comp. Biochem. Physiol. A** 149: 157-161.
- Beaton, M.J. et P.D.N. Hebert. 1988. «Geographic parthenogenesis and polyploidy in *Daphnia pulex* Leydig». **Am. Nat.** 132:837-845.
- Berges, J.A. et J.S. Ballantyne. 1991. «Size scaling of whole-body maximal enzyme activities in aquatic crustaceans». **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 48: 2385-2394.
- Bernier, N.J., C.J. Brauner, J.W. Heath et D.J. Randall. 2004. «Oxygen and carbon dioxide transport during sustained exercise in diploid et triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)». **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 61: 1797-1805.
- Broenkow, W.W. et J.D. Cline. 1969. «Colorimetric determination of dissolved oxygen at low concentrations». **Limnol. Oceanogr.** 14: 450-454.
- Cáceres, C.E. 1997. «Dormancy in the invertebrates». **Invert. Biol.** 116: 371-383.

- Cavalier-Smith, T. 1978. «Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of DNA C-value paradox». **J. Cell. Sci.** 34: 247-278.
- Chopelet, J., P.U. Blier et F. Dufresne. 2008. «Plasticity of growth rate and metabolism in *Daphnia magna* populations from different thermal habitats». **J. Exp. Biol.** 309A: 553-562.
- Chown, S.L. et K.J. Gaston. 2000. «Exploring links between physiology and ecology at macro-scales : the role of respiratory metabolism in insects». **Biol. Rev.** 74: 87-120.
- Clarke, A. 1991. «What is cold adaptation and how should we measure it ?». **Am. Zool.** 31: 81-92.
- Colbourne, J.K., B. Robison, K. Bogart et M. Lynch. 2004. «Five hundred and twenty-eight microsatellite markers for ecological genomic investigations using *Daphnia*». **Mol. Ecol. notes** 4: 485-490.
- Comai, L. 2005. «The advantages and disadvantages of being polyploid». **Nat. Rev. Genet.** 6: 836-846.
- Cullum, A.J. 1997. «Comparisons of physiological preformance in sexual and asexual whiptail lizards (genus *Cnemidophorus*): implications for the role of heterozygosity». **Am. Nat.** 150(1): 24-47.

- Davison, J. 1969. «Activation of the ephippial egg of *Daphnia pulex*». **J. Gen. Physiol.** 53(5):562-575.
- De Meester, L. 1996. «Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations : Patterns and processes». **Ecoscience** 4(3): 385-399.
- De Meester, L., A. Gomez, B. Okamura et K. Schwenk. 2002. «The Monopolization Hypothesis and dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms». **Acta Oecologica** 23: 121-135.
- Dufresne, F. et P.D.N. Hebert. 1994. «Hybridization and origins of polyploidy». **Proc. R. Soc. Lond. B** 258: 141-146.
- Dufresne, F. et P.D.N. Hebert. 1995. «Polyploidy and clonal diversity in an arctic cladoceran». **Heredity** 75: 45-53.
- Dufresne, F. et P.D.N. Hebert. 1997. «Pleistocene glaciations and polyphyletic origins of polyploidy in an arctic cladoceran». **Proc. R. Soc. Lond. B** 264: 201-206.
- Dufresne, F. and P.D.N. Hebert. 1998. «Temperature-related differences in life-history characteristics between diploid and polyploid clones of the *Daphnia pulex* complex». **Ecoscience** 5(4): 433-437.
- Frankham, R., J.D. Ballou et D.A. Briscoe. 2002. **Introduction to Conservation Genetics**, 1ère édition. Cambridge, Royaume-Uni: Cambridge University Press. pp.254-308.

- Galitski, J., A.J. Saldanha, C.A. Styles, E.S. Lander et G.R. Fink. 1999. «Ploidy regulation of gene expression». **Science** 285: 251-254.
- Gillooly, J.F., J.H. Brown, G.B. West, V.M. Savage et E.L. Charnov. 2001. «Effects of size and temperature on metabolic rate». **Science** 293: 2248-2251.
- Gorokhova, E., T.E. Dowling, L.J. Weider, T.J. Crease et J.J. Elser. 2002. «Functional and ecological of rDNA intergenic spacer variation in a clonal organism under divergent selection for production rate». **Proc. R. Soc. Lond. B.** 269: 2373-2379.
- Gregory, T.R., P.D.N. Hebert et J. Kolasa. 2000. «Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods». **Heredity** 84: 201-208.
- Gregory, T.R. 2001. «Coincidence, coevolution or causation ? DNA content, cell size, and the C-value enigma». **Biol. Rev.** 76: 65-101.
- Gregory, T.R. 2002. «Genome size and developmental complexity». **Genetica** 115: 131-145.
- Gregory, T.R. et B.K. Mable. 2005. «Polyploïdie in animals». Dans Gregory, T.R. (éd.). **Evolution of the genome**. San Diego, États-Unis: Elsevier, p. 427-517.
- Guderley, H.E. et P. Blier. 1988. «Thermal acclimation in fish : conservative and labile properties of swimming muscle». **Can. J. Zool.** 66: 1105-1115.

