

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	II
RESUMÉ .....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLES .....	VII
LISTE DES FIGURES .....	VIII
CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
<b>1.1 Problématique générale.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Effets directs de la température.....	1
1.1.2 Adaptation à la température .....	2
<b>1.2 Thermosensibilité et adaptation à la température chez les daphnies.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Effets de la température et d'autres facteurs sur la croissance et la morphologie des daphnies .....	6
1.2.2 Effets de la température sur le métabolisme des daphnies .....	6
<b>1.3 <i>Daphnia magna</i> comme modèle d'étude .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Répartition géographique.....	8
1.3.2 Adaptation à la température .....	9
<b>1.4 Hypothèses et objectifs .....</b>	<b>10</b>

<b>CHAPITRE 2: METABOLIC ADAPTATIONS TO TEMPERATURE IN <i>DAPHNIA MAGNA</i> (CRUSTACEAN CLADOCERAN) FROM DIFFERENT THERMAL ENVIRONMENTS .....</b>	<b>11</b>
<b>Summary.....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>12</b>
<b>Material and methods.....</b>	<b>15</b>
<b>Results .....</b>	<b>20</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>23</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>30</b>
<b>CHAPITRE 3: CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Variation interclone de la croissance .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Variation de la croissance à contre gradient .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 Effets directs de la température sur la croissance .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4 Faible activité métabolique chez <i>Daphnia magna</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 Adaptation du métabolisme à la température.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 Découplage croissance-métabolisme .....</b>	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>49</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>54</b>

## LISTE DES TABLES

<b>Table 1: <i>Daphnia magna</i> origins and clones genotypes assigned with allozymes (GOT, GPI, LDH, MDH) and microsatellites (dma11, dma12, dma14). .....</b>	<b>31</b>
<b>Table 2: Regression analysis for individual oxygen consumption (Y) in function of dry weight (X) of <i>Daphnia magna</i> from Churchill, Nebraska and Israel, fed and unfed at 15°C and 25°C.....</b>	<b>37</b>
<b>Table 3: ANCOVA analysis of oxygen consumption of <i>Daphnia magna</i> from Churchill, Nebraska and Israel. All data were Ln-transformed before analysis. Analysis testing main effects provided similar significance except for Israel clone (p-level = 0.540) and Israel feeding (p-level = 0.000), as indicated by asterisks....</b>	<b>38</b>
<b>Table 4: Consommation d'oxygène de différentes espèces de <i>Daphnia</i>. .....</b>	<b>48</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1: Growth characteristics (<math>\pm</math>SD) at 15°C and 25°C of <i>D. magna</i> from Churchill 7 clones (black), Nebraska 9 clones (grey) and Israel 5 clones (white). .....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 2: Growth curves for <i>D. magna</i> at 15°C (Size = 981.33 (Time)<sup>0.462</sup>) and at 25°C (Size = 3963.85(1-e<sup>-0.312(Time)</sup>)). .....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 3: Oxygen consumption at 15°C and 25°C for fed (circle) and unfed (cross) <i>D.</i> <i>magna</i> from Churchill, Nebraska and Israel.....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 4: Aerobic scope for <i>D. magna</i> from Churchill, Nebraska and Israel at 15°C and 25°C.....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 5: Factorial scope for <i>D. magna</i> for populations from Churchill, Nebraska and Israel at 15°C and 25°C. The confidence interval of the linear regression is 0.95.</b>	<b>36</b>
<b>Figure 6: Average monthly precipitations (mm) and air temperatures (°C) for Churchill, Nebraska (North-Plate) and Israel (Jerusalem) (data from www.meteo-media.com).....</b>	<b>39</b>

# CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1 Problématique générale

### 1.1.1 Effets directs de la température

La température affecte directement le métabolisme des organismes à différents niveaux d'organisation. Au niveau cellulaire, les variations des taux de réactions biochimiques et les processus métaboliques qui en dépendent reflètent l'action de la température sur les propriétés des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Hochachka & Somero 2002). Par exemple la respiration mitochondriale chez *Arenicola marina* augmente progressivement de -1°C à 32°C parallèlement à l'activité d'enzymes de la chaîne respiratoire comme la cytochrome-c-oxydase (Sommer & Pörtner 2002). Chez l'isopode *Gliptonotus antarcticus*, il a été montré que la synthèse de protéines nécessitait plus d'énergie chez des organismes vivant à basse température (Whiteley et al. 2001).

Le métabolisme d'un organisme peut être évalué en mesurant sa consommation d'oxygène. Chez les ectothermes la consommation d'oxygène augmente avec la température (en général le rapport entre les consommations d'oxygène à une température  $t+10^{\circ}\text{C}$  et à une température  $t$ , appelé  $Q_{10}$ , est compris entre 2 et 3) puis diminue au-delà d'une température optimale (Withers 1992, Whiteley, Taylor & El Haj 1997). Par exemple chez *Thysanoessa longipes* la consommation d'oxygène augmente exponentiellement de 0 à 8°C puis décroît progressivement jusqu'à 14°C (Iguchi & Ikeda 2005). Par ailleurs, les ectothermes de hautes latitudes présentent un métabolisme inférieur à celui de leurs

congénères des habitats tempérés ou tropicaux lorsqu'ils sont élevés à la température moyenne de leur habitat naturel (Clarke & Johnston 1999, Ikeda *et al.* 2001, Peck 2002).

Chez les ectothermes, la plupart des traits d'histoire de vie dépendent du métabolisme et de ses variations avec la température (Withers 1992, Jobling 1993, Brown 2004). Dans les environnements froids les ectothermes croissent moins vite mais atteignent de plus grandes tailles que dans les environnements chauds (Atkinson 1994). Cette règle générale observée chez la plupart des ectothermes est appelée règle de Bergmann ou règle taille-température (Atkinson 1994, 1995, Angilletta & Dunham 2003). Les variations de croissance et de taille avec la température peuvent affecter la plupart des traits d'histoire de vie avec des conséquences sur la survie et la reproduction des organismes et donc la fitness (Roff 1992). Par exemple, chez le poisson *Menidia menidia* les individus capables de croître rapidement présentent de moins bonnes performances de nage (Billerbeck, Lankford & Conover 2001) et un risque accru de prédation (Munch & Conover 2004). Chez le cladocère *Daphnia magna* les individus présentant les plus grandes tailles produisent de plus grandes portées (Glazier 1992).

### **1.1.2 Adaptation à la température**

Lors d'un changement de température, les ectothermes peuvent s'acclimater, c'est-à-dire ajuster leur fonctions biochimiques et physiologiques, pour optimiser leurs performances. En revanche, une nouvelle température peut détériorer la survie et la reproduction des organismes incapables d'effectuer de tels ajustements (Peck, Portner & Hardewig 2002). Un changement de température à long terme peut induire une réponse

adaptative (Clarke 2003). L'adaptation à un environnement particulier est donc le résultat de l'évolution et de la sélection d'organismes capables d'optimiser leur survie et leur reproduction dans cet environnement.

Pour identifier des adaptations à des environnements thermiques particuliers, il est essentiel de comparer des populations élevées dans des conditions similaires. Des études en environnement commun (common garden) ont comparé le taux de croissance (gain de taille par unité de temps) d'organismes venant de latitudes différentes. On observe chez plusieurs espèces d'ectothermes (insectes, mollusques, crustacés, poissons, amphibiens et reptiles), qu'à la même température, les organismes de hautes latitudes ont un taux de croissance supérieur à celui des organismes de basses latitudes (Conover & Schultz 1995). Les organismes des hautes latitudes auraient donc une capacité de croissance plus élevée. Les organismes de hautes latitudes vivent dans des environnements plus froids avec de courtes périodes estivales favorables. L'hypothèse de la variation à contre-gradient suggère que des capacités de croissance accrues permettent de compenser le stress causé par ces conditions environnementales (Conover 1990, Conover & Present 1990). Conover et al. (1997) ont montré que des bars rayés de l'espèce *Morone saxatilis* échantillonnés le long des côtes de la Nouvelle-Écosse présentaient une croissance plus importante que ceux prélevés en Caroline du sud, lorsqu'ils sont élevés à la même température.

Certaines études ont observé des adaptations à la température au niveau du métabolisme (Wohlschlag 1960, Addo-Bediako, Chown & Gaston 2002). En utilisant plusieurs espèces d'insectes, il a été montré que le taux métabolique mesuré à la température optimale diminue lorsque la température moyenne de l'environnement où

vivent les insectes augmente (Addo-Bediako, Chown & Gaston 2002). Ces résultats sont toutefois contestés pour de nombreuses raisons et en particulier à cause des variations écologiques qui peuvent exister entre les espèces (Hodkinson 2003). Les mesures du métabolisme d'espèces polaires et tropicales de poissons ont été effectuées à la température de leur habitat normal puis extrapolées à différentes températures en utilisant des valeurs de  $Q_{10}$  (Wohlschlag 1960, Holeton 1974). Ces extrapolations ont montré qu'à toutes les températures, les espèces polaires possèdent un métabolisme plus élevé que les espèces tempérées ou tropicales. Pourtant de telles comparaisons par extrapolation ont été critiquées et des données expérimentales ont permis de réfuter ces résultats (Steffensen 2002).

Les mécanismes adaptatifs susceptibles d'améliorer les performances métaboliques à basse température ont essentiellement été mis en évidence au niveau cellulaire (Guderley & Blier 1988, Hochachka & Somero 2002, Sommer & Pörtner 2002). Par exemple, des vers (*Arenicola marina*) vivant dans la mer Blanche où la température est en moyenne de 4°C et des vers de la même espèce venant de la mer du Nord où la température moyenne est de 10°C ont été placés à différentes températures (Sommer & Pörtner 2002). Les meilleures capacités aérobies des vers de la mer Blanche comparées à celles des vers de la mer du Nord sont expliquées par une plus grande respiration mitochondriale et l'activité accrue de certaines enzymes de la chaîne respiratoire comme la cytochrome-c-oxydase (Sommer & Pörtner 2002). Trois mécanismes permettent ainsi des taux de réactions enzymatiques plus importants selon la température: l'augmentation de la concentration des enzymes, la présence d'enzymes orthologues plus performantes et la modification de l'environnement des enzymes (Hochachka & Somero 2002, Clarke 2003).



Il semble donc que l'adaptation à un environnement plus froids implique de meilleures capacités de croissance mais également de meilleures capacités métaboliques.

## 1.2 Thermosensibilité et adaptation à la température chez les daphnies

Les caractéristiques des daphnies en font un modèle idéal pour l'étude de l'adaptation à l'environnement thermique. Avec une croissance rapide et une reproduction parthénogénétique, les daphnies présentent des temps de génération courts (dans des conditions optimales *Daphnia magna* peut produire une portée environ 4 jours après sa naissance), caractéristiques des espèces invasives (espèces r). Ce sont des espèces-clés des écosystèmes d'eau douce puisqu'elles sont source de nourriture pour plusieurs vertébrés lacustres et invertébrés prédateurs. Ces organismes filtreurs se nourrissent d'algues unicellulaires et ont un impact majeur sur la dynamique des populations de phytoplancton. Les daphnies vivent dans des habitats variés, des lacs profonds et permanents aux petites retenues d'eau douce temporaires (Hebert 1995). Leur principal moyen de colonisation réside dans le transport éolien de leur ephippie (œuf dormant). Pourtant la répartition géographique des espèces de daphnies peut s'étendre à travers plusieurs environnements thermiques différents. La diversité génétique à l'intérieur des populations, par la présence de nombreux clones différents, leur confère un potentiel adaptatif important (Carvalho 1987, Carvalho & Crisp 1987).

### **1.2.1 Effets de la température et d'autres facteurs sur la croissance et la morphologie des daphnies**

Comme pour la plupart des ectothermes, dans un environnement froid, les daphnies croissent lentement mais atteignent une grande taille à maturité. Elles croissent plus rapidement et atteignent une plus petite taille à maturité dans un environnement plus chaud (McKee & Ebert 1996). Mitchell et Lampert (2000) ont montré que le taux maximum de croissance somatique chez *D. magna* est atteint entre 23°C et 29°C. Des daphnies récoltées en hiver présentent des capacités de survie et de reproduction à basse température plus importantes comparées à des daphnies collectées en été (Carvalho 1987). La température n'est pas le seul facteur à avoir une influence sur la croissance des daphnies. Une plus grande disponibilité de nourriture permet de se reproduire plus tôt, avec une taille plus grande et de donner plus d'œufs (Giebelhausen & Lampert 2001). La prédation est un facteur également responsable de la variation de nombreux caractères chez les daphnies et pourrait influencer leur évolution (Lynch 1980). Les daphnies présentent une plus grande taille à maturité en présence de prédateurs invertébrés et une plus petite taille en présence de prédateurs vertébrés (Lynch 1980, Walls, LaurenMaata & Ketola 1997). Les daphnies sont capables de changer leur morphologie en présence de composés chimiques (kairomones) libérés par un prédateur potentiel (Weber & Declerck 1997).

