



Université du Québec
à Rimouski

IMPACTS DE LA POLYPLOÏDIE SUR LA GESTION DES DOMMAGES INDUITS À L'ADN PAR RAYONNEMENT ULTRAVIOLET EN HAUTES LATITUDES

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en gestion de la faune et de ses habitats
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

PAR

© JEAN-MICHEL MARTIN

Février 2018

Composition du jury :

Christian Nozais, président du jury, Université du Québec à Rimouski

France Dufresne, directrice de recherche, Université du Québec à Rimouski

Huixiang Xie, codirecteur de recherche, Institut des sciences de la mer de Rimouski

Milla Rautio, examinateur externe, Université du Québec à Chicoutimi

Dépôt initial le 5 mai 2017

Dépôt final le 15 février 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

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

À mon père.

En mémoire de Guy-Philippe
Gaillard (1992-2018)

*Un jeu retardé est finalement
bon, mais un jeu précipité est mauvais
pour toujours. - Shigeru Miyamoto*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Mme France Dufresne, pour cette opportunité d'épanouissement académique, professionnel et personnel et pour toute son implication dans le projet. Merci d'avoir été de si bon conseil et d'avoir pris le temps de me guider au cours de ces trois années de travail acharné.

Je remercie tout aussi humblement mon codirecteur de recherche, M. Huixiang Xie, pour son aide dans la préparation et la mise en place de ce qui a probablement été le plus gros défi du projet : le système d'irradiation. Merci de votre patience et de votre calme.

Un grand merci à tous mes partenaires de laboratoire, qui sont rapidement devenus des amis sur qui j'ai pu compter inconditionnellement lors des périodes difficiles. Astrid et Kaven, merci d'avoir partagé avec moi votre expertise scientifique et d'avoir été de si bons mentors. Geneviève, merci de ton accueil et d'avoir égayé les journées grises avec ta joie de vivre et ta bonne humeur intarissable.

Un merci particulier à ma *Team de feu*, Florence, Mirelle et Vincent, d'avoir fait de cette aventure un moment aussi agréable et d'avoir su alléger les moments les plus lourds. Toutes ces pauses café à philosopher et ces soirées à s'amuser ont fait de mon petit monde un monde plus heureux. Merci de m'avoir fait confiance et pour votre oreille attentive.

Merci à feu Guy-Philippe et Benoit d'avoir été présents et disponibles. Merci de m'avoir tenu compagnie dans les moments où la motivation faisait défaut et d'avoir parsemé ce parcours de situations et de conversation parfois loufoques, parfois nécessaires.

Un merci tout spécial à mes parents, Johanne et Michel, à mon frère, Pierre-Yves, et à ma belle-famille, Carole, Pierre et Olivier, d'avoir cru en moi durant ces trois années parsemées de quelques hauts, d'un grand nombre de bas, mais surtout d'efforts et de persévérance que je ne me sentais pas toujours la force d'accomplir.

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans avoir mentionné la personne sans qui je n'écrirais sans doute pas ces lignes en ce moment : ma douce moitié, Joannie. Merci d'avoir sans cesse cru en moi, d'avoir su m'encourager et de m'avoir forcé à me relever lorsque j'étais au plus bas, d'avoir partagé toutes mes joies et toutes mes peines. Tu a su me faire passer outre mes nombreuses envies de tout abandonner et m'a permis d'accomplir ce grand projet duquel je serai fier pour plusieurs années à venir. Je t'aime.

J'espère que la vie permettra à nos chemins de se croiser de nouveau et, d'ici là, je vous souhaite, à tous, une bonne continuité.

Merci à tous d'avoir enrichi ma vie comme vous l'avez si bien fait.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire est le résultat de plus de trois années de travail dévoué et acharné qui n'ont pas été dénuées d'obstacles et d'épreuves, mais qui ont permis de découvrir un sens insoupçonné au terme persévérance. Il est destiné à tous ceux et celles qui cherchent à cultiver leur curiosité intellectuelle et scientifique.

Le projet de recherche présenté en ces pages s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés dans le laboratoire de Mme France Dufresne, professeure-chercheure à l'Université du Québec à Rimouski. Il cherche à expliquer comment la polyploïdie affecte l'adaptation chez les daphnies en hautes latitudes tout en mettant de l'avant l'utilisation de technologies encore peu répandue dans les études du même genre.

En espérant ce mémoire à la hauteur de vos attentes.

Bonne lecture.

RÉSUMÉ

La polypléidie, état d'un organisme possédant plus de deux séries complètes de chromosomes, favoriserait l'adaptation des organismes vivants confrontés à des perturbations environnementales fréquentes et qui doivent survivre dans des écosystèmes aux conditions extrêmes. La distribution géographique particulière de plusieurs espèces polypléides le long d'un gradient latitudinal supporte cette hypothèse. Chez les daphnies appartenant au complexe d'espèces *Daphnia pulex*, on retrouve presque uniquement des clones diploïdes dans les régions tempérées, de 30 à 50 % de clones triploïdes dans les régions subarctiques et presque exclusivement des clones triploïdes dans les régions arctiques. L'objectif de cette étude était de comparer les effets du rayonnement UV chez des clones diploïdes et polypléides afin de valider si ces derniers possédaient une tolérance plus élevée aux variations de ce facteur environnemental qui pourrait expliquer leur distribution géographique. Dans cette optique, des clones diploïdes et triploïdes de régions subarctiques du Canada ont été exposés à des radiations solaires simulées, équivalentes à celles reçues en nature en termes d'intensité et de durée, afin de constater de l'efficacité de leur gestion des dommages ainsi induits à leur matériel génétique. Des analyses ont été réalisées sur divers traits d'histoire de vie et sur le taux d'expression relatif de six gènes : les gènes de la *photolyase* et de la *photolyase-1* (deux enzymes de photoréparation), un gène de réparation non-spécifique (*XPA*), les gènes de la *dopa-décarboxylase* et de la *phénoloxydase* (deux protéines liées à la mélanisation) ainsi que le gène du facteur *P53*. Contrairement aux hypothèses initiales, l'expression des gènes ciblés n'était pas plus élevée chez les clones polypléides que chez les clones diploïdes suite à une exposition aux UV. Les rayons UV n'ont pas non plus eu d'effets moins importants sur les daphnies polypléides que sur les daphnies diploïdes pour ce qui est des traits d'histoire de vie, bien que la mortalité était légèrement plus faible chez les clones polypléides. Une relation a d'ailleurs pu être établie entre la résistance de certains clones au rayonnement UV et les paramètres physicochimiques de leur étang d'origine affectant la pénétration de la lumière dans l'eau, notamment la concentration en carbone organique dissout (DOC). Cette relation n'a cependant pas pu être établie pour tous les clones, ce qui suggère que leur phénotype est adéquat en milieu naturel, mais issu d'événements adaptatifs passés. Il semblerait donc que les clones de niveau de pléidie différent soient localement adaptés au rayonnement solaire et que d'autres facteurs entrent en jeu dans la répartition particulière des polypléides.