- Guderley, H.E. 2004. «Metabolic response to low temperature in fish muscle». **Biol. Rev.** 79: 409-427.
- Hairston, N.G. et C.E. Cáceres. 1996. «Distribution of crustacean diapause : micro- and macroevolutionary pattern and process». **Hydrobiol.** 320: 27-44.
- Hebert, P.D.N. et M.J. Beaton. 1993. **Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis : a practical handbook**. Beaumont, États-Unis: Helena Laboratories.
- Hebert, P.D.N., S.S. Schwartz, R.D. Ward et T.L. Finston. 1993. «Macrogeographic patterns of breeding system diversity in the *Daphnia pulex* group. I. Breeding systems of Canadian populations». **Heredity** 70: 148-161.
- Hochachka, P.W. et G.N. Somero. 1984. **Biochemical adaptations**. New Jersey, États-Unis: Princeton University Press. 538 p.
- Hochachka, P.W. et G.N. Somero. 2002. **Biochemical adaptations – mechanism and process in physiological evolution**. New York, États-Unis: Oxford University Press. 466 p.
- Jose, C., E. Hébert Chatelain et F. Dufresne. 2009. «Low flexibility of metabolic capacity in subarctic and temperate cytotypes of *Daphnia pulex*». **J. Therm. Biol.** 34: 70-75.

- Jose, C. et F. Dufresne. 2010. «Differential survival among genotypes of *Daphnia pulex* differing in reproductive mode, ploidy level, and geographic origin». **Evol. Ecol.** 24: 413-241.
- Kamel, S., J.E. Marsden et F.H. Pough. 1985. «Diploid and tetraploid grey treefrogs (*Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*) have similar metabolic rates». **Comp. Biochem. Physiol. A** 82: 217-220.
- Kearney, M. 2005. «Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis». **TREE** 20(9): 495-502.
- Kearney, M., R. Wahl et K. Autumn. 2005. «Increased capacity for sustained locomotion at low temperature in parthenogenetic geckos of hybrid origin». **Physiol. Biochem. Zool.** 78(3): 316-324.
- Kelly, B.P., A. Whiteley et D. Tallmon. 2010. «The Arctic melting pot». **Nature** 468: 891.
- Le Comber, S.C. et C. Smith. 2004. «Polyploidy in fishes: patterns and processes». **Biol. J. Linn. Soc.** 82: 431-442.
- Leggatt, R.A. et G.K. Iwama. 2003. «Occurrence of polyploidy in the fishes». **Rev. Fish Biol. Fisher.** 13: 237-246.

- Lemos, D., R.L.V. Jorge et V.N. Phan. 2003. «Simultaneous measurement of oxygen consumption and ammonia-N excretion in embryos and larvae of marine invertebrates». **Comp. Biochem. Physiol. A** 136: 321-328.
- Levin, D.A. 1983. «Polyploidy and novelty in flowering plants». **Am. Nat.** 122: 1-25.
- Licht, J.E. et J.P. Bogart. 1990. «Comparative rates of oxygen consumption and water loss in diploid and polyploid salamanders (Genus *Ambystoma*)». **Comp. Biochem. Physiol. A** 97(4): 569-572.
- Lundmark, M. 2006. «Polyploidization, hybridization and geographical parthenogenesis». **TREE** 21(1): 9.
- Lundmark, M. et A. Saura. 2006. «Asexuality alone does not explain the success of clonal forms in insects with geographical parthenogenesis». **Hereditas** 143: 23-32.
- Lynch, M. et R. Ennis. 1983. «Resource availability, maternal effects and longevity». **Exp. Gerontol.** 18: 147-165.
- Lynch, M. et A. Force. 2000. «The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization». **Genetics** 154: 459-473.
- Masterson, J. 1994. «Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms». **Science** 264: 421-423.