### **1.2.2 Effets de la température sur le métabolisme des daphnies**

Des mesures de consommation d'oxygène ont révélé des différences entre les espèces de daphnie (Richman 1958). La consommation d'oxygène augmente avec la température

avec un  $Q_{10}$  variant de 1,5 à 3,3 entre 10°C et 25°C (Paul *et al.* 1997, Wiggins & Frappell 2000, 2002, Lamkemeyer, Zeis & Paul 2003). La consommation d'oxygène n'est affectée par la pression d'oxygène dans l'eau que si celle-ci descend en dessous de 40 torr soit 30% de la concentration d'oxygène normale, montrant leur forte tolérance à l'hypoxie (Paul *et al.* 1997). Richman (1958) donne les mesures de consommation d'oxygène de différentes espèces de zooplancton dont *D. magna*. Il constate une grande variation de cette consommation d'oxygène entre les espèces puisque *D. magna* consomme 0,72 à 0,88  $\mu\text{l O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  alors que *D. pulex* consomme en moyenne 7,21  $\mu\text{l O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Il attribue ces différences au fait que *D. magna* possède une plus grande masse (entre 46 et 140  $\mu\text{g}$ ) que *Daphnia pulex* (entre 3 et 46  $\mu\text{g}$ ) (Richman 1958). Il existe chez *D. pulex* une relation empirique de la consommation d'oxygène en fonction de la masse établie par Richman (1958) :  $\text{O}_2 = 0,0014 W^{0,881}$  où  $W$  représente la masse en mg et  $\text{O}_2$  la consommation d'oxygène en  $\mu\text{l h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$ . La consommation d'oxygène par *D. pulex* est 16 fois plus élevée chez un individu de 4 mm que chez un individu de 1,4 mm (Paul *et al.* 1997). La consommation d'oxygène double lorsque les daphnies passent d'un environnement sans algues (organismes à jeun) à un environnement à forte concentration en algues (Lampert 1986, Schmocker & Hernandez-Leon 2003). Toutes ces variations rendent difficile la comparaison intra- ou interspécifique du métabolisme. Ainsi, il est nécessaire de prendre en compte ces différents facteurs (masse, nourriture, température) pour pouvoir comparer le métabolisme d'organismes appartenant à différentes populations.

Des études ont mis en évidence des adaptations métaboliques saisonnières à la température. Des daphnies prélevées en été et en hiver dans le même lac possédaient

différentes concentrations d'hémoglobines (Wiggins & Frappell 2000, 2002). De grandes concentrations d'hémoglobine permettent aux daphnies de supporter les conditions anoxiques associées aux températures estivales élevées. Pour évaluer le budget énergétique chez des clones de *Daphnia middendorffiana* qui est une espèce endémique à l'arctique, les taux d'ingestion, d'assimilation et de consommation d'oxygène ont été mesurés en fonction de la température (Yurista 1999). Les taux augmentent différemment avec la température. Le taux de respiration est maximum à environ 28°C alors que ceux d'ingestion et d'assimilation sont maxima entre 12 et 16°C. Le budget énergétique résultant est ainsi optimum entre 13°C et 14°C. En comparaison, le budget énergétique de *Daphnia pulex* provenant de régions tempérées est optimum aux alentours de 20°C (Yurista 1999). Ainsi des adaptations physiologiques associées à certaines caractéristiques de leur cycle vital (comme la capacité de produire rapidement des œufs dormant sans mâles) semblent permettre aux daphnies d'être adaptées à leur environnement thermique (Yurista 1999).

### **1.3 *Daphnia magna* comme modèle d'étude**

#### **1.3.1 Répartition géographique**

*Daphnia magna* possède une répartition géographique mondiale puisqu'on a découvert des populations en Europe, en Russie, en Afrique, en Asie et en Amérique du nord où on la retrouve depuis le nord du Mexique jusqu'à l'océan arctique (Hebert 1978, 1995, De Gelas & De Meester 2005). Les environnements où peut vivre *D. magna* s'échelonnent depuis les milieux désertiques (désert du Negev en Israël) jusqu'aux milieux arctiques. De Gelas et De meester (2005) montrent qu'il existe relativement peu de

variation génétique entre des populations de *D. magna* originaires de différents continents prouvant qu'il s'agit bien d'une seule espèce. Ainsi cette espèce cosmopolite et eurytherme est capable de s'adapter à de nombreuses niches thermiques spécifiques.

### **1.3.2 Adaptation à la température**

Quelques études ont été effectuées dans le but de mettre en évidence des adaptations à la température chez *D. magna*. Mitchell et Lampert (2000) ont mesuré le taux de croissance de juvéniles de *D. magna* venant de différentes populations d'Europe. Les différences de croissance entre populations n'étaient pas significatives. De la même façon aucune différence significative de croissance n'a été révélée entre des clones prélevés dans un même lac mais à des saisons différentes (Mitchell & Lampert 2004). La croissance ne semble donc pas varier avec l'environnement thermique et est probablement contrainte par la température ou par d'autres facteurs comme la pression de prédation. Par ailleurs, leur mode de reproduction permet à *D. magna* d'échapper aux mauvaises conditions du milieu. Ainsi, bien que différentes populations de *D. magna* vivent dans des environnements thermiques différents, il est possible que les daphnies produisent des œufs dormants lorsque la température varie au-delà d'un certain seuil et que leur phase planctonique se situe dans un même intervalle de température. Les daphnies de tous les environnements seraient alors adaptées aux mêmes températures (Mitchell & Lampert 2000).

Par contre Lamkemeyer et al. (2003), en utilisant des *D. magna* d'Allemagne adaptées à des températures différentes, ont mis en évidence les plus grandes capacités aérobies des individus adaptés aux températures froides. Ces résultats suggèrent qu'une

réponse adaptative aux variations de l'environnement thermique le long d'un gradient latitudinal devrait pouvoir s'observer au niveau du métabolisme aérobie chez *D. magna*.

#### **1.4 Hypothèses et objectifs**

L'hypothèse de la variation à contre gradient de Conover (Conover 1990) établit qu'à une température donnée, les ectothermes des hautes latitudes ont de meilleures capacités de croissance. De plus il a été montré que des ectothermes de hautes latitudes présentaient également des capacités métaboliques plus élevées (Guderley & Blier 1988, Hochachka & Somero 2002, Sommer & Pörtner 2002). Dans cette étude, nous utiliserons différents clones de *D. magna* provenant de trois localités différentes : Churchill (Canada), Nebraska (USA) et Israël. Selon les hypothèses précédentes, les clones de Churchill devraient posséder un taux de croissance et un métabolisme aérobie plus élevé que les clones du Nebraska et d'Israël.

Cette étude a deux objectifs spécifiques: (1) évaluer l'effet direct de la température sur la croissance, le métabolisme aérobie et la valeur adaptative de *D. magna* et (2) comparer les performances et la thermosensibilité de la croissance et du métabolisme chez différentes populations provenant de diverses niches thermiques.

Les clones des trois localités seront acclimatés à 15°C et 25°C. Les daphnies étant des organismes à croissance indéterminée, leur capacité de croissance sera évaluée à ces deux températures en mesurant leur taille à la naissance et à maturité (première portée) ainsi qu'à la troisième portée. La capacité métabolique sera évaluée en mesurant la consommation d'oxygène des daphnies nourries et à jeun (Voir annexe).

## CHAPITRE 2: METABOLIC ADAPTATIONS TO TEMPERATURE IN *DAPHNIA MAGNA* (CRUSTACEAN CLADOCERAN) FROM DIFFERENT THERMAL ENVIRONMENTS

Chopelet J.<sup>1</sup>, Dufresne F.<sup>1</sup> and Blier P.U.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1

### Summary

1. Eurythermal ectotherms such as *Daphnia magna* are able to thrive in broad arrays of thermal environments. The countergradient variation hypothesis suggests that higher growth rates allow ectotherms from higher latitudes to carry out their life cycle in stressful environments with low temperatures and short growing seasons. Furthermore, it has been shown that higher latitudes ectotherms also present higher metabolic capacities than their lower latitudes counterparts.

2. The aim of this study was to evaluate the role of thermal environments on growth, fitness and aerobic metabolism of *Daphnia magna* from three widespread populations. Clones from Churchill (North Canada), Nebraska (middle USA), and Negev desert (Israel) were grown at two different temperatures: 15°C and 25°C, in a common garden experiment. After a period of acclimation (3 generations), growth rate and oxygen consumption of each individual were measured. The somatic juvenile growth rate which is an index of fitness was also measured for each clone.

3. No significant differences in growth rate and fitness were observed among populations owing to high interclonal variations. At 15°C, the time to reach first reproduction (11.6 days) was delayed compared to organisms raised at 25°C (4.5 days) and *D. magna* reached higher sizes at 15°C than at 25°C from the third clutch.

4. Higher oxygen consumption and aerobic scopes were measured at 25°C for *D. magna* from Nebraska and at 15°C for *D. magna* from Churchill. *D. magna* from Israel presented similar oxygen consumption at both temperatures. These results suggest that the aerobic metabolism reflects adaptation to a specific thermal environment.

*Key words:* aerobic metabolism, aerobic scope, counter-gradient variation, factorial scope, growth rate,

## **Introduction**

Temperature variations affects rates of enzymatic reactions and metabolic processes sustaining biological activities and most of fitness-related traits of ectotherms (Withers 1992, Atkinson & Sibly 1997, Hochachka & Somero 2002, Ricklefs & Wikelski 2002, Angilletta & Dunham 2003, Brown 2004). Despite the pervasive effect of temperature, eurythermal species are able to thrive in broad arrays of thermal environments. The maintenance of successful populations in large range of thermal environments and the extent to which organisms are adapted to these environments involve metabolic and physiological mechanisms (Ricklefs & Wikelski 2002).



Several studies revealed metabolic adaptation to cold environments in ectotherms (Wohlschlag 1960, Holeton 1974, Addo-Bediako, Chown & Gaston 2002). Molecular adjustments to temperature generally induce higher metabolic capacity of cold-adapted organisms with consequences on their life history traits (Clarke 1983, Guderley & Blier 1988). For example, in the lugworm *Arenicola marina*, adaptation to lower prevailing temperature in the White sea is achieved with a higher aerobic capacity compared with their counterparts from warmer environments in the North sea (Sommer & Pörtner 2002).

Common-garden and transplantation experiments using plants, vertebrates and invertebrates provide evidence that organisms from higher latitudes present higher growth rates than organisms from lower latitudes when grown at similar temperatures (Conover 1990, Conover & Schultz 1995, Conover, Brown & Ehtisham 1997). The counter-gradient variation hypothesis suggests that higher growth rates allow organisms from higher latitudes to carry out their life cycle in stressful environments (low temperatures, and short summer season) (Conover & Present 1990).

Species of zooplankton present world wide distribution over large latitudinal gradients. Freshwater populations of the same species inhabit contrasting environments from deep permanent lakes to shallow temporary rock pools experiencing large temperature variations. It is well known from experimental studies that lower temperatures reduce growth rate and increase size at maturity (Atkinson 1994). Fitness typically increases with temperature reaching a thermal optimum and then decreases at higher temperature (Mitchell & Lampert 2000). Temperature reaction norms were also evident for metabolic and physiological rates, such as oxygen consumption rates (Wiggins & Frappell 2000,

2002), filtration and ingestion rates (Iguchi & Ikeda 2005). Behavioural mechanisms allow organisms to control their body temperature with evidence for temperature preference and avoidance in different *Daphnia* species (Lagerspetz 2000, Wiggins & Frappell 2000, 2002). Heart rate increment, thoracic limb movements in *D. magna* are mechanisms to cope with hypoxic conditions associated with high temperatures (Paul *et al.* 1997). Many species of zooplankton can also escape unsuitable conditions by producing resting eggs (diapause) so that their planctonic stage is prone to occur during favourable conditions (Kleiven, Larson & Hobaek 1992, Mitchell & Lampert 2000).

Studies on microcrustaceans revealed adaptation to maximize development in the local temperature regimes (Lonsdale & Levington 1985). Differences in developmental rate, adult body length and somatic growth rate have been found among copepod species from different latitudes with higher performances at temperatures prevailing in their specific environment (Lonsdale & Levington 1985). Clones from *D. magna* collected in winter have higher survival and fecundity at low temperature than those collected in summer (Carvalho 1987, Carvalho & Crisp 1987). With higher hemoglobin concentrations, *Daphnia carinata* collected in summer present higher tolerance to warm temperatures than *D. carinata* collected in winter (Wiggins & Frappell 2000). Lamkemeyer *et al.* (2003) found that *D. magna* from Germany acclimated to cold temperatures present a higher aerobic metabolism compared with warm acclimated individuals. These results demonstrate that adaptation to thermal environment may be achieved through metabolic adjustments in *D. magna*.

The latitudinally widespread species, *D. magna* is a suitable model to identify mechanisms allowing thermal adaptation and habitat colonisation. This species is easy to raise in different laboratory-controlled conditions over a large temperature range. Their parthenogenetic reproduction is appropriate to compare individuals with the same genotype (clone) placed in different environments. The present study is the first to measure aerobic metabolism plasticity of *D. magna* from latitudinally widespread populations (Churchill, Nebraska, Israel). Common-garden experiments were set up to investigate the role of thermal environment in determining aerobic metabolism, growth rate and fitness of *D. magna*. We hypothesise that when grown under similar temperatures, higher latitude populations (Churchill) should have higher growth and metabolic rates, as well as higher fitness than lower latitude populations (Nebraska and Israel) as a consequence of thermal environment adaptation.

## **Material and methods**

### *Daphnia magna* origins

Populations from U.S.A. (Nebraska) were collected in May 2003 in the shallow sides of Gimlet Lake situated in the Crescent lake national wildlife refuge (41.46 N, 102.26 W). Populations from Israel were collected in January 2004 and February 2004 in a permanent flooded ditch near lake Hula (33.11 N; 34.78 E) and in temporary rainpool in Dora (32.29N; 34.84E). *D. magna* from Canada were collected in July and August 2004 in oligotrophic shallow pools around Churchill, Manitoba, (58.44 N; 94.03 W).

### Clonal identification

To identify clones, DNA was extracted with the 6% Chelex method and PCR were performed using 3 microsatellites available from Genebank dma11 (AF291911), dma12 (AF291912) and dma14 (AF291913). PCR products were screened on polyacrylamide gel and revealed with Syber Green on a Hitachi FMBIO III scanner. As these loci were monomorphic in *Daphnia* from Churchill populations, four allozymes PGM, GPI, GOT, MDH were screened on cellulose acetate plates according to Hebert and Beaton (1993).