Mots clés : Complexe *Daphnia pulex* ; Polypléidie ; Adaptation ; Photoréparation ; Mélanisation ; Rayonnement ultraviolet ; Arctique

ABSTRACT

Polyploidy, which characterizes any organism possessing more than two complete sets of chromosomes, is suspected of promoting adaptation in living organisms opposed to frequent environmental disturbances and when that must perform under extreme conditions typical of some ecosystems. This hypothesis seems to be supported by the geographical distribution of many polyploid species, in which ploidy level follows a latitudinal gradient. Daphnia clones from the Daphnia pulex's complex are most exclusively diploids in temperate regions, as triploids account for 30 to 50 % of clone diversity in subarctic ecosystems and are exclusive to the high arctic. This study attempted to measure the impact of prolonged exposure to the UV spectrum on diploid and polyploid daphnia clones to assess their respective tolerance and to better understand their geographical distribution. From this perspective, diploid and triploid daphnia clones from Canada's subarctic regions have been exposed to simulated solar radiations equivalent to those received in their natural habitat in terms of intensity and duration, experiment which was conducted to evaluate the effectiveness of daphnia's management of thus induced DNA damages. Analyzes were carried out on multiple life history traits and on the relative expression rate of six genes: the photolyase and photolyase-1's genes (two photoreparation enzymes), a non-specific repair gene (XPA), the dopa-decarboxylase and phenoloxidase's genes (two proteins linked to melanization) as well as the P53 factor's gene. Results showed that triploid clones' targeted genes' expression was not higher in comparison to diploid clones' following the experimental UV exposure, which invalidate initial hypothesis. UV exposure also did not have the expected impact on life history traits, which were thought to be less affected among polyploids, although their mortality rate was slightly lower. The results also helped establish a relationship between UV resistance and physicochemical parameters of sampling ponds for a few clones, especially dissolved organic carbon's (DOC) concentration which is known to have an impact on light penetration. However, such relationship could not be established for all clones, suggesting that their phenotype is adequate in their actual natural environment and is the result of past adaptive events. Therefore, it seems clones, regardless of their ploidy level, are locally adapted to sun's irradiance and that other factors have a role to play in the observed distribution of polyploid individuals.

Keywords: Daphnia pulex's complex ; Polyploidy ; Adaptation ; Photorepair ; Melanization; Ultraviolet radiations ; Arctic

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ix
AVANT-PROPOS.....	xi
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
TABLE DES MATIÈRES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES.....	xxi
LISTE DES ÉQUATIONS.....	xxv
LISTE DES SYMBOLES.....	xxvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xxix
IMPACTS DE LA POLYPLOÏDIE SUR LA GESTION DES DOMMAGES INDUITS À L'ADN PAR RAYONNEMENT ULTRAVIOLET EN HAUTES LATITUDES	
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	3
1.1 INTRODUCTION GENERALE.....	3
1.1.1 L'adaptation contre les changements globaux.....	3
1.1.2 Le genre <i>daphnia</i> : un modèle adaptatif.....	5
1.1.3 Rayonnement ultraviolet.....	6
1.1.4 Le cas des daphnies arctiques et subarctiques.....	10
1.1.5 La polyploïdie comme mécanisme d'adaptation.....	11
1.1.6 Problématique.....	12
1.2 INTRODUCTION AU PROJET DE RECHERCHE.....	14

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	19
2.1 ÉCHANTILLONNAGE ET CONSERVATION DES ANIMAUX.....	19
2.2 ÉLEVAGE.....	20
2.3 IDENTIFICATION.....	20
2.4 DISTRIBUTION ET MELANISATION SUR LE TERRAIN.....	22
2.5 EXPOSITION EXPERIMENTALE AUX RAYONS ULTRAVIOLETS.....	24
2.5.1 Mesure de l'expression génique.....	25
2.5.2 Traits d'histoire de vie.....	26
2.6 ANALYSES ET ANALYSES STATISTIQUES.....	28
2.6.1 Identification.....	28
2.6.2 Analyses statistiques.....	28
 CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	 33
3.1 RESULTATS.....	33
3.1.1 Analyse du site d'étude.....	33
3.1.2 Analyses expérimentales.....	33
3.2 DISCUSSION.....	45
3.2.1 Site d'étude et distribution des daphnies.....	45
3.2.2 Exposition expérimentale.....	54
 CHAPITRE 4 CONCLUSION.....	 59
4.1 CONCLUSION DU PROJET DE RECHERCHE.....	59
4.2 CONCLUSION GENERALE.....	60
 ANNEXES.....	 63
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Paires d'amorces utilisées dans l'identification des daphnies échantillonnées à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 à l'espèce et au clone par amplification en PCR du gène mitochondrial <i>ND5</i> et de quatre marqueurs microsatellites	23
Tableau 2. Paires d'amorces utilisées dans la quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt de la réponse à une exposition aux ultraviolets des daphnies échantillonnées à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 en qPCR, plus deux gènes de référence.....	29
Tableau 3. Identification des clones en élevage parmi les daphnies échantillonnées à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 (plus deux clones provenant de Kuujjuaraapik) sur trois niveaux : l'espèce, quatre marqueurs microsatellites et le niveau de ploïdie	38