- Maxime, V. 2008. «The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish». **Fish Fish.** 9: 67-78.
- McLaren, I.A., J.-M. Sévigny et C.J. Corkett. 1988.«Body size, development rates, and genome size among calanus species». **Hydrobiologia** 167/168: 275-284.
- Mitchell, S.E. et W. Lampert. 2000. «Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankton, *Daphnia magna*». **J. Evol. Biol.** 13: 371-382.
- Mitchell, S.E., J. Halves et W. Lampert. 2004. «Coexistence of similar genotypes of *Daphnia magna* in intermittent populations : response to thermal stress». **Oikos** 106: 469-478.
- Morley, S.A., G.J. Lurman, J.N. Skepper, H.-O. Pörtner et L.S. Peck. 2009. «Thermal plasticity of mitochondria : A latitudinal comparison between Southern Ocean molluscs». **Comp. Biochem. Physiol. A** 152: 423-430.
- Muller, H.J. 1925. «Why polyploidy is rarer in animals than in plants». **Am. Nat.** 59: 346-353.
- Oliva-Teles, A. et S.J. Kaushik. 1987. «Nitrogen and energy metabolism during the early ontogeny of diploid and triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)». **Comp. Biochem. Physiol. A** 87: 157-160.
- Oliva-Teles, A. et S.J. Kaushik. 1990. «Effect of temperature on utilization of endogenous energy reserves during embryonic development of diploid and triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)». **Aquaculture** 84: 373-382.

- Orr, H.A. 1990. «"Why polyploidy is rarer in animals than in plants" revisited». **Am. Nat.** 136: 759-770.
- Osborn, T.C., J.C. Pires, J.A. Birchler, D.L. Auger, Z.J. Chen, H.-S. Lee, L. Comai, A. Madlung, R.W. Doerge et R.A. Martienssen. 2003. «Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids». **Trends Genet.** 19(3): 141-147.
- Otto, S.P. et J. Whitton. 2000. «Polyploid incidence and evolution». **Annu. Rev. Genet.** 34: 401-437.
- Otto, S.P. 2003. «In polyploids, one plus one not equal two». **TREE** 18(9): 431-433.
- Otto, S.P. 2007. «The evolutionary consequences of polyploidy». **Cell** 131: 452-462.
- Parson, G.R. 1993. «Comparison of triploid and diploid white crappies». **T. Am. Fish. Soc.** 122(2): 237-243.
- Paul, R.J., M. Colmorgen, S. Hüller, F. Tyroller et D. Zinkler. 1997. «Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods». **J. Comp. Physiol. B** 167: 399-408.
- Piferrer, F., A. Beaumont, J.C. Falguière, M. Flajshans, P. Haffray et L. Colombo. 2009. «Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvment and genetic containment». **Aquaculture** 293: 125-156.

- Pörtner, H.-O. 2001. «Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals». **Naturwissenschaften** 88: 137-146.
- Pörtner, H.-O. 2002. «Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms». **J. Exp. Biol.** 205: 2217-2230.
- Pörtner, H.-O., A.F. Bennett, F. Bozinovic, A. Clarke, M.A. Lardies, M. Lucassen, B. Pelster, F. Schiemer et J.H. Stillman. 2006. «Trade-offs in thermal adaptation : the need for a molecular to ecological integration». **Physiol. Biochem. Zool.** 79(2): 295-313.
- Pörtner, H.-O., L. Peck et G. Somero. 2007.«Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms : an integrative view». **Phil. Trans. R Soc. B** 362: 2233-2258.
- Prokopowich, C.D., T.R. Ryan et T.J. Crease. 2003. «The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes». **Genome** 46: 48-50.
- Roland, F., N.F. Caraco et J.J. Cole. 1999. «Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: Evaluation of interference from color and turbidity». **Limnol. Oceanogr.** 44(4): 1148-1154.
- Schwartz, S.S. et P.D.N. Hebert. 1987.«Methods of activation of the resting eggs of *Daphnia*». **Freshw. Biol.** 17(2): 373-379.

- Seol, D.W., S.Y. Im, W.J. Hur, M.O. Park, D.S. Kim, J.Y. Jo et I.S. Park. 2008. «Haematological parameters and respiratory function in diploid and triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus*». **Genes Genom.** 30(3): 205-213.
- Simcic, T. et A. Brancelj. 1997. «Electron transport system (ETS) activity and respiration rate in five *Daphnia* species at different temperatures». **Hydrobiol.** 360: 117-125.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner et M.D. Provenzano. 1985. «Measurement of protein using bicinchoninic acid». **Ann. Biochem.** 150: 76-85.
- Stebbins, G.L. 1950. **Variation and evolution in plants.** New york, États-Unis: Columbia University Press.
- Stebbins, G.L. 1971. **Chromosomal variation in higher plants.** Londres, Royaume-Uni: Edward Arnold Press.
- St-Pierre, J., P.M. Charest et H.E. Guderley. 1998. «Relative contribution of quantitative et qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*». **J. Exp. Biol.** 201: 2961-2970.
- Stross, R.G. 1966. «Light and temperature requirements for diapause development and release in *Daphnia*». **Ecology** 47(3): 368-374.
- SPSS inc. 2007. **SYSTAT version 12.0.** Chicago, Illinois, 60606-6307.