### Maintenance conditions

The different clones were raised at 15°C and 25°C under a 16:8 h L:D photoperiod for three generations to remove any maternal effect (Lynch & Ennis 1983, Mousseau & Fox 1998). Five individuals per clone of the third generation were raised in 100 ml of filtered lake water. Algae (*Selenastrum capricornotum*) were added to the 100 ml of water in order to obtain a concentration of approximately  $3.10^5$  cells ml<sup>-1</sup>.

### Growth rate

Sizes at birth, at first and third clutches were measured using the BQ nova prime software (Bioquant) interfaced to a microscope. Sizes were measured from the top of the eye to the base of the caudal spine. Growth rates (length) were calculated as the difference between sizes at first reproduction and birth, divided by the time to reach first reproduction. Size vs time were plotted and growth curves were derived by curve fitting. We used somatic juvenile growth rate ( $G_j = (\ln W_2 - \ln W_1) / t_2 - t_1$ ) where  $W_1$  and  $W_2$  are the mass of

individual at time  $t_1$  and  $t_2$ ) as an index of fitness (Lampert and Trubetskova 1996). In *D. magna*, the somatic juvenile growth rate has been shown to be a robust predictor of the instantaneous rate of increase ( $r$ ) used as index of fitness (Lampert & Trubetskova 1996).

### Oxygen consumption

The spectrophotometric method used to measure oxygen consumption is a modification of the Winkler titration (Broenkow & Cline 1969, Peck *et al.* 1986, Roland, Caraco & Cole 1999, Lemos, Jorge & Phan 2003). It consisted in measuring the decrease in dissolved oxygen of sterile water hermetically enclosed in a 1.5 ml eppendorf tube where a single *D. magna* was placed for 24 hours. Another tube filled with the same sterile water without *D. magna* was used as control. After 24 hours at 25 °C, the oxygen concentration in eppendorfs with larger fed individuals was in average half the concentration in control eppendorfs preventing for oxygen stress (Paul *et al.* 1997, Hodkinson 2003). However, when the experience was longer than 24 hours with unfed individuals, their swimming activity was severely reduced and larger individuals died. Thus, after 24 hours, the water was sampled with a syringe and mixed with manganese sulfate, potassium iodide and then with sulfuric acid. The final yellow solution was transferred into a plastic spectrophotometer cuvette in order to read the absorbance at a 440 nm wavelength.

The correspondance between absorbance at 440nm of the yellow solution and oxygen concentration was determined with a standard curve :

$$O_2 \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 13.682 \times \text{Absorbance } (\mu\text{m)} - 0.5769 \text{ (r}^2 = 0.998, p < 0.001\text{)}$$

This standard curve was elaborated by titration with thiosulfate of water with different oxygen concentration directly in a spectrophotometer cuve at 440 nm. The yellow solution was mixed with a micro-stirrer during the titration. The volume of thiosulfate added when the solution became translucent (absorbance null) is proportional to the oxygen concentration:

$$\text{O}_2 \text{ (mg/L)} = \frac{(V_{\text{thio}} - V_{\text{blk}}) \times N_{\text{thio}} \times 5600}{0.7 \times (V_{\text{sample}} - V_{\text{reagent}})}$$

$V_{\text{thio}}$  (ml) is the volume of thiosulfate added and the volume of thiosulfate used to titrate oxgen introduced by reagents is  $V_{\text{blk}} = 0.2 \mu\text{l}$ .  $5600 \text{ (cm}^3\text{)}$  is the volume of oxygen corresponding to 1 equivalent of thiosulfate at TPN and  $0.7 \text{ (cm}^3\text{)}$  is the volume of 1 mg of oxygen.  $V_{\text{sample}}$  and  $V_{\text{reagent}}$  are respectively the volume of sample (1.5ml) and reagents (0.021ml) added. The exact normality of the thiosulfate ( $N_{\text{thio}} = 0.159$ ) was evaluated by titrating 0.02N potassium iodate ( $\text{KIO}_3$ ).

In each population and for each clone, oxygen consumption was measured for large size ranges of female *D. magna*. Individuals with eggs were excluded to avoid oxygen consumption increase due to embryo or egg respiration. Oxygen consumption were measured at 25°C for *Daphnia* acclimated at 25°C and at 15°C for *Daphnia* acclimated at 15°C. Oxygen consumption was first measured on fed individuals. Individuals were rinsed in sterile water then transfered in 1.5 ml ependorf filled with sterile water using a transfer pipet. After 24 hours at 25°C and 48 hours at 15°C the individuals were unfed (Schmocker

& Hernandez-Leon 2003). The dry weight of each individual was measured to the nearest 0.1 µg after dessiccation at 60°C for 24 hours.

The metabolic scope for activity has been defined as the difference in an organism's maximum metabolic rate and its standard metabolic rate (Fry 1947). However, *Daphnia* are always swimming and limbs movements are necessary for respiration. Thus, we considered that the maximum metabolic rate and the standard metabolic rate were achieved through different feeding conditions, respectively when individuals were fed and unfed. Two indices were calculated: The aerobic scope is the arithmetic difference between fed and unfed oxygen consumption and the factorial scope is the ratio between fed and unfed oxygen consumption.

#### Statistical analyses

Comparisons of neonate size, size and age at first reproduction, and growth rate were carried out using a mixed-model nested ANOVA. Terms of the model were temperature, population, clone nested in population, their interaction and error. When normality and homogeneity of variances of non-transformed and log-transformed data residuals were rejected, non-parametric tests (Conover) were used. Following ANOVA, we used the Tukey post-hoc test to identify significant differences. Values of  $P \leq 0.05$  were considered significant. Comparisons of oxygen consumption-mass regression were carried out using ANCOVA. Interactions of covariate term (mass) with temperature, population, and feeding were tested in the first model then removed when not significant to compare elevation of regressions. When interactions were significant, regression slopes comparisons were based

on 95% confidence intervals (95% CI). We accepted the null hypothesis of no significant difference between two slopes when their 95% CI were overlapping. All statistical analyses were performed using GLM procedure of SYSTAT 9.0 (SPSS Inc,1999).

## Results

### Clonal identification

Nine clones from Nebraska, five clones from Israel and seven clones from Churchill were identified using both allozymes and microsatellites markers (Table 1).

### Body size and growth rate

Parametric and non-parametric statistical conclusions were similar in all cases and only parametric conclusions were presented in the following results.

Overall, variations within population (among clones) were higher than among populations (Fig.1). Significant differences among clones were found in size at birth with significant interactions between clones and temperature ( $F_{18;160} = 6.459$ ;  $p < 0.001$ ), in size at first reproduction ( $F_{18;160} = 3.388$ ;  $p < 0.001$ ), in age at first reproduction with significant interactions between clones and temperature ( $F_{18;167} = 10.106$ ;  $p < 0.001$ ) and in growth rate also with significant interactions between clones and temperature ( $F_{18;160} = 9.853$ ;  $p < 0.001$ ). Many individuals did not reach the third clutch. Thus we did the analysis of variance without the factor clone. No differences were found in size at the third clutch among populations ( $F_{2;39} = 0.351$ ;  $p = 0.706$ ) nor interactions between population and



temperature ( $F_{2,39} = 2.271$ ;  $p = 0.117$ ). However, at third clutch, the difference in size between both temperatures was significant ( $F_{1,39} = 13.8$ ;  $p < 0.001$ ) (not shown). *D. magna* had a higher somatic juvenile growth rate (Gj) at 25°C than at 15°C ( $F_{1,44} = 285.633$ ;  $p < 0.001$ ) but no significant differences in Gj were found among populations ( $F_{2,44} = 1.130$ ;  $p = 0.332$ ) (Fig. 1).

As more differences were found within populations than among populations, we grouped all individuals of each temperature to plot size vs time at 15°C and 25°C (Fig. 2). At 25°C curve based on the von Bertalanffy equation was fitted ( $\text{Size} = 3963.85 (1 - e^{-0.312 (\text{Time})})$ )  $r^2 = 0.94$ ,  $p < 0.0001$ ). In contrast, the curve was better fitted at 15°C when based on a power equation ( $\text{Size} = 981.33 (\text{Time})^{0.462}$ )  $r^2 = 0.94$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 2). Juvenile growth rate was twice higher at 25°C ( $475 \pm 30 \mu\text{m day}^{-1}$ ) than at 15°C ( $215 \pm 42 \mu\text{m day}^{-1}$ ). At 25°C, after the first clutch (around 4.5 days), growth rate decreased and became lower than at 15°C (Fig. 2). As a consequence, for approximately 20 days, *D. magna* present higher body length at 25°C than at 15°C and inversely after that threshold (Fig. 2). Size at first clutch was the same at both temperatures (in average  $3104 \pm 159 \mu\text{m}$ ). At 15°C, *D. magna* did not reach their asymptotic size at the end of growth experiment. However they were still exponentially growing at the third clutch and we can consider that the asymptotic size was higher at 15°C than at 25°C. Age at first reproduction decreased with increasing temperature from an average of 11.6 days at 15°C to 4.5 days at 25°C (Fig. 1 and 2). Mean age at third clutch also decreased with increasing temperature from 26.8 days at 15°C and 16.8 days at 25°C (Fig. 2).

## Oxygen consumption

Oxygen consumption rates ranged from  $0.055 (\pm 0.026) \mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$  for juveniles ( $<10\mu\text{g}$ ) to  $0.39 \mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$  for the heaviest weight. Regression analyses of individual oxygen consumption versus dry weight for the different populations, temperatures and feeding are summarised in Table 2. We found that clone and feeding presented no interaction with mass (Table 3). The oxygen consumption was similar for the different clones of the same population and higher for fed than unfed *Daphnia* (Table 3).

Oxygen consumption of *D. magna* from the three populations was affected by temperature and feeding in different ways (Fig. 3, Table 2). At  $15^\circ\text{C}$  *D. magna* from Churchill had significantly higher oxygen consumption rates than *D. magna* from Nebraska and Israel. The reverse was found at  $25^\circ\text{C}$ . The oxygen consumption of *D. magna* from Israel did not vary with temperature ( $F_{1,221}=1.253$ ;  $p = 0.264$ ). When fed, the population from Nebraska had the highest oxygen consumption rates at  $25^\circ\text{C}$  and the lowest at  $15^\circ\text{C}$ . A temperature increase induced a significant decrease in oxygen consumption for population from Churchill ( $F_{1,365} = 37.780$ ;  $p < 0.001$ ) and a significant increase of oxygen consumption for population from Nebraska ( $F_{1,509} = 10.436$ ;  $p = 0.001$ ) (Table 3).

The aerobic scope increased with mass (Fig. 4). Population from Nebraska presented higher values of aerobic scope at  $25^\circ\text{C}$  than at  $15^\circ\text{C}$ . In contrast, population from Churchill presented higher values of aerobic scope at  $15^\circ\text{C}$  than at  $25^\circ\text{C}$  and population from Israel presented similar values at both temperatures.

Except for *Daphnia* from Israel at  $15^\circ\text{C}$  (but variation explained by the regression of unfed israel clones at  $15^\circ\text{C}$  is low:  $R^2 = 0.074$ , Table 2), mass did not influence the factorial

scope and fed *Daphnia* exhibited rates of oxygen consumption in average twice higher than fasting *Daphnia* (Fig. 5). For population from Israel, the factorial scope was not affected by temperature with factorial scope similar at 15°C ( $2.4 \pm 2.1$ ) and 25°C ( $2.6 \pm 1.5$ ). Oxygen consumption of fed *D. magna* from Nebraska was lower at 15°C with their factorial scopes decreasing from  $2.8 (\pm 1.8)$  at 25°C to  $1.8 (\pm 1.3)$  at 15°C. Inversely, factorial scope of *D. magna* from Churchill decreased from  $2.1 (\pm 1.3)$  at 15°C to  $1.7 (\pm 2.1)$  at 25°.

## Discussion

### Plasticity of growth

No significant differences in growth rate were found among populations. This result is consistent with a previous study on temperature reaction norms of juvenile somatic growth rate of *D. magna* revealing no temperature population interaction (Mitchell & Lampert 2000). Different hypotheses may explain the lack of differences among populations from different latitudes. First, we found high interclonal variations for growth in each population. These variations may reflect local adaptations to different habitats. The clonal diversity may enable populations to cope with seasonal alterations of temperature through replacement by alternative thermal specialist clones (Carvalho 1987, Carvalho & Crisp 1987). However, Mitchell and Lampert (2004) did not find differences in juvenile growth rates among clones of *D. magna* collected at different seasons. Such results suggested that clones hatching at different periods of the year were not specialists of prevailing seasonal conditions, but rather generalist and able to optimize their phenotypes

in a given environment. In this study, high interclonal variations in growth rate would be due to genetic differences among clones suggesting that clonal diversity may provide a high adaptive potential to *D. magna*.

Environmental factors, such as predation pressure, may also play an important role in determining growth of *D. magna*. It has been shown that vertebrate predation induce occurrence of small size individuals while invertebrate predation induce higher size individuals to reduce vulnerability at juvenile stages (Lynch 1980, Atkinson 1994). The environment of the three populations were characterised by different predator compositions. In Israel, vertebrate predators like fish or salamander were absent in the rainpool of Dora but present in Hula lake. The Dora rainpool is also composed of diverse invertebrate predatory taxa such as copepods, and predatory larvae of insects (Adam Petrusek, pers. comm.). No predators in oligotrophic ponds of Churchill were observed. No fish species were observed at the time of the present study in the Gimlet Lake in Nebraska. However bulhead and fathead minnows were present years ago in the Gimlet lake (Marlin French, pers. Comm.). We also observed invertebrate predators such as copepods and insect larvae. These different predator compositions in their environment were not reflected by growth or size variations of *D. magna* when raised under laboratory conditions suggesting that *D. magna* can modulate its phenotype depending of environmental conditions.