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Dent de cou chez <i>Daphnia</i> spp. en microscopie électronique (figure tirée de Popular Science, 2011)	5
Figure 2. Comparaison entre une daphnie dont la carapace est mélanisée (droite) et une daphnie non pigmentée (gauche) (figure tirée de Miner, 2014)	5
Figure 3. Analyse canonique de redondance (RDA) sur la fréquence de daphnies mélanisées et polyplœides (rouge) dans les différents étangs (points noirs) échantillonnés à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 en en fonction des paramètres environnementaux (flèches noires)	36
Figure 4. Cadrage multidimensionnel (MDS) à trois dimensions (stress = 0.04) des distances de Bray-Curtis des paramètres physicochimiques des étangs et des étangs échantillonnés à Churchill (Manitoba) en juillet 2014. Les groupements issus de l'analyse de groupement à 80 % de similarité sont illustrés sur la MDS	37
Figure 5. Taux de mortalité en fonction du clone (a et c), de la ploïdie (b et d), du traitement d'exposition expérimental aux UV et du temps suivant l'expérimentation (a et b : post-exposition ; c et d : post-repos(total)). Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique	39
Figure 6. Nombre d'œufs de la première portée en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....	40
Figure 7. Taux de croissance juvénile (g) en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD (lettres) sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA et des groupes LSD (chiffres) sur les normes de réaction (pente).....	41

Figure 8. Taux de croissance intrinsèque de la population (r) selon l'équation d'Euler-Lotka en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD (lettres) sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA et des groupes LSD (chiffres) sur les normes de réaction (pente)	42
Figure 9. Taux de croissance juvénile (g) (A), taux de croissance intrinsèque de la population (r) (B) et nombre d'œufs à la première portée (C) en fonction du niveau de ploïdie et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....	43
Figure 10. Expression relative normalisée de <i>PHR-Y05</i> en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....	46
Figure 11. Expression relative normalisée de <i>PLA-1</i> en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....	47
Figure 12. Expression relative normalisée de <i>XPA</i> en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....	48
Figure 13. Expression relative normalisée de <i>PO245</i> en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....	49
Figure 14. Expression relative normalisée de <i>Ddc</i> en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....	50

- Figure 15. Expression relative normalisée de *P53* en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)51
- Figure 16. Expression relative normalisée des six gènes d'intérêt dans la réponse aux UV en fonction du niveau de ploïdie et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente).....52
- Figure 17. Représentation de l'expression relative normalisée des six gènes d'intérêt dans la réponse aux UV et des stratégies différentielles d'expression génique en fonction du clone53

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation <i>i</i> . Calcul de la taille de génome	22
Équation <i>ii</i> . Calcul de l'intensité lumineuse selon la profondeur de la colonne d'eau	24
Équation <i>iii</i> . Calcul du taux de croissance somatique chez la daphnie.....	27
Équation <i>iv</i> . Équation d'Euler-Lotka sur la croissance des populations.....	27
Équation <i>v</i> . Calcul des normes de réaction de l'expression des gènes ciblés	31

LISTE DES SYMBOLES

$I_{0,\lambda}$	Intensité lumineuse à la surface de l'eau
$I_{\lambda,z}$	Intensité lumineuse à une profondeur (z) donnée
k_{λ}	Coefficient d'atténuation de la lumière
l_f	Taille (ou poids) à maturité
l_i	Taille (ou poids) à la naissance
l_x	Probabilité de survie jusqu'à un moment (x) donné
m_x	Fécondité à un moment (x) donné
$r\Delta_{t,x}$	Taux de croissance d'une population sur un pas de temps (Δ_t) donné à un moment (x) donné
z	Profondeur
Δ_{CT}	Différence dans le nombre de cycle qPCR nécessaire à l'atteinte du seuil de fluorescence détectable
Δ_t	Nombre de jours entre la naissance et l'atteinte de la maturité

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

2n	Diploïde
3n	Triploïde
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN_c	ADN complémentaire
ADN_{mt}	ADN mitochondrial
ANOSIM	Analyse de similarité, issu de l'anglais <i>analysis of similarities</i>
ANOVA	Analyse de variance, issu de l'anglais <i>analysis of variance</i>
ARN	Acide ribonucléique
CDOM	Matière organique dissoute colorée, issu de l'anglais <i>colored dissolved organic matter</i>
CNSC	<i>Churchill Northern Studies Centre</i>
CRM	<i>Hansell's consensus reference materials</i>
Ddc	Gène codant pour la <i>Dopa-décarboxylase</i>
DOC	Carbone organique dissout, issu de l'anglais <i>dissolve organic carbon</i>
DPU	Locus microsatellite du complexe <i>Daphnia pulex</i> , issus de l'anglais <i>Daphnia pulex microsatellite</i>
ERO	Espèce réactive de l'oxygène ; traduit de l'anglais <i>reactive oxygen species (ROS)</i>

xxx

F	Amorce avant, issu de l'anglais <i>forward primer</i>
FAM	<i>6- fluorescéine amidite</i>
HEX	<i>Hexachloro- fluorescéine</i>
IF	Intensité de fluorescence
LSD	Différence significative minimale, issu de l'anglais <i>least significant difference</i>
MDS	Cadrage multidimensionnel, issu de l'anglais <i>multidimensional scaling</i>
Mt-ND5	Gène codant pour la <i>NADH déshydrogénase 5</i> mitochondriale
P53	Gène codant pour le <i>Facteur supprimeur de tumeur P53</i>
PAR	Radiation photosynthétiquement active, issu de l'anglais <i>photosynthetically active radiation</i>
PHR-Y05	Gène codant pour la <i>Photolyase</i> , issu de l'anglais <i>Photorepair</i>
PLA-1	Gène codant pour la <i>Photolyase-1</i>
PO245	Gène codant pour la <i>Phénoloxydase</i>
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative, issu de l'anglais <i>quantitative polymerase chain reaction</i> .
R	Amorce inverse, issu de l'anglais <i>reverse primer</i>
RDA	Analyse de redondance, issu de l'anglais <i>redundancy analysis</i>
STX	Gène codant pour la <i>Syntaxine-16</i>
TCS	Taux de croissance somatique
TDN	Azote dissout total, issu de l'anglais <i>total dissolved nitrogen</i>

TG	Taille de génome
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet A
UVB	Ultraviolet B
UVC	Ultraviolet C
XBP	Gène codant pour la <i>protéine de liaison à la boîte X</i> , issu de l'anglais <i>X-box binding protein</i>
XPA	Gène codant pour la <i>protéine de réparation de l'ADN complémentaire aux cellules atteintes de Xeroderma pigmentosum de groupe A</i> , issus de l'anglais <i>DNA repair protein complementing XP-A cells</i>