- Thibeault, M., P.U. Blier et H. Guderley. 1997. «Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». **Fish Physiol. Biochem.** 16: 139-155.
- Vandel, A. 1928. «La parthénogénèse géographique: contribution à l'étude biologique et cytologique de la parthénogénèse naturelle». **Bull. Biol. Fr. Belg.** 74: 164-281.
- Varo, I., A.C. Taylor, J.C. Navarro et F. Amat. 1991. «Effects of temperature and oxygen tension (P_{O_2}) on oxygen consumption rates of nauplii of different *Artemia* strains». **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 76: 25-31.
- Varo, I., A.C. Taylor et F. Amat. 1998. «The effects of temperature and oxygen tension (P_{O_2}) on the oxygen consumption rates of adults of different *Artemia* strains». **Comp. Biochem. Physiol. A** 120: 385-390.
- Vergilino, R., C. Belzile et F. Dufresne. 2009. «Genome size evolution and polyploidy in the *Daphnia pulex* complex (Cladocera: Daphniidae)». **Biol. J. Linn. Soc.** 97: 68-79.
- Vrijenhoek, R.C. 1979. «Factors affecting clonal diversity and coexistence». **Am. Zool.** 19: 787-797.
- Vrijenhoek, R.C. 1984. «Ecological differentiation among clones: the frozen niche variation model». Dans Wohrmann, K. et V. Loeschcke (éd.). **Population biology and evolution**. Heidelberg, Allemagne: Springer Verlag.

- Weider, L.J. 1987. «Life history variation among low-arctic clones of obligately parthenogenetic *Daphnia pulex*: a diploid-polyploid complex». **Oecologia** 73: 251-256.
- Weider, L.J. et P.D.N. Hebert. 1987. «Ecological and physiological differentiation among low-arctic clones of *Daphnia pulex*». **Ecology** 68(1): 188-198.
- Weider, L.J. et A. Hobaek, 1994. «Molecular biogeography of clonal lineages in a high-arctic apomictic *Daphnia* complex». **Mol. Ecol.** 3: 497-506.
- Weider L.J., K.L. Glenn, M. Kyle et J.J. Elser. 2004. «Associations between ribosomal (r)DNA intergenic spacer length variation, growth rate and C:N:P stoichiometry in the genus *Daphnia*». **Limnol. Oceanogr.** 49: 1417-1423.
- Weider, L.J., J.J. Elser, T.J. Crease, M. Mateos, J.B. Cotner et T.A. Markow. 2005. «The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: impacts on the evolutionary of organisms». **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** 36: 219-242.
- White, M.M. et I.A. McLaren. 2000. «Copepod development rates in relation to genome size and 18s rDNA copy number». **Genome** 43: 750-755.
- Yurista, P.M. 1999. «Temperature-dependent energy budget of an arctic cladoceran, *Daphnia middendorffiana*». **Freshw. Biol.** 42: 21-34.

ANNEXE 1

Génotypes multilocus des clones de daphnie du complexe *D. pulex* utilisés dans cette étude.

	Clone	Dp183	Dp502	Dp512	Dp514	Dp514a	Dp519	Dp523
Diploïdes (2n)	A17-200	097 101	109 115	128 137	095 103	116 132	147 147	133 133
	C88	093 093	109 115	128 137	100 100	129 130	145 147	133 133
	K52	093 099	109 115	137 137	099 102	132 142	147 153	135 135
	K86	093 099	109 115	137 137	100 102	130 132	147 151	134 136
	K92	093 099	109 115	128 137	100 102	128 132	147 153	132 143
	K207	099 099	109 115	137 137	099 102	132 132	145 147	133 134
Polyploïdes (3n)	K9	097 099 000	106 109 115	136 137 138	099 100 000	132 142 000	145 147 153	133 134 000
	K154	099 099 099	115 115 115	136 138 142	099 100 000	126 132 000	145 147 000	132 134 000
	A35-201	101 101 101	109 115 000	128 128 128	100 102 000	118 138 000	143 145 147	134 134 134
	B141-200	099 101 000	109 115 000	128 130 135	102 102 102	118 132 000	145 151 000	132 133 000
	K233	099 099 099	115 115 115	135 137 138	099 100 102	132 138 000	145 147 000	133 134 000
	K95	099 099 099	115 115 115	137 138 000	099 100 000	132 138 000	145 151 000	133 134 000
	K228	099 099 099	109 115 000	137 138 000	098 102 000	138 148 000	145 147 000	133 133 133
	K232	093 099 000	112 115 000	137 138 000	098 101 102	132 138 148	145 147 149	132 133 134