An alternative hypothesis explaining the absence of differences in growth capacity among populations resides in the capacity of *D. magna* to escape bad environmental conditions with diapause. While living in different thermal environments, *D. magna* hatch during seasons when favorable conditions prevail and are thus adapted to the same range of

suitable conditions (Kleiven, Larson & Hobaek 1992, Mitchell & Lampert 2000, 2004). In Israel, *D. magna* were collected in winter when average temperatures are similar to summer temperatures in Churchill ranging on average from 6°C to 12°C. However, *D. magna* from Nebraska encountered higher average temperatures between 15°C to 23°C during spring. More data on hatching period of *D. magna* and environmental conditions during planktonic stage are necessary to test the hypothesis of adaptation to homogeneous conditions through the production of resting eggs.

#### Direct effects of temperature on growth

Temperature has direct and opposed effect on growth rate and asymptotic size (Atkinson 1994, Atkinson & Sibly 1997). Our results are in accordance with the temperature-size rule and the model of Berrigan and Charnov (1994) which states that growth rate and asymptotic size are negatively correlated. The negative correlation between size and temperature has already been shown in *D. magna* with a smaller maturation threshold size at 22°C than at 12°C (McKee & Ebert 1996). However, our results showed that this negative correlation occurred only after the third clutch. During the first 20 days, *D. magna* had a larger body size at 25°C than at 15°C resulting from a higher growth rate before the first reproduction at 25°C. Size may influence life history traits such as the fecundity. Females with higher sizes produce larger clutch and their juveniles present higher sizes at birth (Lynch 1980, Glazier 1992). The significant higher sizes at third clutch (measured at 15°C in this study) and the possibility to produce larger clutch and bigger juveniles may be an advantage in *Daphnia* living in cold environment. However, it was

argued that this relationship between maternal size and offspring investment is essentially the consequence of spatial limitation of the brood pouch (Glazier 1992). Temperature constrains growth and by consequence, the size reached at reproduction. Thus, it is possible that higher sizes at low temperature are not the consequence of natural selection but only due to temperature constraint on growth.

It has been suggested that such relationship between size, growth and temperature was caused by differences in energy budget between juveniles and adults at different temperatures. For example, it was shown in the Isopod *Idotea baltica* that the difference between ingestion rate and metabolic rate was higher for juveniles at higher temperature whereas this difference is higher at intermediate temperatures for adults (Strong & Daborn 1980). Such differences may explain why juveniles present higher growth rates and sizes at higher temperatures whereas adults grow faster and reach larger sizes at lower temperatures. Similar explanations are given when using differences in  $Q_{10}$  values of anabolism and catabolism (Berrigan & Charnov 1994, Perrin 1995, Atkinson & Sibly 1997). In this study, the dry mass of first individuals reaching maturity is around 40  $\mu\text{g}$  at both temperatures. When the three populations are pooled, the difference between fed and unfed oxygen consumption is higher at 25°C for juveniles (Aerobic scope  $<40 \mu\text{g}; 15^\circ\text{C} = 0.038 \mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$  and Aerobic scope  $<40 \mu\text{g}; 25^\circ\text{C} = 0.050 \mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$ ). This confirms that higher juvenile growth rates at 25°C may be due to higher metabolic scope at this temperature. In contrast, for adults, this difference is similar at both temperatures (Aerobic scope  $>40 \mu\text{g} = 0.087 \mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$ ). Similar aerobic scopes of adults at both temperatures do not explain why adults grow faster at 15°C.

### Metabolic adaptation to temperature

Many studies on cladocerans measured higher rates of oxygen consumption at higher temperatures (Paul *et al.* 1997, Simcic & Brancelj 1997, Wiggins & Frappell 2000). Lamkemeyer (2003) measured five time higher rates of oxygen consumption at 30°C compared with 10°C in *D. magna*. However, the difference of oxygen consumption between 15°C and 25°C was not evident in this study. We suggest that most of the variation in oxygen consumption is due to the principal factors mass, feeding and populations and that the effect of temperature should be interpreted in considering its interaction with these factors.

Response to temperature variation was significantly different among populations with a clear temperature-population interaction. The optimal temperature of oxygen consumption seems to be higher for population from Nebraska than for population from Churchill. Oxygen consumption decreased at 15°C toward the minimum critical temperature for population from Nebraska. In contrast, oxygen consumption decreased at 25°C toward the maximum critical temperature for population from Churchill. The similarity of oxygen consumption of population from Israel at both temperatures suggests that their thermal tolerance for oxygen consumption encompasses 15°C and 25°C. Data on oxygen consumption measured for a larger range of temperatures would have been helpful to determine the reaction norm of each population.

During their planktonic stage, populations from Churchill and Nebraska encounter different and non-overlapping range of daily average temperatures (Fig. 6). In Churchill, low temperatures from 1°C to 17°C with daily average temperatures between 6°C and 12°C were registered in summer. In contrast, *D. magna* from Nebraska cope with a higher range of temperature from 7°C to 31°C with daily average temperature between 15°C and 23°C during spring and summer. In Israel, *D. magna* were collected in winter with relatively low temperature between 4°C and 16°C with daily average temperature between 6°C and 10°C. Israel environment is also characterised by unpredictable precipitations and a very short period of suitable conditions. Data on hatching time are scarce but there is possibility that *D. magna* hatches during short precipitation events in summer when temperatures are higher (similar to summer temperatures in Nebraska). Large thermal variations may lead to the evolution of high aerobic capacity on wider range of temperature and thus more eurytherms clones in Israel.

The present study provides evidence for a metabolic adaptation to thermal environment for *D. magna*. Adaptation to colder environment for population from Churchill is illustrated by higher aerobic metabolism at lower temperatures. In contrast, the decrease of aerobic metabolism at lower temperature for population from Nebraska may indicate that they present metabolic adaptation to higher temperature. Aerobic metabolism of population from Israel was not affected by temperature suggesting that their thermal preferendum is intermediate compared with the thermal preferendum of populations from Nebraska and Churchill. Metabolic adaptation to temperature in ectotherms has been shown to involve properties of biomolecules like proteins or the lipid composition of membranes.



Indeed, the capacity of individuals from Churchill to enhance enzymatic reactions of the aerobic metabolism at lower temperature may be achieved through three main processes (Hochachka & Somero 2002): 1) the increase of enzymes concentration, 2) the production of enzymes with higher activity at lower temperatures, 3) the control of enzymes environment.

#### Growth and metabolism decoupling

Growth is an energy consuming trait and is expected to depend on aerobic metabolism (Jobling 1985). However at 25°C, *D. magna* from Churchill are able to grow as fast as *D. magna* from other populations despite a limited metabolism. Differences between growth and metabolism in this study suggest that energy allocation for growth may be achieved through different mechanisms. Energy allocation may switch from other energy consuming traits like maintenance, reproduction or locomotion to growth. Lower performances for these competing traits are thus expected at 15°C for *D. magna* from Nebraska and at 25°C for *D. magna* from Churchill.

Energy saving mechanisms may also enable population from Churchill to optimize their energy allocation. For example, with higher lifespans of the proteins, the cost of protein turn-over may be reduced at lower temperatures. With the same rate of proteins synthesis, a lower rate of proteins degradation would lead to higher growth rate.

## **Conclusion**

*D. magna* present an important clonal diversity for growth rate which may provide a high adaptive potential to environmental variations. Metabolism of *D. magna* reflects adaptation to a specific thermal environment. Our data clearly show that temperature adaptations maximize aerobic scopes at temperatures experienced by clones from different localities. In spite of clear metabolic compensations, growth rates did not differ among populations from the different localities when measured at the same temperature (as found by Mitchell & Lampert 2000), questioning the function of these metabolic adjustments.

Table 1: *Daphnia magna* origins and clones genotypes assigned with allozymes (GOT, GPI, LDH, MDH) and microsatellites (dma11, dma12, dma14).

<b>Population</b>	<b>clone</b>	<b>dma11</b>	<b>dma12</b>	<b>dma14</b>	<b>GOT</b>	<b>GPI</b>	<b>LDH</b>	<b>MDH</b>
Nebraska	N2	0103	0202	0000	0203	0202	0203	0303
Nebraska	N6	0202	0101	0202	0203	0202	0203	0303
Nebraska	N7	0203	0102	0102	0303	0202	0203	0303
Nebraska	N8	0102	0101	0103	0203	0202	0102	0303
Nebraska	N12	0303	0101	0102	0203	0202	0102	0303
Nebraska	N15	0203	0101	0102	0203	0202	0102	0303
Nebraska	N38	0103	0102	0101	0202	0202	0203	0303
Nebraska	N39	0102	0102	0101	0101	0202	0102	0303
Nebraska	N50	0202	0101	0101	0102	0202	0102	0303
Israel (Dora)	I2	0103	0202	0101	0101	0202	0304	0202
Israel (Dora)	I3	0103	0202	0202	0101	0102	0304	0202
Israel (Dora)	I4	0103	0101	0101	0202	0202	0304	0101
Israel (Dora)	I5	0103	0101	0202	0102	0202	0304	0101
Israel (Hula)	I6	0103	0202	0102	0101	0101	0102	0202
Churchill	C1	0101	0101	0202	0303	0202	0102	0303
Churchill	C2	0101	0101	0202	0203	0202	0102	0303
Churchill	C3	0101	0101	0202	0203	0202	0101	0303
Churchill	C4	0101	0101	0202	0202	0202	0203	0303
Churchill	C5	0101	0101	0202	0203	0202	0203	0303
Churchill	C6	0101	0101	0202	0202	0202	0102	0202
Churchill	C11	0101	0101	0202	0303	0202	0203	0204

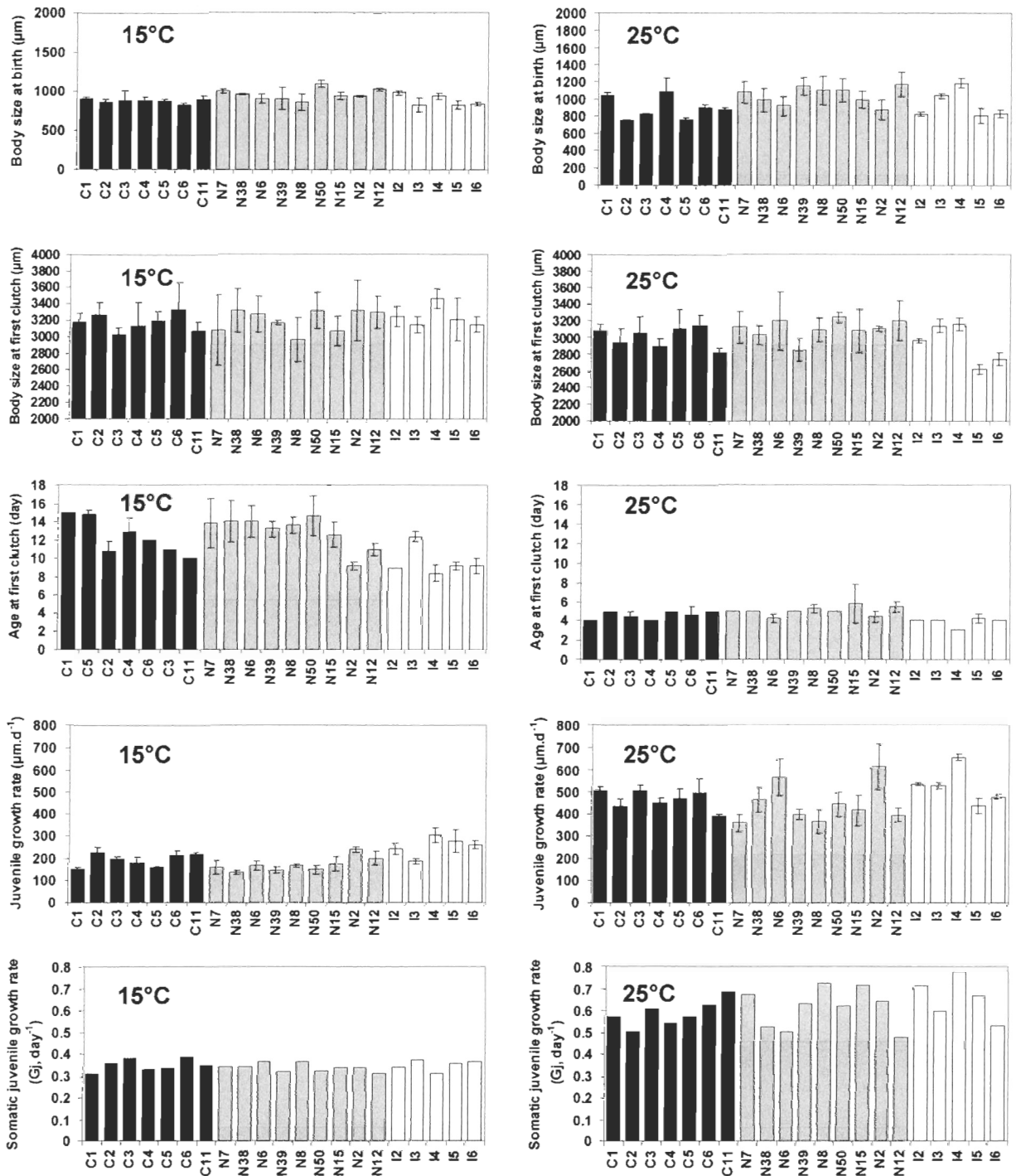


Figure 1: Growth characteristics (±SD) at 15°C and 25°C of *D. magna* from Churchill 7 clones (black), Nebraska 9 clones (grey) and Israel 5 clones (white).