**IMPACTS DE LA POLYPLOÏDIE SUR LA GESTION DES DOMMAGES
INDUITS À L'ADN PAR RAYONNEMENT ULTRAVIOLET EN HAUTES
LATITUDES**

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1.1 L'ADAPTATION CONTRE LES CHANGEMENTS GLOBAUX

Dans un contexte de changements globaux, les organismes devront être en mesure de s'adapter rapidement aux multiples perturbations environnementales s'ils veulent survivre. Plusieurs facteurs et mécanismes contribuent au potentiel adaptatif d'un individu. Tous ces mécanismes ont en commun la modification d'un ou plusieurs caractères phénotypiques. Cette différenciation phénotypique origine, le plus souvent, d'interactions complexes entre le génotype d'un organisme et l'environnement. L'adaptation locale implique une modification conférant un avantage reproductif et/ou de survie à un organisme dans un microhabitat (Kawecki et Ebert, 2004). Ainsi, des individus d'une même espèce distribués géographiquement dans un milieu hétérogène présenteront des adaptations différentes selon les conditions et les paramètres exerçant une plus forte pression de sélection dans leur microhabitat respectif (Kawecki et Ebert, 2004). Ce phénomène est relativement rapide et résulte généralement d'un ou d'une combinaison des trois mécanismes suivants : la mutation, la plasticité phénotypique et les mécanismes de régulation d'expression des gènes.

1.1.1.1 MUTATION

Les mutations sont un changement fortuit dans le matériel génétique qui peut être ponctuel (un seul nucléotide) ou s'étendre à l'échelle chromosomique. L'apparition de mutations augmente la variabilité entre les individus d'une population ce qui entraîne une

hausse de la probabilité de voir un individu mieux performer que les autres dans l'habitat. Des facteurs endogènes (ex. radicaux libres) et exogènes (ex. radiations solaires) ou encore des erreurs de transcription lors du processus de réplication de l'ADN durant la méiose/mitose des cellules sont à l'origine des mutations (Peddie *et al.*, 1997 ; Ahloowalia et Maluszynski, 2001). Le taux de mutation des gènes nucléaires, est généralement très faible, de l'ordre de 10^{-10} mutations/génération/division cellulaire chez les eucaryotes supérieurs (Drake *et al.* 1998). Pour s'adapter, les organismes peuvent piger dans leur réservoir de mutations génétiques ou attendre qu'une nouvelle mutation bénéfique puisse être fixée par la sélection, ce qui implique un temps de réponse très lent.

1.1.1.2 PLASTICITE PHENOTYPIQUE

La plasticité phénotypique est définie comme la capacité du génotype à produire de multiples phénotypes pour un caractère donné (DeWitt *et al.*, 1998 ; West-Eberhard, 2003, 2005 ; Auld *et al.*, 2010 ; Schlichting et Wund, 2014 ; Yampolsky *et al.*, 2014). Cette plasticité permet aux organismes de répondre rapidement à un changement environnemental en intégrant les stimuli externes, puis en modulant la forme d'un caractère associé au cours du développement (ontogénie, croissance et/ou mue). La relation qui existe entre l'état d'un phénotype et un gradient environnemental est appelée normes de réaction (Lynch et Walsh, 1998 ; Crispo, 2007). Cette relation est modulable et héritable et illustre le(s) seuil(s) d'un gradient environnemental au-dessus/au-dessous duquel (desquels) engendrant une modification phénotypique chez un organisme (Lynch et Walsh, 1998 ; Crispo, 2007 ; Richards *et al.*, 2012).

1.1.1.3 REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

Il existe différentes catégories de mécanismes via lesquels l'expression d'un gène codant est régulée (Allis *et al.*, 2007 ; Bonasio *et al.*, 2010 ; Richards *et al.*, 2012 ; Schlichting et Wund, 2014). Ces processus incluent généralement la présence de protéines jouant le rôle de catalyseur ou d'inhibiteur au moment de la transcription d'une séquence d'ADN (Karp, 2004 ; Allis *et al.*, 2007). L'expression d'un gène peut aussi être régulée

chimiquement par la méthylation des cytosines ou par une modification dans l'enroulement des chromosomes (Karp, 2004 ; Allis *et al.*, 2007). Ce sont ces processus chimiques que l'on nomme processus épigénétiques (Karp, 2004 ; Allis *et al.*, 2007). Ces modifications peuvent être transmissibles aux cycles cellulaires suivants ainsi qu'aux générations suivantes et sont, au cours du développement, dictées par les stimuli environnementaux (Lynch et Walsh, 1998 ; West-Eberhard, 2003, 2005 ; Allis *et al.*, 2007 ; Schlichting et Wund, 2014). Ce sont ces mécanismes qui intègrent les stimuli environnementaux et qui altèrent l'état d'un phénotype en conséquence, sans pour autant qu'il y ait de modification dans la composition allélique du génotype d'un organisme.

1.1.2 LE GENRE *DAPHNIA* : UN MODELE ADAPTATIF

Les daphnies représentent un excellent modèle pour étudier les réponses phénotypiques en réponse aux changements de l'environnement puisqu'elles possèdent une phase clonale. Ainsi un même génotype peut être exposé à différentes conditions environnementales. Plusieurs modifications phénotypiques ont été caractérisées chez les daphnies. La présence de prédateurs entraîne la formation d'excroissance morphologique sur la carapace des daphnies prenant la forme d'une dent de cou ou d'un casque (Lüning, 1992 ; Spitze, 1992 ; Laforsch et Tollrian, 2004) (Fig. 1). En contrepartie, le taux de croissance et l'atteinte de la maturité sont ralentis par la formation de ces excroissances (Spitze, 1992). Les pressions de prédation

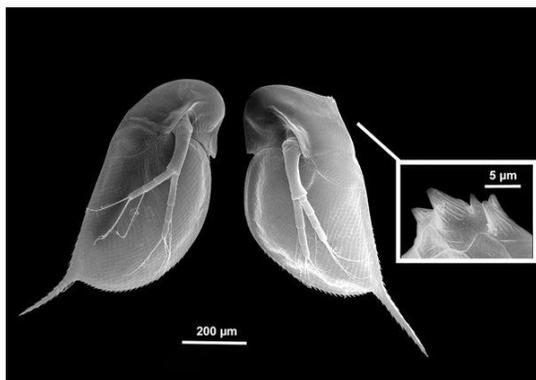


Figure 2. Dent de cou chez *Daphnia* spp. en microscopie électronique (figure tirée de Popular Science, 2011)



Figure 1. Comparaison entre une daphnie dont la carapace est mélanisée (droite) et une daphnie non pigmentée (gauche) (figure tirée de Miner, 2014)

entraînent aussi des modifications comportementales chez les daphnies, qui modifieront leur patron de migration verticale dans la colonne d'eau afin d'éviter les profondeurs à forte densité de prédateurs (Leach *et al.*, 2015). L'introduction de prédateurs mène aussi à une perte de la mélanisation chez les daphnies pigmentées afin de diminuer leur visibilité (Tollrian et Heibl, 2004 ; Scoville et Pfrender, 2010) (Fig. 2). La mélanisation de la carapace est, quant à elle, un phénotype de protection en réponse à de fortes radiations solaires, principalement les rayonnements ultraviolets (UV) (Hessen, 1996 ; Hessen *et al.*, 2002 ; Rautio et Korhola, 2002 ; Miner et Kerr, 2011).

1.1.3 RAYONNEMENT ULTRAVIOLET

Les rayons UV (100-400 nm) précèdent directement la lumière visible (400-700 nm) dans le spectre électromagnétique et sont considérés comme un rayonnement énergétique pouvant pénétrer les membranes biologiques et avoir des effets sur la santé des organismes. La gamme UV se divise en trois plages distinctes : les UVA (320-400 nm), les UVB (280-320 nm) et les UVC (100-280 nm). Ces derniers, bien qu'extrêmement nocifs, sont filtrés en totalité par l'atmosphère et n'atteignent pas la surface de la terre. Ils sont souvent créés artificiellement à des fins de décontamination bactérienne. Ce n'est pas le cas des UVA et des UVB, dont respectivement 95 % et 5 % de ce qui est émis par le soleil atteignent la surface. Malgré ce faible taux, les UVB sont considérés comme l'une des plus importantes pressions sélectives que subissent les organismes vivants à l'échelle globale dû à leur impact direct et généralement négatif sur les fonctions physiologiques de ceux-ci (Williamson *et al.*, 2001). Les effets des UVA sont quant à eux bidirectionnels, puisqu'en plus d'affecter négativement la croissance et la survie des organismes, ils sont soupçonnés d'être les principaux activateurs de certaines réponses physiologiques à une surexposition à la lumière et plus précisément aux UVB (Williamson *et al.*, 2001).

1.1.3.1 DANS LA COLONNE D'EAU

Dans la colonne d'eau, la pénétration des UV est principalement fonction de la teneur en matière organique dissoute colorée (CDOM) dans le milieu qui, elle, est corrélée à la

teneur en carbone organique dissout (DOC) (Morris *et al.*, 1995). Les UV sont aussi impliqués dans la dégradation et le recyclage de la matière organique (Bais *et al.*, 2011 ; McKenzie *et al.*, 2011 ; Zepp *et al.*, 2011 ; revu par Vonk *et al.*, 2015). Ils contribuent à fractionner les molécules organiques de manière à en faire des formes assimilables pour les algues et les bactéries. Se faisant, une partie des UV qui pénètrent dans la colonne d'eau est absorbée ce qui protège les organismes d'une surexposition (Bais *et al.*, 2011 ; McKenzie *et al.*, 2011 ; Zepp *et al.*, 2011 ; revu par Vonk *et al.*, 2015). Il est aussi suggéré qu'une forte teneur en DOC exposée aux UV est une source potentielle d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), caractérisant tous produits chimiques oxygénés dont l'atome d'oxygène possède des électrons non appariés le rendant chimiquement très réactif (Hessen *et al.*, 1996, 2002).

1.1.3.2 IMPACT DES CHANGEMENTS GLOBAUX EN HAUTES LATITUDES

Dans les régions subarctiques et arctiques, les plans d'eau sont complètement recouverts de glace en hiver, limitant l'irradiation solaire jusqu'au moment de la fonte de cette glace en été. Cependant, cette fonte est de plus en plus hâtive et l'irradiation de ces étangs débute de plus en plus tôt (Bais *et al.*, 2011 ; McKenzie *et al.*, 2011 ; Zepp *et al.*, 2011). Annuellement, ces plans d'eau et les organismes qui y vivent sont donc exposés plus longtemps au rayonnement UV et, ce, de manière quasi-continue avec un ensoleillement avoisinant les 24 heures par jour en été. La fonte préoccupante du pergélisol causée par les changements globaux a aussi des effets sur les écosystèmes environnants, dont les étangs tundriques (revu par Vonk *et al.*, 2015). Ce dégel entraîne l'écoulement d'une grande quantité de matière organique du sol vers les plans d'eau augmentant leur turbidité. Dans des cas extrêmes, la pénétrance des UV est limitée à la couche de surface, puisque l'entièreté du rayonnement incident est absorbée par la matière organique affluente. On observe alors une stratification de la colonne d'eau et un débalancement des boucles microbiennes de recyclage des molécules organiques. Cependant, comme les étangs tundriques sont souvent peu profonds et les UV en atteignent tout de même le fond malgré une atténuation de plus en plus importante.

1.1.3.3 EFFETS SUR LES ORGANISMES VIVANTS

Les UV ont un impact direct sur le matériel génétique des organismes. Les UVB entraînent la formation de dimères de pyrimidines, qui obstruent la transcription des gènes. Une transcription erronée d'un gène codant peut mener à des mutations délétères, voire létales (MacFayden *et al.*, 2004 ; Pfeifer *et al.*, 2005 ; Choi *et al.*, 2006 ; Ikehata et Ono, 2011). Les UVB contribuent aussi à la formation d'ERO, tant dans le milieu qu'à l'intérieur des cellules des organismes via la dégradation des protéines et des lipides (Sucré *et al.* 2012). Ces formes d'oxygène sont une source de dommages supplémentaire pour le matériel génétique et engendrent, lorsqu'en trop grande quantité, un stress oxydatif dans les cellules. Ceci perturbe la respiration cellulaire et le bon fonctionnement des cellules (Hessen *et al.*, 2002). L'exposition au rayonnement UV n'est cependant pas une fatalité pour les organismes qui ont développé diverses stratégies de protection et de réparation. La mélanisation et l'évitement comportemental sont deux modifications phénotypiques visant à protéger le matériel génétique des radiations solaires (Scoville et Pfrender, 2010 ; Miner *et al.*, 2011, 2013, 2015 ; Rose *et al.*, 2012). Dans les cas où ces défenses ne seraient pas suffisantes, les organismes possèdent une batterie de gènes codants pour des protéines ayant pour fonction de détecter et de réparer les lésions causées à l'ADN par les UV. Les *photolyases* sont des protéines spécialisées dans la détection et l'excision des dimères de pyrimidines causés par une exposition aux UV et leur activation est dépendante de la lumière visible (Grad *et al.*, 2001 ; Miner *et al.*, 2015). L'efficacité de ces réponses physiologiques et métaboliques est aussi modulée par d'autres paramètres environnementaux, principalement la température. La réparation du génome tend en effet à être moins efficace lorsque le ratio UV/température augmente (MacFadyen *et al.*, 2004).