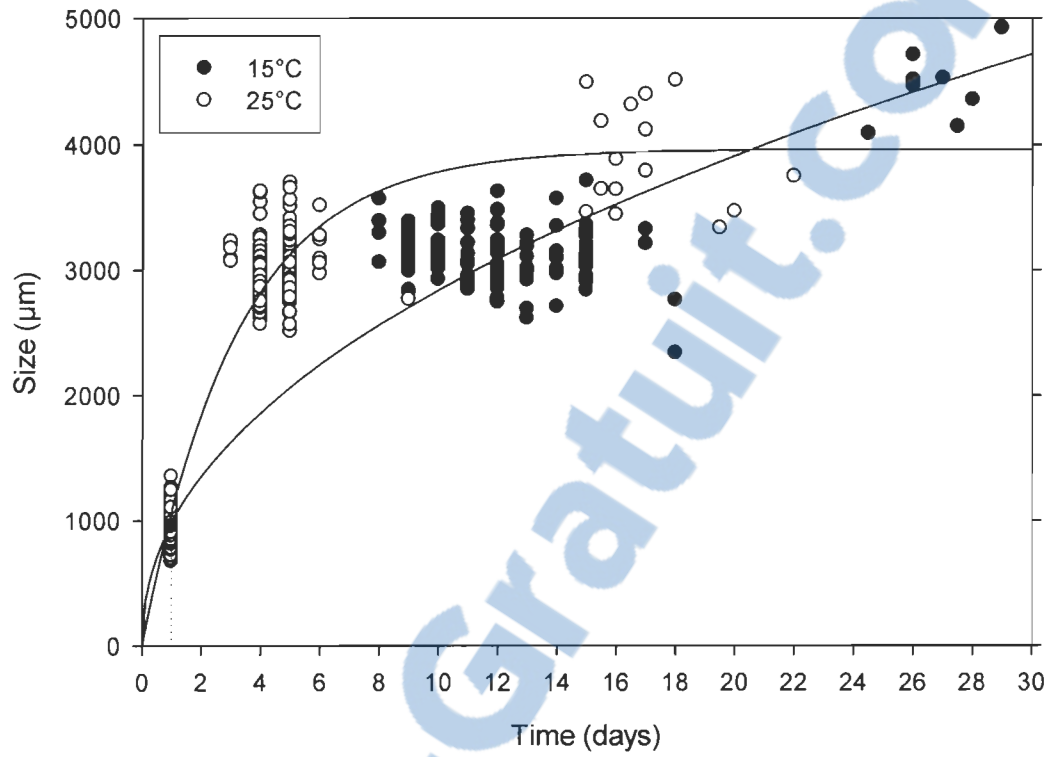


Figure 2: Growth curves for *D. magna* at 15°C ( $\text{Size} = 981.33 (\text{Time})^{0.462}$ ) and at 25°C ( $\text{Size} = 3963.85(1 - e^{-0.312(\text{Time})})$ ).

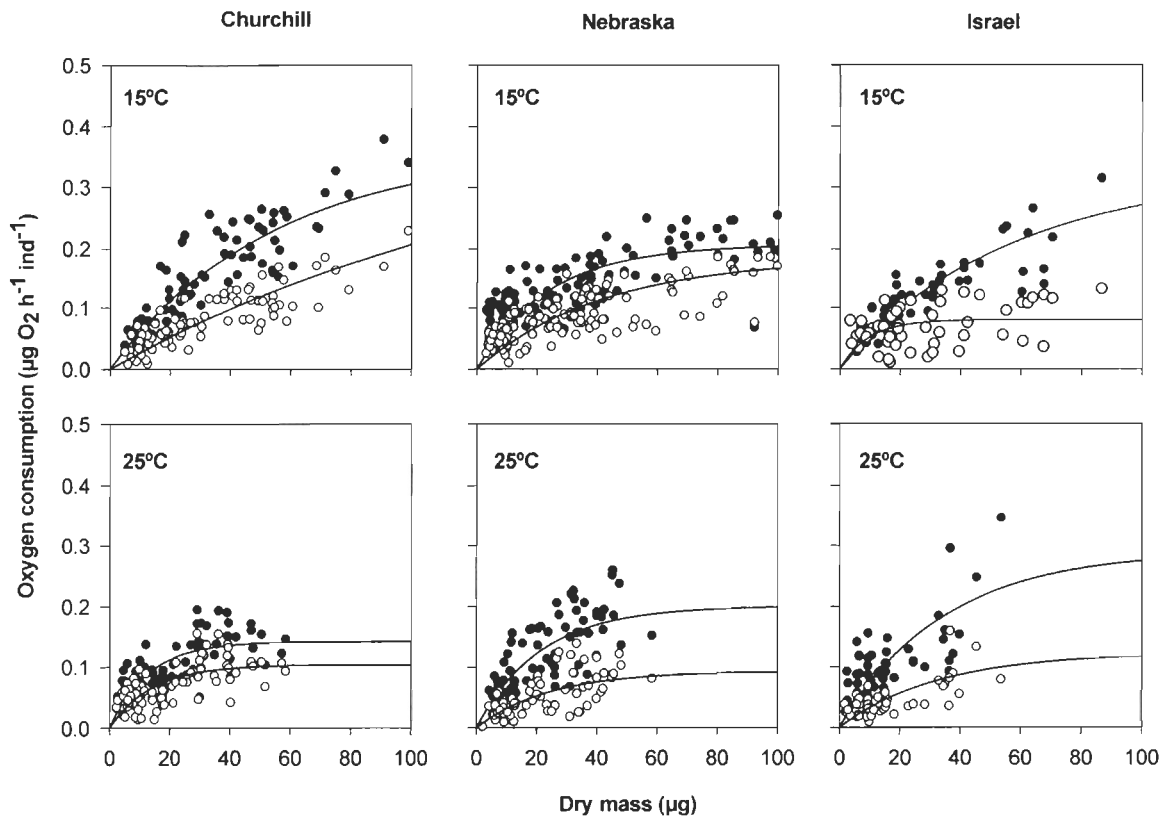


Figure 3: Oxygen consumption at 15°C and 25°C for fed (circle) and unfed (cross) *D. magna* from Churchill, Nebraska and Israel.

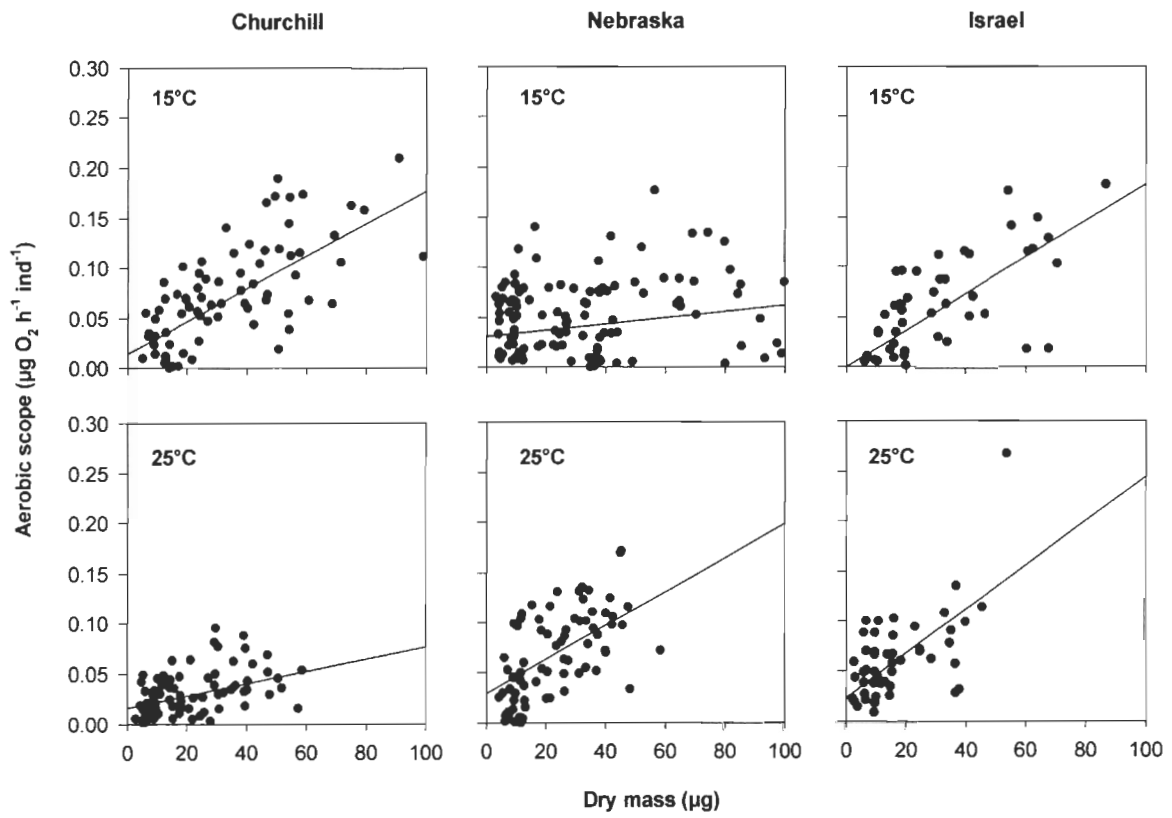


Figure 4: Aerobic scope for *D. magna* from Churchill, Nebraska and Israel at 15°C and 25°C.

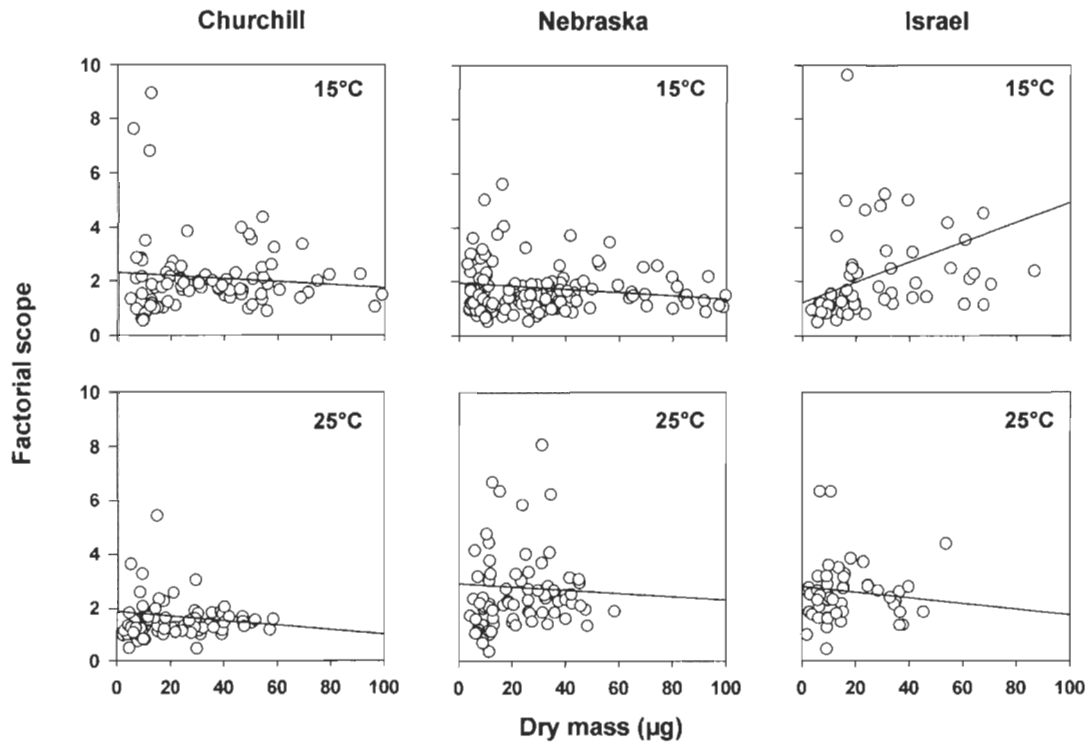


Figure 5: Factorial scope for *D. magna* for populations from Churchill, Nebraska and Israel at 15°C and 25°C.



Table 2: Regression analysis for individual oxygen consumption (Y) in function of dry weight (X) of *Daphnia magna* from Churchill, Nebraska and Israel, fed and unfed at 15°C and 25°C.

temperature	feeding	population	n	ln Y = b ln X + a				R <sup>2</sup>
				b	(b 95% CI)	a	(a 95% CI)	
15°C	unfed	Nebraska	134	0.425	(0.360, 0.491)	-3.872	(-4.085, -3.658)	0.555
		Israel	57	0.418	(0.233, 0.603)	-4.217	(-4.814, -3.619)	0.074
		Churchill	93	0.751	(0.662, 0.841)	-5.108	(-5.424, -4.792)	0.752
	fed	Nebraska	135	0.357	(0.305, 0.409)	-3.240	(-3.409, -3.070)	0.581
		Israel	58	0.587	(0.502, 0.672)	-4.033	(-4.309, -3.757)	0.773
		Churchill	92	0.698	(0.629, 0.766)	-4.360	(-4.602, -4.117)	0.820
25°C	unfed	Nebraska	122	0.532	(0.384, 0.680)	-4.684	(-5.142, -4.227)	0.297
		Israel	55	0.491	(0.318, 0.664)	-4.496	(-4.948, -4.043)	0.378
		Churchill	92	0.367	(0.257, 0.478)	-3.779	(-4.091, -3.466)	0.326
	fed	Nebraska	122	0.660	(0.541, 0.779)	-4.212	(-4.578, -3.845)	0.503
		Israel	55	0.478	(0.326, 0.629)	-3.606	(-4.000, -3.211)	0.430
		Churchill	92	0.420	(0.330, 0.510)	-3.576	(-3.831, -3.320)	0.487

Table 3: ANCOVA analysis of oxygen consumption of *Daphnia magna* from Churchill, Nebraska and Israel. All data were Ln-transformed before analysis. Analysis testing main effects provided similar significance except for Israel clone (p-level = 0.540) and Israel feeding (p-level = 0.000), as indicated by asterisks.

Population Source		df	MS	F-ratio	p-level
<b>effect of clones</b>					
<b>Nebraska</b>	clone	8	0.422	1.474	0.164
	mass	1	56.49	197.100	0.000
	clone x mass	8	0.513	1.789	0.077
	error	495	0.287		
<b>Israel</b>	clone	4	0.956	2.627	0.036*
	mass	1	29.55	81.160	0.000
	clone x mass	4	0.899	2.470	0.046
	error	215	0.364		
<b>Churchill</b>	clone	6	0.127	0.618	0.716
	mass	1	79.12	383.885	0.000
	clone x mass	6	0.131	0.635	0.702
	error	355	0.206		
<b>effect of temperature</b>					
<b>Nebraska</b>	temp	1	5.459	20.160	0.000
	mass	1	65.65	242.426	0.000
	temp x mass	1	2.826	10.436	0.001
	error	509	0.271		
<b>Israel</b>	temp	1	0.621	1.674	0.197
	mass	1	27.23	73.446	0.000
	temp x mass	1	0.464	1.253	0.264
	error	221	0.371		
<b>Churchill</b>	temp	1	7.168	38.765	0.000
	mass	1	78.91	426.765	0.000
	temp x mass	1	6.985	37.780	0.000
	error	365	0.185		
<b>effect of feeding</b>					
<b>Nebraska</b>	alim	1	4.277	22.019	0.000
	mass	1	70.27	361.780	0.000
	alim x mass	1	0.065	0.333	0.564
	error	509	0.194		
<b>Israel</b>	alim	1	0.687	2.964	0.087*
	mass	1	33.65	145.255	0.000
	alim x mass	1	0.734	3.170	0.076
	error	221	0.232		
<b>Churchill</b>	alim	1	0.807	5.324	0.022
	mass	1	96.2	634.598	0.000
	alim x mass	1	0.124	0.820	0.366
	error	365	0.152		

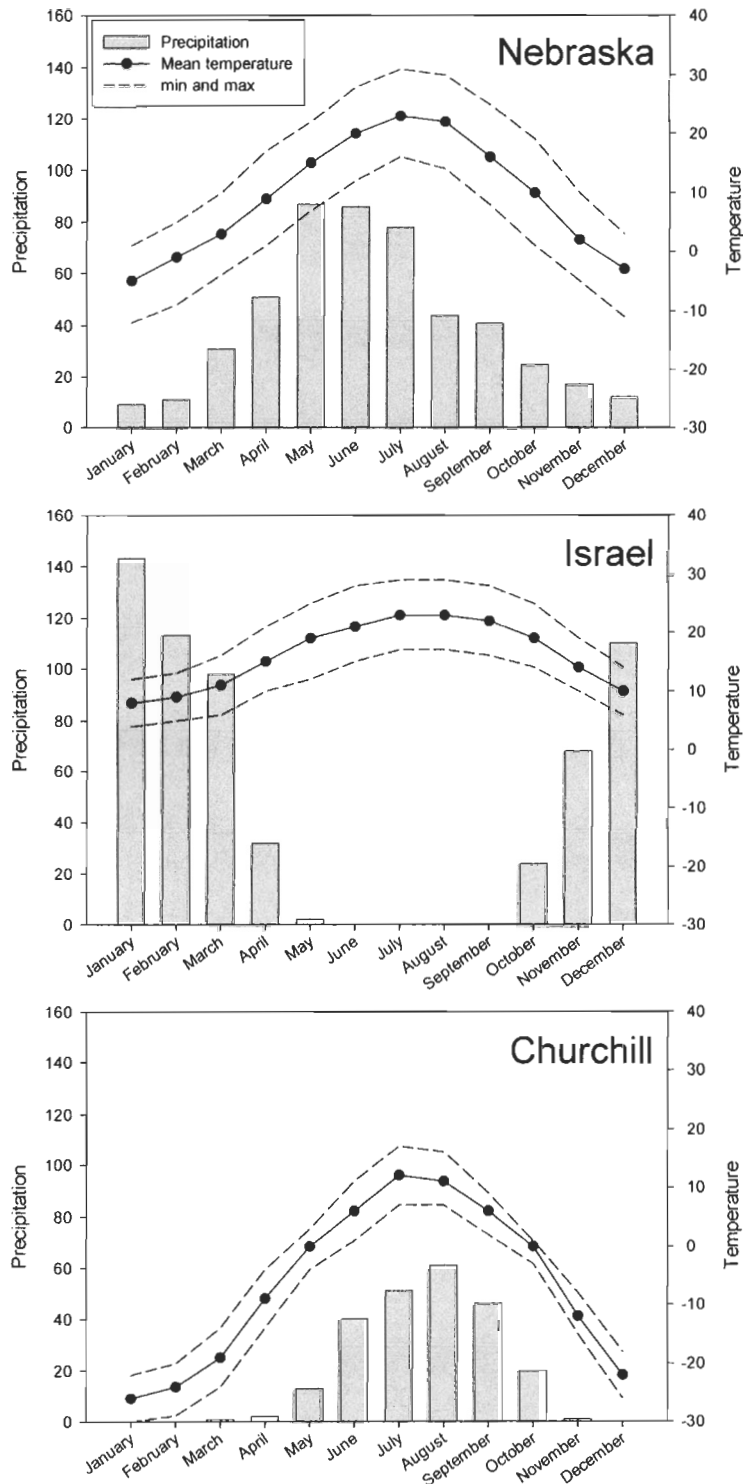


Figure 6: Average monthly precipitations (mm) and air temperatures (°C) for Churchill, Nebraska (North-Plate) and Israel (Jerusalem) (data from [www.meteomedia.com](http://www.meteomedia.com)).

## CHAPITRE 3: CONCLUSION GÉNÉRALE

### 3.1 Variation interclone de la croissance

Cette étude n'a pas mis en évidence de variations significatives de croissance entre des populations de *D. magna* venant de Churchill, du Nebraska et d'Israël. Ceci peut être lié à l'importante variabilité inter-clone du taux de croissance. Il y a plus de différences du taux de croissance entre les clones qu'entre populations. Chaque population possède des clones capables de croître plus rapidement à basse température et d'autres clones à haute température. Les différences observées entre les clones d'une même population pourraient bien refléter des adaptations aux variations de température à l'échelle des plans d'eau. Il a déjà été montré que des daphnies échantillonnées dans un lac en été ont une concentration d'hémoglobine plus élevée que celles échantillonnées en hiver leur permettant de supporter des températures plus élevées en été associées à de plus faibles concentrations d'oxygène dans l'eau (Wiggins & Frappell 2000, 2002). Cependant Mitchell et Lampert (2004) ont montré que différents clones de *D. magna* prélevés à différentes saisons étaient généralistes et présentaient les mêmes valeurs de fitness à différentes températures. La croissance de *D. magna* serait optimisée et contrainte par les conditions environnementales. En comparant les caractéristiques des normes de réactions de la fitness en fonction de la température, Palaima et Spitze (2004) ont montré que, dans une même population, certains génotypes possèdent une meilleure fitness que d'autre quelle que soit la température. Actuellement, il n'y a pas de consensus sur les mécanismes responsables de la diversité génétique et phénotypique des clones d'une même population. Pourtant cette diversité

clonale semble avoir permis la colonisation d'environnement très différents et confère à cette espèce un important potentiel adaptatif. Selon notre étude, il se pourrait que la variation du taux de croissance entre les clones soit le fruit de la variation génétique entre les clones. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer l'héritabilité de caractères du cycle vitale, comme le taux de croissance, de chacun des clones. Si un clone dont la croissance est rapide produit des descendants dont la croissance est également rapide quelle que soit l'environnement dans lequel ils sont élevés, alors l'héritabilité du taux de croissance est importante. Il devrait alors être possible d'identifier le génotype associé au caractère croissance rapide chez cette lignée clonale et de la comparer au génotype de clones dont la croissance est lente.

### **3.2 Variation de la croissance à contre gradient**

L'hypothèse à contre gradient de Conover établit que les organismes vivant dans un environnement stressant à haute latitude (températures basses et courte saison estivale) possèdent de meilleures capacités de croissance (Conover & Present 1990). Pourtant, les populations de Churchill et d'Israël semblent subir un stress environnemental plus important (plans d'eau qui s'assèchent) que celles du Nebraska (Plans d'eau beaucoup plus stables). En effet, la période pendant laquelle les conditions sont favorables à leur développement (présence de précipitations, retrait de la glace à Churchill et températures supérieures à 0°C) est plus courte et les températures y sont inférieures à 15°C. Les taux de croissance ont tendance à être plus importants (bien que statistiquement non différents) chez les populations de Churchill et d'Israël que chez celles du Nebraska. Cette tendance

serait en accord avec l'hypothèse à contre gradient de Conover si on considérait un gradient de stress environnemental plutôt qu'un gradient latitudinal. Ce gradient de stress pourrait être basé sur des conditions environnementales abiotiques (température, précipitations, photopériode) et biotiques (pression de prédation, compétition, nourriture). L'indice de permanence (Blaustein 2004, Eitam et al. 2004) qui indique le nombre de jours pendant lesquels il y a présence d'eau dans une retenue d'eau peut également être un bon indicateur du stress subi par les daphnies. Les données relatives à la période de vie planctonique des daphnies sont difficiles à obtenir. En effet il faudrait pouvoir échantillonner régulièrement un plan d'eau pour pouvoir détecter à quelle période les daphnies éclosent et à quelle période elles passent en phase dormante. Ces informations permettraient de connaître exactement à quelles conditions environnementales les daphnies sont contraintes.

### **3.3 Effets directs de la température sur la croissance**

Nous avons mis en évidence les effets directs de la température sur la croissance de *D. magna* et confirmé la règle taille-température (temperature-size rule) et le modèle de Berrigan et Charnov (1994) établissant que la croissance est négativement corrélée à la taille asymptotique chez les organismes à croissance indéterminée. Les résultats de croissance en fonction de la température obtenus dans notre étude montrent que *D. magna* constitue un excellent modèle pour tester les hypothèses expliquant la règle taille-température (Strong & Daborn 1980, Berrigan & Charnov 1994, Perrin 1995, Angilletta & Dunham 2003). En effet, il serait possible de mesurer le budget énergétique des juvéniles et des adultes à basses et hautes températures. La différence entre le taux d'ingestion (ou

« taux de filtration » mesuré en  $\text{Joule h}^{-1} \text{ind}^{-1}$ ) et le taux métabolique (« aerobic scope » également mesuré en  $\text{Joule h}^{-1} \text{ind}^{-1}$ ) devrait être plus importante à haute température chez les juvéniles expliquant leur plus grande croissance à haute température. En revanche, chez les adultes cette différence devrait être plus élevée à basse température étant donné leur plus grande croissance à basse température.

Une croissance plus importante devrait être liée à une activité métabolique plus importante. Pour pouvoir détecter une différence entre le métabolisme aérobie à basse température et celui à haute température, il serait nécessaire de mesurer l'évolution de la consommation d'oxygène pendant plusieurs heures après la prise de nourriture. L'action dynamique spécifique (ADS) est l'augmentation de la consommation d'oxygène jusqu'à un maximum puis son retour à son niveau standard, après la prise de nourriture. Il a été montré chez des crustacés que le taux maximum de consommation d'oxygène lors de l'ADS était supérieur à température élevée mais que la durée de l'ADS était inversement proportionnel à la température (Whiteley et al. 2001). Pour comparer le métabolisme associé à la croissance à haute et basse température, il faudrait pouvoir comparer l'ADS (le maximum de consommation d'oxygène et la durée l'ADS) des organismes à chaque température en utilisant par exemple le même système que Lampert (1986) ou Paul et al. (1997). Il faudrait également savoir à quelle température la fréquence des ADS est la plus importante.

### **3.4 Faible activité métabolique chez *Daphnia magna***

Pour comparer les consommations d'oxygène des daphnies de différentes tailles dans la littérature, on exprime souvent la consommation d'oxygène par milligramme de daphnie

(Table 4). Cette procédure suppose que la relation entre la consommation d'oxygène et la masse est linéaire. Nos résultats montrent au contraire que cette relation n'est pas linéaire (Figure 3). Une daphnie juvénile consomme davantage d'oxygène par rapport à sa taille qu'une daphnie adulte. La comparaison des consommations d'oxygène de deux populations de daphnies devrait se faire pour un intervalle de masse similaire par analyse de covariance.

Gilooly et al. (2001) montrent que le taux métabolique standard de tous les organismes est similaire lorsqu'il est compensé par la masse et la température. Pour compenser par la masse et la température, il part de l'hypothèse selon laquelle le métabolisme des organismes ( $W$ ) augmente avec la masse ( $M$ ) suivant une relation allométrique ( $W = M^{0.75}$ ) et qu'il augmente exponentiellement avec la température. Dans notre étude, le métabolisme des organismes à jeun augmentent bien avec la masse mais la pente de la relation allométrique est inférieure à 0.75 ou à celle mesurée par Richman (1958) chez *D. pulex* de 0,88. Cette étude ne présente pas les données de consommation d'oxygène obtenues dans les mêmes conditions chez *D. pulex* qui montrent une pente d'environ 0,8 en accord avec Richman (1958). Il semble donc que les faibles pentes obtenus pour *D. magna* soient caractéristiques de cette espèce. Nous avons également observé que la pente de la relation allométrique varie beaucoup d'une population à l'autre allant d'environ 0.42 pour les populations d'Israel et du Nebraska à 0.75 pour celle de Churchill à 15°C et de 0.37 pour la population de Churchill à environ 0.50 pour celles du Nebraska et d'Israel à 25°C (Table 2). Gilooly et al. (Gilooly et al. 2001) expliquent que leur modèle permet d'exprimer la variation causée par la masse et la température pour la plupart des organismes mais qu'il est nécessaire d'intégrer d'autres facteurs pour expliquer



la variations qu'il reste entre et à l'intérieur des groupes. Dans notre étude, nous constatons qu'il existe une variation inter-spécifique puisque l'espèce *D. magna* semble posséder un métabolisme généralement inférieur à d'autres espèces de Cladocères (Richman 1958) et intraspécifique puisque nous mesurons une différence entre les populations. Il semble donc possible qu'au moins une partie de la variation inexplicée dans le modèle de Gilooly et al. (2001) soit causée par la variation génétique inter et intra-spécifique.