1.1.3.4 ADAPTATIONS DES DAPHNIES AUX UV

Chez les daphnies et plusieurs autres organismes, une surexposition aux UV affecte l'intégrité du matériel génétique et des tissus, en plus d'avoir un effet négatif sur la croissance et la reproduction (Huebner *et al.*, 2013). Les stratégies de mélanisation et d'évitement comportemental ont été observées chez les daphnies du complexe *pulex* et ont

pu être mises en relation avec l'incidence du rayonnement UV (Scoville et Pfrender, 2010 ; Miner *et al.*, 2011, 2013, 2015 ; Rose *et al.*, 2012). Toutes les daphnies possèdent la capacité de produire de la mélanine, car c'est un élément essentiel à la production d'éphippies, les œufs de résistance (Hebert et McWalter, 1983). La mélanisation est un phénotype plastique et coûteux. Par exemple, en présence de prédateurs visuels et malgré une exposition au UV, les daphnies perdent leur pigmentation (Scoville et Pfrender, 2010). De plus, des daphnies mélanisées dans des conditions de faibles UV ont tendance à moins bien performer d'un point de vue compétitif et en termes de survie que les clones non-mélanisés en plus de voir le taux de croissance diminuer (Hessen, 1996 ; Miner *et al.*, 2015). Il a aussi été démontré que la pigmentation chez les daphnies était corrélée négativement à la teneur en DOC des plans d'eau (Hebert, 1987 ; Hessen, 1996 ; Hessen *et al.*, 2002 ; Rautio et Korhola, 2002). Du côté de l'évitement comportemental, il a été démontré que les daphnies effectuaient des migrations verticales vers le fond lorsque la pénétrance des UV augmentait (Rose *et al.*, 2012).

Au niveau génétique, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la mélanisation et dans la réparation des dommages à l'ADN a été déjà mesurée chez les daphnies. Scoville et Pfrender (2010) ont montré qu'une diminution dans l'expression des gènes de la *dopa-décarboxylase* (*Ddc*) et de la mélanisation chez les arthropodes, *ebony*, était associée à la synthèse de la mélanine lorsqu'il y a exposition aux UV. Miner *et al.* (2015) ont mesuré l'expression de la *photolyase* sous différentes intensités d'UV, mais n'ont pas décelé de différence entre les traitements. Ils ont aussi quantifié les dommages causés à l'ADN par les UV et l'efficacité de réparation dans le noir et à la lumière. Ils ont pu confirmer que l'activation du gène de la *photolyase* chez les daphnies nécessitait la présence de lumière visible. Finalement, les deux études ont montré que les clones qui vivent dans des étangs fortement exposés aux radiations solaires sont plus plastiques en ce qui a trait à la mélanisation et subissent moins de dommages que celles des étangs moins exposés aux UV.

1.1.4 LE CAS DES DAPHNIES ARCTIQUES ET SUBARCTIQUES

Les daphnies des hautes latitudes sont fortement exposées au rayonnement UV. En été, l'irradiance de la gamme de radiation active photosynthétiquement (PAR) atteint les 1800 $\mu\text{molphotons/m}^2\cdot\text{s}$ (Mostajir *et al.*, 1999). Dans les régions arctiques, les plans d'eau sont couverts de glace durant la moitié de l'année. La fonte des glaces est de plus en plus hâtive et les plans d'eau sont exposés à un nouveau régime d'irradiation solaire annuel (Bais *et al.*, 2011 ; McKenzie *et al.*, 2011 ; Zepp *et al.*, 2011). Le complexe *D. pulex* (Colbourne et Hebert, 1996) domine les étangs subarctiques et arctiques (Weider *et al.*, 1999). Ce complexe est principalement composé de deux espèces/groupes : *D. pulex* (Linné, 1758), *D. pulicaria* (Forbes, 1893) et *D. tenebrosa* (Weider *et al.*, 1999). La parthénogenèse cyclique est le mode de reproduction ancestrale chez la daphnie et domine les milieux plus tempérés. La parthénogenèse obligatoire est apparue plus tard dans l'histoire évolutive des daphnies et se retrouve chez des clones de *Daphnia pulex* dans l'est de l'Amérique du Nord ainsi que dans les régions polaires (Hebert *et al.*, 1983). L'absence de mâles rend la reproduction beaucoup plus rapide puisque les individus n'ont pas à rechercher et à sélectionner de partenaire.

Une autre particularité des espèces du complexe *Daphnia pulex* est que plusieurs lignées sont polyploïdes. On dit d'un organisme qu'il est polyploïde lorsqu'il possède plus de deux séries complètes de chromosomes (Stebbins, 1950, 1971). Il a été démontré que les clones du complexe *pulex* sont soit diploïdes, soit triploïdes (Vergilino *et al.*, 2009). Les individus polyploïdes sont distribués selon un gradient géographique. En effet, les hautes latitudes sont dominées par les clones triploïdes, mais les raisons derrière un tel gradient sont encore inconnues à ce jour (Beaton et Hebert, 1988 ; Dufresne et Hebert, 1994, 1998). Les daphnies triploïdes possèdent de plus grosses cellules, sont plus grosses à maturité, mais ont un taux de croissance plus faible que les diploïdes (Lynch, 1984 ; Weider *et al.*, 1987 ; Beaton et Hebert, 1988). Ces constats ne sont cependant pas suffisants pour expliquer la parthénogenèse géographique observée. Le taux de respiration cellulaire et

l'activité métabolique ne sont pas non plus des éléments de réponses, car elles ne sont pas affectées par le niveau de ploïdie (Ratté, 2011).