### 3.5 Adaptation du métabolisme à la température

La variation de consommation d'oxygène entre clones d'une même population était faible et nous avons pu mettre en évidence des différences entre les populations. Cette étude montre que le métabolisme aérobie est plus élevé à basse température (15°C) pour les *D. magna* de Churchill et à température élevée (25°C) pour celles du Nebraska. La température optimale de consommation d'oxygène semble être plus faible pour les *D. magna* de Churchill, intermédiaire pour les *D. magna* d'Israël et plus élevée pour les *D. magna* du Nebraska. Il semble que le métabolisme aérobie de *D. magna* soit adapté à l'environnement thermique dans lequel elle vit.

Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes cellulaires qui permettent aux organismes d'être adaptés à leur environnement thermique et il a été montré que la densité des mitochondries et leur capacité respiratoire sont plus élevées chez des ectothermes adaptés à des environnements froids (Guderley & Blier 1988, Hochachka & Somero 2002, Sommer & Pörtner 2002). Les meilleures capacités respiratoires des *D. magna* de Churchill à des températures froides pourraient bien résulter de telles propriétés. Pourtant, il a été

montré que les organismes possédant une densité mitochondriale plus importante présentent des consommations d'oxygène plus élevées quelle que soit la température et même des consommations d'oxygène accrues au-delà de leurs températures critiques (Sommer & Pörtner 2002). Ce n'est pas ce qu'on observe dans cette étude puisque la consommation d'oxygène de la population de Churchill, bien que supérieure à 15°C, est inférieure à celle du Nebraska à 25°C.

Les propriétés différentes des enzymes sont gouvernées par des substitutions d'acides aminés. De telles substitutions permettent à certaines enzymes du métabolisme aérobie comme la lactate deshydrogenase d'être plus flexible diminuant ainsi le niveau d'énergie d'activation nécessaire pour la création de liens avec le pyruvate ou la libération du lactate (Hochachka & Somero 2002). Il a ainsi été montré que l'activité de la lactate deshydrogenase et celle de la citrate synthase sont plus élevées chez des poissons antarctiques relativement à des poissons tropicaux (Kawal et al. 2002). Un autre exemple de contrainte causée par les basses températures est la rigidité de la bicouche lipidique qui augmente la résistance aux changements de conformation des protéines et diminue leur activité. Des changements de la composition et des propriétés des lipides de la membrane diminuent la viscosité de la bicouche lipidique chez les organismes adaptés au froid (Hochachka & Somero 2002).

### **3.6 Découplage croissance-métabolisme**

La croissance et la consommation d'oxygène ne répondent pas de la même façon aux changements de température. On a vu qu'une croissance plus importante n'était pas

corrélée à un métabolisme plus important. Malgré un métabolisme très limité à 25°C les daphnies de Churchill sont parvenues à une croissance identique à celle des autres populations. Ainsi il doit exister d'autres mécanismes que le métabolisme aérobie par lesquels les daphnies allouent de l'énergie à la croissance comme le métabolisme anaérobie à court terme (Pörtner 2002). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le découplage du métabolisme et de la croissance (Pedersen 1997). Les organismes limités en énergie seraient capables d'utiliser l'énergie normalement allouée à la maintenance ou à d'autre processus qui nécessitent de l'énergie (locomotion, reproduction) pour satisfaire les besoins de la croissance. Les variations du métabolisme pourraient alors limiter d'autres processus qui nécessitent de l'énergie comme la locomotion ou la reproduction. De nombreuses études mettent en évidence des compromis entre croissance rapide et d'autres caractères (Billerbeck, Lankford & Conover 2001, Lankford, Billerbeck & Conover 2001). Chez *D. magna*, les individus ayant une croissance rapide et un métabolisme limité comme les *D. magna* de Churchill à 25°C ou celles du Nebraska à 15°C devraient présenter de moins bonnes capacités de reproduction ou de locomotion.

Il est possible également que pour vivre dans un environnement froid, les daphnies de Churchill aient développé des mécanismes permettant de sauver de l'énergie. Par exemple, le renouvellement des protéines nécessiterait moins d'énergie si le temps de vie des protéines était plus long. De plus, pour un même taux de synthèse protéique, un taux de dégradation plus faible augmenterait le taux de déposition des protéines et donc la croissance.

Table 4: Consommation d'oxygène de différentes espèces de *Daphnia*.

espèce	conditions	ugO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	référence
<i>D. magna</i>	5°C	1,40	Simcic et Brancelj (1997)
<i>D. magna</i>	20°C	7,10	Simcic et Brancelj (1997)
<i>D. magna</i>	24°C	1,15	Heisey et Porter (1977)
<i>D. magna</i>	20°C	1,24	Kobayashi (1984)
<i>D. magna</i>	5°C	3,10	Paul et al. (1997)
<i>D. magna</i>	15°C	7,50	Paul et al. (1997)
<i>D. magna</i>	25°C	9,60	Paul et al. (1997)
<i>D. magna</i>	20°C	7,67	Richman (1958)
<i>D. magna</i>	20°C	15,20	Richman (1958)
<i>D. magna</i>	-	7,25	Knops et al. (2001)
<i>D. magna</i>	10°C	4,80	Lankemeyer et al. (2003)
<i>D. magna</i>	30°C	20,80	Lankemeyer et al. (2003)
<i>D. carinata</i>	16°C	1,80	Wiggins et Frappel (2000)
<i>D. carinata</i>	23°C	5,41	Wiggins et Frappel (2000)
<i>D. longispina</i>	20°C	10,10	Richman (1958)
<i>D. pulex</i>	20°C	10,30	Richman (1958)
<i>D. pulex</i>	peu nourri	4,80	Lampert (1986)
<i>D. pulex</i>	bien nourri	9,60	Lampert (1986)
<i>D. magna</i>	25°C, Nebraska, nourri	5,86 ± 2,76	cette étude
<i>D. magna</i>	25°C, Nebraska, à jeun	2,61 ± 1,48	cette étude
<i>D. magna</i>	25°C, Israël, nourri	9,14 ± 6,70	cette étude
<i>D. magna</i>	25°C, Israël, à jeun	4,03 ± 3,47	cette étude
<i>D. magna</i>	25°C, Churchill, nourri	6,88 ± 4,80	cette étude
<i>D. magna</i>	25°C, Churchill, à jeun	5,04 ± 3,46	cette étude
<i>D. magna</i>	15°C, Nebraska, nourri	6,78 ± 5,49	cette étude
<i>D. magna</i>	15°C, Nebraska, à jeun	4,34 ± 3,07	cette étude
<i>D. magna</i>	15°C, Israël, nourri	5,35 ± 2,99	cette étude
<i>D. magna</i>	15°C, Israël, à jeun	3,74 ± 3,67	cette étude
<i>D. magna</i>	15°C, Churchill, nourri	4,89 ± 1,94	cette étude
<i>D. magna</i>	15°C, Churchill, à jeun	2,85 ± 1,37	cette étude
<i>D. magna</i>	masse sèche = 3,1 µg	31,23	cette étude
<i>D. magna</i>	masse sèche = 37,9 µg	3,15	cette étude
<i>D. magna</i>	masse sèche = 187,9 µg	1,78	cette étude

## BIBLIOGRAPHIE

- Addo-Bediako, A., S. L. Chown & K. J. Gaston. 2002. Metabolic cold adaption in insects: a large-scale perspective. *Functional Ecology* **16**, 332-338.
- Angilletta, M. J. & A. E. Dunham. 2003. The temperature-size rule in ectotherms: Simple evolutionary explanations may not be general. *American Naturalist* **162**, 332-342.
- Atkinson, D. 1994. Temperature and organism size - a biological law for ectotherms. *Advances in Ecological Research, Vol 25*, pp. 1-58, Academic press Ltd, London.
- Atkinson, D. 1995. Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms - Exceptions to the general rule. *Journal of Thermal Biology* **20**, 61-74.
- Atkinson, D. & R. M. Sibly. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends in Ecology and Evolution* **12**, 235-239.
- Berrigan, D. & E. L. Charnov. 1994. Reaction norms for age and size at maturity in response to temperature: a puzzle for life historians. *Oikos* **70**, 474-478.
- Billerbeck, J. M., J. T. E. Lankford & D. O. Conover. 2001. Evolution of intrinsic growth and energy acquisition rates. I. Trade-offs with swimming performance in *Menidia menidia*. *Evolution* **55**, 1863-1872.
- Blaustein, L. 2004. Crustacean species richness in temporary pools: relationships with habitat traits. *Hydrobiologia* **525**, 125-130.
- Broenkow, W. W. & J. D. Cline. 1969. Colorimetric determination of dissolved oxygen at low concentrations. *Limnology and Oceanography* **14**, 450-454.
- Brown, J. H. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* **85**, 1771-1789.
- Carvalho, G. R. 1987. The clonal ecology of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) II. Thermal differentiation among seasonal clones. *Journal of Animal Ecology* **56**, 469-478.
- Carvalho, G. R. & D. J. Crisp. 1987. The clonal ecology of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) I. *Journal of Animal Ecology* **56**, 453-468.
- Clarke, A. 1983. Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanography and Marine Biology: An annual Review* **21**, 341-453.
- Clarke, A. & N. M. Johnston. 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* **68**, 893-905.
- Clarke, A. 2003. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 573-581.
- Conover, D. O. 1990. The relation between capacity for growth and length of growing season: evidence for and implications of countergradient variation. *Transaction of the American Fisheries Society* **119**, 416-430.
- Conover, D. O. & T. M. C. Present. 1990. Countergradient variation in growth rate - Compensation for length of the growing-season among Atlantic silversides from different latitudes. *Oecologia* **83**, 316-324.
- Conover, D. O. & E. T. Schultz. 1995. Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. *Trends in Ecology & Evolution* **10**, 248-252.

- Conover, D. O., J. J. Brown & A. Ehtisham. 1997. Countergradient variation in growth of young striped bass (*Morone saxatilis*) from different latitudes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 2401-2409.
- De Gelas, K. & L. De Meester. 2005. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe. *Molecular Ecology* **14**, 753-764.
- Eitam, A., L. Blaustein, K. V. Damme, H. J. Dumont & K. Martens. 2004. Crustacean species richness in temporary pools: relationships with habitat traits. *Hydrobiologia* **525**, 125-130.
- Fry, F. E. J. 1947. Effects of environment on animal activity. *Publications of the Ontario Fisheries Research Laboratory* **55**, 1-62.
- Giebelhausen, B. & W. Lampert. 2001. Temperature reaction norms of *Daphnia magna*: the effect of food concentration. *Freshwater Biology* **46**, 281-289.
- Gilooly, J. F., J. H. Brown, G. B. West, V. M. Savage & E. L. Charnov. 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* **293**, 2248-2251.
- Glazier, D. S. 1992. Effect of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna*. *Ecology* **73**, 910-926.
- Guderley, H. & P. U. Blier. 1988. Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties of swimming muscle. *Canadian Journal of Zoology* **66**, 1105-1115.
- Hebert, P. D. N. 1978. The population biology of *Daphnia*. *Biological review* **53**, 387-426.
- Hebert, P. D. N. & M. J. Beaton. 1993. *Methodologies for allozymes analysis using cellulose acetate electrophoresis*, Guelph, ONT: Helena laboratories.
- Hebert, P. D. N. 1995. The daphnia of North America-An illustrated fauna. *Digital Wisdom, CD-Rom*.
- Heisey, D. & K. G. Porter. 1977. The effect of ambient oxygen concentration on filtering and respiration rates of *Daphnia galeata mendotae* and *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography* **22**, 839-845.
- Hochachka, P. W. & G. N. Somero. 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford university press, New York.
- Hodkinson, I. D. 2003. Metabolic cold adaptation in arthropods: a smaller-scale perspective. *Functional Ecology* **17**, 562-572.
- Holeton, G. F. 1974. Metabolic cold adaptation of polar fish: fact or artefact? *Physiological Zoology* **47**, 137-152.
- Iguchi, N. & T. Ikeda. 2005. Effects of temperature on metabolism, growth and growth efficiency of *Thysanoessa longipes* (Crustacea: Euphausiacea) in the Japan Sea. *Journal of Plankton Research* **27**, 1-10.
- Ikeda, T., Y. Kanno, K. Ozaki & A. Shinada. 2001. Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a function of body mass and temperature. *Marine Biology* **139**, 587-596.
- Jobling, M. 1985. Growth. *Fish energetics: new perspectives* (eds P. Tytler & P. Calow), pp. 213-230. Croom Helm, London.
- Jobling, M. 1993. Bioenergetics: Feed intake and energy partitioning. (eds L. U. CHAPMAN & HALL).