1.1.5 LA POLYPLOÏDIE COMME MECANISME D'ADAPTATION

Le niveau de ploïdie d'un organisme participerait aussi au potentiel adaptatif et évolutif de ce dernier (revu par Otto et Whitton, 2000 et par Comai, 2005). L'état polyploïde est observé principalement chez les plantes, où 30 à 80 % des espèces fossiles et actuelles possèdent au moins un jeu de chromosomes supplémentaire (Masterson, 1994). Chez les animaux, la polyploïdie est beaucoup plus rare, mais est retrouvée chez tous les groupes exception faite des oiseaux et des mammifères (Lewis, 1980). On dénote deux formes de polyploïdie : l'autopolyploïdie, caractérisée par une augmentation de jeux complets de chromosomes au sein d'une même espèce (Comai, 2005) et l'alloployploïdie, caractérisée par une augmentation de jeux complets de chromosomes suite à un événement d'hybridation (Kihara et Ono, 1926). Cette mutation qui affecte la ségrégation des chromosomes peut aussi prendre plusieurs formes qui, dans tous les cas, altère la division cellulaire lors de la mitose/méiose (Otto et Whitton, 2000 ; Comai, 2005). Parmi les conséquences de la polyploïdie sur le phénotype d'un organisme, on note une augmentation de la taille des cellules (Cavalier-Smith, 1978), une diminution du taux de croissance (Fankhauser, 1945) et un saut vers un mode de reproduction asexuée (Stebbins, 1980). Tel que mentionné plus haut, ces modifications phénotypiques sont observées chez les daphnies en hautes latitudes.

Pour que la polyploïdie contribue à l'adaptation locale et ultimement à l'évolution d'un organisme, elle doit être associée à l'apparition de nouveaux états phénotypiques au potentiel adaptatif supérieur. Il a été démontré que le taux de formation d'organismes polyploïdes varie selon les conditions environnementales, principalement la température (Bogart *et al.*, 1989 ; Dufresne et Hebert, 1998 ; Ramsey et Schemske, 1998). L'occurrence d'individus polyploïdes augmente aussi avec l'altitude et la latitude, phénomène nommé parthénogenèse géographique (Beatty, 1957 ; Beaton et Hebert, 1988 ; Dufresne et Hebert,

1994, 1998). La tolérance accrue aux habitats plus extrêmes des polyploïdes s'explique à la fois par l'augmentation de l'hétérozygotie due à l'ajout de chromosomes et par la différenciation des niches écologiques entre les polyploïdes et les diploïdes (Lokki et Saura, 1980 ; Levin, 1983 ; Martins *et al.*, 1998). Ces deux constats octroient respectivement aux polyploïdes une plus grande flexibilité métabolique et une moindre confrontation à la compétition. À l'échelle du génome, le fait de posséder un ou plusieurs chromosomes supplémentaires réduit/annule l'effet d'allèles et de mutations délétères (Paquin et Adams, 1983). La plus grande quantité de matériel génétique augmente aussi la probabilité de voir l'apparition de mutations et de nouveaux allèles bénéfiques et avantageux (Paquin et Adams, 1983). Pour toutes ces raisons, le taux d'adaptation chez les polyploïdes serait plus élevé que chez les haploïdes et les diploïdes (Otto et Whitton, 2000). L'impact adaptatif de la polyploïdie a d'ailleurs été relevé chez certaines espèces de plantes invasives en leur permettant d'être préadaptées aux conditions des nouveaux environnements (te Beest *et al.*, 2012).

1.1.6 PROBLEMATIQUE

La polyploïdie soulève encore bien des questions, et la parthénogenèse géographique entre les diploïdes et les polyploïdes demeure un mystère. Plusieurs études sur les impacts des rayons UV sur les clones du complexe *Daphnia pulex* ne prennent pas en considération le niveau de ploïdie des organismes. Parallèlement, les études visant à comprendre l'effet de la polyploïdie sur les mécanismes physiologiques et métaboliques n'ont pas détecté de disparité entre les niveaux de ploïdie. Dans le contexte de changements globaux actuel, il est primordial de comprendre les mécanismes d'adaptation mis en place par les organismes évoluant dans les régions les plus à risque et les paramètres qui les influence. La polyploïdie pourrait accélérer les processus adaptatifs, mais aucune mesure directe n'a encore corroboré cette hypothèse. Il demeure plausible qu'une augmentation du nombre de chromosomes augmente la probabilité de subir des dommages à l'ADN.

1.1.6.1 OBJECTIFS ET HYPOTHESES

Dans ce contexte, ce projet de recherche a pour objectifs de déterminer chez le complexe d'espèce *Daphnia pulex* (1) la relation entre la distribution géographique des clones diploïdes et triploïdes et les paramètres environnementaux, (2) l'effet du niveau de ploïdie et des caractéristiques de l'étang de provenance sur l'expression de gènes d'intérêt dans la réponse à une exposition aux UV en laboratoire et (3) l'effet du niveau de ploïdie et des caractéristiques de l'étang de provenance sur la survie et la valeur adaptative des clones suite à une exposition expérimentale aux UV.

- HI Il est attendu que les clones polyploïdes occuperont, en milieu naturel, des étangs sur une plus grande plage de conditions environnementales. Leur troisième série de chromosomes leur conférerait un potentiel adaptatif supérieur aux diploïdes en favorisant la plasticité phénotypique des réponses physiologiques et métaboliques en lien avec ces conditions.

- HII Il est attendu que la quantité de mélanine produite par les clones en milieu naturel sera corrélée négativement à la valeur de DOC de leur étang respectif. Comme la concentration en DOC est directement corrélée à la quantité de matière organique dans l'eau et que celle-ci accélère l'atténuation des UV dans la colonne d'eau, la mélanisation de la carapace comme mécanisme de protection aux UV ne devrait pas être déclenchée chez les daphnies colonisant les étangs offrant une telle protection naturelle au rayonnement solaire.

- IIII A) Il est attendu qu'une exposition prolongée aux UV en laboratoire aura un impact négatif sur la croissance et le *fitness* (survie, fécondité) de tous les clones, mais moindre sur les clones polyploïdes puisque leur troisième série de chromosomes leur conférerait une plus grande plasticité dans des conditions extrêmes.