- Kawal, H. G., J. J. Torres, B. D. Sidel & G. N. Somero. 2002. Metabolic cold adaptation in antarctic species: evidence for enzymatic activities of brain. *Marine Biology* **140**, 279-286.
- Kleiven, O. T., P. Larson & A. Hobaek. 1992. Sexual reproduction in *daphnia* requires three stimuli. *Oikos* **65**, 197-206.
- Knops, M., R. Altenburger & H. Segner. 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic toxicology* **53**, 79-90.
- Kobayashi, M. 1984. Analysis of respiratory role of haemoglobin in *Daphnia magna*. *Zoological Sciences* **1**, 523-532.
- Lagerspetz, K. Y. H. 2000. Thermal avoidance and preference in *Daphnia magna*. *Journal of Thermal Biology* **25**, 405-410.
- Lamkemeyer, T., B. Zeis & R. J. Paul. 2003. Temperature acclimation influences temperature-related behaviour as well as oxygen-transport physiology and biochemistry in the water flea *Daphnia magna*. *Canadian Journal of Zoology* **81**, 237-249.
- Lampert, W. 1986. Response of the respiratory rate of *Daphnia magna* to changing food conditions. *Oecologia* **70**, 495-501.
- Lampert, W. & I. Trubetskova. 1996. Juvenile growth rate as a measure of fitness in *Daphnia*. *Functional Ecology* **10**, 631-635.
- Lankford, J. T. E., J. M. Billerbeck & D. O. Conover. 2001. Evolution of intrinsic growth and energy acquisition rates. II. Trade-offs with vulnerability to predation in *Menidia menidia*. *Evolution* **55**, 1873-1881.
- Lemos, D., R. L. V. Jorge & V. N. Phan. 2003. Simultaneous measurements of oxygen consumption and ammonia-N excretion in embryos and larvae of marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **136**, 321-328.
- Lonsdale, D. J. & J. S. Levington. 1985. Latitudinal differentiation in copepod growth: an adaptation to temperature. *Ecology* **66**, 1397-1407.
- Lynch, M. 1980. The evolution of Cladoceran life histories. *Quarterly Review of Biology* **55**, 23-41.
- Lynch, M. & R. Ennis. 1983. Resource availability, maternal effects and longevity. *Exp. Gerontol.* **18**, 147-165.
- McKee, D. & D. Ebert. 1996. The effect of temperature on maturation threshold body-length in *Daphnia magna*. *Oecologia* **108**, 627-630.
- Mitchell, S. E. & W. Lampert. 2000. Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankter, *Daphnia magna*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 371-382.
- Mitchell, S. E. & W. Lampert. 2004. Coexistence of similar genotypes of *Daphnia magna* in intermittent populations: response to thermal stress. *Oikos* **106**, 469-478.
- Mousseau, T. A. & C. W. Fox. 1998. *Maternal effects as adaptations*. Oxford University Press.
- Munch, S. B. & D. O. Conover. 2004. Nonlinear growth cost in *Menidia menidia*: Theory and empirical evidence. *Evolution* **58**, 661-664.

- Palaima, A. & K. Spitze. 2004. Is a jack-of-all-temperatures a master of none? An experimental test with *Daphnia pulex* (Crustacea : Cladocera). *Evolutionary Ecology Research* **6**, 215-225.
- Paul, R. J., M. Colmorgen, S. Hüller, F. Tyroller & D. Zinkler. 1997. Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods. *Journal of Comparative Physiology part B* **167**, 399-408.
- Peck, L. S., D. J. Morris, A. Clarke & L. J. Holmes. 1986. Oxygen consumption and nitrogen excretion in the antarctic brachiopod *Liothyrella uva* (Jackson, 1912) under simulated winter conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **104**, 203-213.
- Peck, L. S. 2002. Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. *Polar Biology* **25**, 31-40.
- Peck, L. S., H. O. Portner & I. Hardewig. 2002. Metabolic demand, oxygen supply, and critical temperatures in the antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Physiological and Biochemical Zoology* **75**, 123-133.
- Pedersen, B. H. 1997. The cost of growth in young fish larvae, a review of new hypotheses. *Aquaculture* **155**, 259-269.
- Perrin, N. 1995. About Berrigan and Charnov's life-history puzzle. *Oikos* **79**, 137-139.
- Pörtner, H.-O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology* **132**, 739-761.
- Richman, S. 1958. The transformation of energy by *Daphnia pulex*. *Ecological monographs* **28**, 273-291.
- Ricklefs, R. E. & M. Wikelski. 2002. The physiology/life history nexus. *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 462-468.
- Roff, D. A. 1992. *The evolution of life histories. Theory and analysis*. Chapman and Hall, New York.
- Roland, F., N. F. Caraco & J. J. Cole. 1999. Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: evaluation of interference from color and turbidity. *Limnology and Oceanography* **44**, 1148-1154.
- Schmocker, C. & S. Hernandez-Leon. 2003. The effect of food on the respiration rates of *Daphnia magna* using a flow-through system. *Scientia Marina* **67**, 361-365.
- Simcic, T. & A. Brancelj. 1997. Electron transport system (ETS) activity and respiration rate in five *Daphnia* species at different temperatures. *Hydrobiologia* **360**, 117-125.
- Sommer, A. M. & H.-O. Pörtner. 2002. Metabolic cold adaptation in the lugworm *Arenicola marina*: comparison of a North sea and a White sea population. *Marine Ecology Progress Series* **240**, 171-182.
- SPSS. Inc, 1999. SYSTAT 9.0. in, Chicago, Illinois 60606-6307.
- Steffensen, J. F. 2002. Metabolic cold adaptation of polar fish based on measurements of aerobic oxygen consumption: fact or artefact? Artefact! *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **132**, 789-795.



- Strong, K. W. & G. R. Daborn. 1980. The influence of temperature on energy budget variables, body size, and seasonal occurrence of the isopod *Idotea baltica* (Pallas). *Canadian Journal of Zoology* **58**, 1992-1996.
- Walls, M., C. LaurenMaata & M. Ketola. 1997. Phenotypic plasticity of *daphnia* life history traits: the roles of predation, food level and toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology* **38**, 353-364.
- Weber, A. & S. Declerck. 1997. Phenotypic plasticity of *daphnia* life history traits in response to predator kairomones: genetic variability and evolutionary potential. *Hydrobiologia* **360**, 89-99.
- Whiteley, N. M., E. W. Taylor & A. J. El Haj. 1997. Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. *Journal of Thermal Biology* **22**, 419-427.
- Whiteley, N. M., R. F. Robertson, J. Meagor, A. J. El Haj & E. W. Taylor. 2001. Protein synthesis and specific dynamic action in crustaceans: effects of temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology* **128**, 595-606.
- Wiggins, P. R. & P. B. Frappell. 2000. The influence of haemoglobin on behavioural thermoregulation and oxygen consumption in *Daphnia carinata*. *Physiological and Biochemical Zoology* **73**, 153-160.
- Wiggins, P. R. & P. B. Frappell. 2002. Behavioural thermoregulation in *Daphnia carinata* from different depths of a natural water body: influence of environmental oxygen levels and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology* **133**, 771-780.
- Withers, P. C. 1992. *Comparative animal physiology*, Victoria, Australia ; Toronto, Ont.
- Wohlschlag, D. E. 1960. Metabolism of an antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation. *Ecology* **41**, 287-292.
- Yurista, P. M. 1999. Temperature-dependent energy budget of an Arctic Cladoceran, *Daphnia middendorffiana*. *Freshwater Biology* **42**, 21-34.

## ANNEXE

### Mesure de la consommation d'oxygène des daphnies

#### **Respiration des daphnies**

Une daphnie est placée pendant 24 heures dans un tube ependorf de 1.5 ml contenant de l'eau stérile et fermé hermétiquement. Un autre ependorf 1.5 ml rempli de la même eau ne contient pas de daphnie et sert de contrôle.

Au bout de 24 heures l'eau de la daphnie et celle du contrôle sont prélevées avec une seringue 3 ml en perçant deux trous dans le capuchon du tube ependorf.

#### **Titration Winkler**

Enlever l'aiguille de la seringue et ajouter 2 solutions avec une micropipette :

7ul de  $\text{MnSO}_4$  (150g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  dans 250 ml)

7 ul de IK (80g NaOH et 150g NaI dans 250 ml)

Replacer l'aiguille et mélanger par inversement puis ajouter de la même façon

7 ul de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (70 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré dans 250 ml)

Replacer l'aiguille et mélanger par inversement.

Injecter la solution (devenue jaune) dans une cuvette à spectrophotomètre et lire l'absorbance pour une longueur d'onde de 440nm.

Pour connaître la correspondance entre la valeur d'absorbance et la concentration d'oxygène, faire une courbe étalon: mélanger de l'eau saturée en oxygène et de l'eau sans

oxygène (obtenue en faisant buller de l'azote dans l'eau pendant une ½ heure) dans des proportions connues:

	Eau sans O <sub>2</sub> (ml)	Eau avec O <sub>2</sub> (ml)
1	1.5	0
2	1.25	0.25
3	1	0.5
4	0.75	0.75
5	0.5	1
6	0.25	1.25
7	0	1.5

Pour chaque concentration obtenue, mélanger les 3 solutions MnSO<sub>4</sub>, IK, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et placer le mélange dans une cuvette à spectrophotomètre avec 0.5 ml d'eau et un micro-agitateur. Noter l'absorbance de départ.

Pour connaître la concentration d'oxygène de départ, faire une titration avec du thiosulfate (3.475g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> . 5H<sub>2</sub>O dans 1 litre) directement dans la cuvette spectrophotométrique. Au départ la solution est jaune et on ajoute du thiosulfate avec une micro-pipette jusqu'à ce que l'absorbance soit nulle (point de virage). Le volume de thiosulfate ajouté est proportionnel à la quantité d'oxygène de la solution:

$$O_2 = ((V_{thio} - V_{blc}) \times N_{thio} \times 5600) / (0.7 \times (V_{échantillon} - V_{réactifs}))$$

O<sub>2</sub> : Concentration d'O<sub>2</sub> (mg/L)

V<sub>thio</sub> : volume de thiosulfate utilisé pour le dosage (ml)

V<sub>blc</sub> : volume du blanc de réaction (ml)

N<sub>thio</sub> : normalité de la solution de thiosulfate

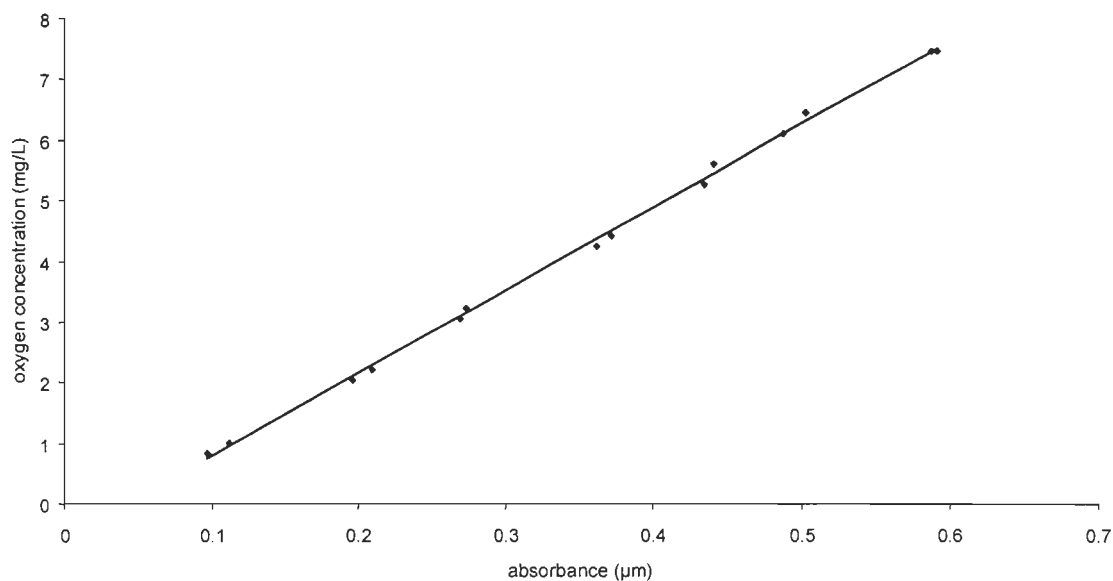
5600 : volume d'oxygène correspondant à 1 équivalent de thiosulfate à TPN (cm<sup>3</sup>)

0.7 : volume d'oxygène correspondant à 1 mg d'O<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup>)

V échantillon : volume de l'échantillon dosé (1.5 ml)

V réactifs : volume des réactifs ajoutés (0.021 ml)

La courbe étalon : O<sub>2</sub> (mg/L) = 13.682 x (Absorbance de départ en μm) – 0.5769 (avec r<sup>2</sup> = 0.998 et n = 14)



Grâce à cette courbe étalon on peut transformer les données d'absorbance de départ en concentration d'O<sub>2</sub>.

### Normalité du thiosulfate (Nthio)

Placer 1.93 ml d'eau et 7 μl de KIO<sub>3</sub> (0.02N) dans une cuvette à spectrophotomètre

Ajouter 7 μl d'IK et 7 μl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (les mêmes solutions que précédemment) et on mélange

Doser avec du thiosulfate pour obtenir le volume  $V_{thio}$

La normalité du thiosulfate est (volumes en ml)

$$N_{thio} = (VKIO_3 \times N \text{ KIO}_3) / V_{thio} - V_{blc}$$

Faire la moyenne de 5 dosages

### **Blanc de réaction ( $V_{blc}$ )**

Placer 1.993 ml d'eau distillée et 7 ul de  $KIO_3$  dans une cuvette spectrophotomètre

Ajouter 7 ul d'IK et 7 ul de  $H_2SO_4$

Ajouter 7 ul de  $MnCl_2$  et on mélange

Doser avec le thiosulfate ( $V_1$ )

Ajouter 7 ul de  $KIO_3$  et doser de nouveau avec le thiosulfate ( $V_2$ )

Le volume du blanc de réaction est  $V_{blc} = V_1 - V_2$

### **Calcul de la consommation d'oxygène par daphnie**

La concentration d'oxygène du contrôle moins la concentration d'oxygène de l'eau de la daphnie correspond à la consommation d'oxygène de la daphnie pendant 24 heures.

En divisant cette valeur par le temps on obtient la consommation d'oxygène par daphnie par heure.