B) Il est aussi attendu qu'une exposition expérimentale prolongée aux UV aura un impact moindre sur les clones provenant d'étang à faible teneur en DOC, puisque ceux-ci seraient préadaptés à des conditions extrêmes d'irradiation en milieu naturel.

HIV A) Il est attendu que les clones polyploïdes exprimeront relativement plus les gènes liés à la détection et à la réparation des dommages à l'ADN suite à une exposition prolongée aux UV en laboratoire. Ceux-ci possédant une copie supplémentaire et potentiellement active de chacun des gènes d'intérêt sous ces conditions seront en mesure de produire en quantité plus importante les protéines qui leur sont associées.

B) Il est aussi attendu que les clones provenant d'étangs fortement exposés aux UV en milieu naturel expriment relativement moins les gènes liés à la détection et à la réparation des dommages à l'ADN suite à une exposition prolongée aux UV en laboratoire puisqu'ils seraient préadaptés à des conditions d'irradiation de même niveau.

1.2 INTRODUCTION AU PROJET DE RECHERCHE

L'interrelation entre la variation génétique, la sélection naturelle, la plasticité phénotypique et le flux génique est complexe. L'adaptation locale représente l'adéquation entre la variation génétique adaptative et les variations environnementales. Elle est modulée par l'interaction entre la sélection, le flux génique et la dérive génétique (Kawecki et Ebert, 2004). Le contexte climatique actuel dans les régions nordiques représente un défi pour les organismes qui sont et seront soumis à de nouvelles pressions de sélection. Pour s'adapter rapidement à ces changements, les organismes dépendent de leur réserve de variation génétique. Les populations sont limitées dans leur réponse à la sélection par une faible diversité génétique et leur survie repose sur l'avenue de nouvelles mutations bénéfiques, processus généralement très lent chez les animaux (Drake *et al.* 1998). La plasticité phénotypique permet aux organismes de persister à court terme dans les environnements

changeants (Peddie *et al.*, 1997 ; DeWitt *et al.*, 1998 ; Drake *et al.* 1998 ; Lynch et Walsh, 1998 ; Ahloowalia et Maluszynski, 2001 ; West-Eberhard, 2003, 2005 ; Crispo, 2007 ; Auld *et al.*, 2010 ; Richards *et al.*, 2012 ; Schlichting et Wund, 2014 ; Yampolsky *et al.*, 2014).

Une autre des caractéristiques du génotype soumises aux pressions de sélection et environnementales est le taux d'expression des gènes, de plus en plus utilisé dans les études traitant des réponses physiologiques et métaboliques face à un ou plusieurs stressseurs environnementaux (Lynch et Walsh, 1998 ; Karp, 2004 ; West-Eberhard, 2003, 2005 ; Allis *et al.*, 2007 ; Bonasio *et al.*, 2010 ; Richards *et al.*, 2012 ; Schlichting et Wund, 2014). L'expression d'un gène est directement influencée par le nombre de copies actives d'un gène dans les cellules qui lui est généralement tributaire du nombre de séries de chromosomes : le niveau de ploïdie. Dans cette optique, le rôle de la polyploïdie dans les processus adaptatifs soulève bien des questions (revu par Otto et Whitton, 2000 et par Comai, 2005). Outre quelques distinctions phénotypiques comme une taille accrue des cellules, un ralentissement du taux de croissance et un passage vers un mode de reproduction asexuée (Frankhauser, 1945 ; Cavalier-Smith, 1978 ; Stebbins, 1980), certaines observations laissent croire que réside en l'état polyploïde un potentiel adaptatif encore méconnu.

Le complexe *Daphnia pulex* est composé de clones diploïdes et triploïdes qui se retrouvent dans les régions subarctiques et arctiques (Vergilino *et al.*, 2009). Les organismes polyploïdes se retrouvent fréquemment dans les environnements à faibles températures, les hautes latitudes et les hautes altitudes (Beatty, 1957 ; Beaton et Hebert, 1988 ; Bogart et al., 1989 ; Dufresne et Hebert, 1994, 1998 ; Ramsey et Schemske, 1998), ce qui suggère un avantage chez ces clones. Jose et al. (2010) n'ont pas révélé de tolérance accrue à plusieurs facteurs environnementaux chez les clones polyploïdes. Ratté (2011) a comparé le métabolisme de clones diploïdes et triploïdes à trois températures, mais n'a pas détecté de différences entre les clones de différent niveau de ploïdie. La prépondérance de ces clones polyploïdes dans les régions arctiques demeure donc inexpiquée.

Le rayonnement UV est un stresser important en milieu naturel, particulièrement dans les environnements arctiques et subarctiques qui subissent le rayonnement solaire jusqu'à 24 heures par jour en été. Ces radiations, plus précisément les longueurs d'onde de la gamme des ultraviolets (UV) (100-400 nm) dont les UVB (280-300 nm), sont connues pour altérer directement l'intégrité du matériel génétique ainsi que pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans l'environnement et à l'intérieur des cellules (Hessen *et al.*, 1996, 2002 ; MacFayden *et al.*, 2004 ; Pfeifer *et al.*, 2005 ; Choi *et al.*, 2006 ; Ikenata et Ono, 2011 ; Sucré *et al.* 2012). Dans les écosystèmes d'eau douce, la composition chimique de la colonne d'eau a un impact direct sur l'irradiance. Le taux de pénétration des UV dans la colonne d'eau est inversement proportionnel à la quantité de matière organique dissoute (DOC) dans l'eau (Morris *et al.*, 1995 ; Bais *et al.*, 2011 ; McKenzie *et al.*, 2011 ; Zepp *et al.*, 2011).

À l'échelle moléculaire, le spectre UVB, en plus de participer à la formation d'EROs, entraîne des malformations au niveau du matériel génétique sous la forme de dimères de pyrimidines (principalement de thymines). Celles-ci obstruent les mécanismes de transcription des gènes et peuvent engendrer l'apparition de mutations délétères, voire létales (MacFayden *et al.*, 2004 ; Pfeifer *et al.*, 2005 ; Choi *et al.*, 2006 ; Ikehata et Ono, 2011). Les organismes vivants sont toutefois aptes à réparer et à protéger leur matériel génétique, via la production d'enzymes de réparation, le dépôt d'un pigment photoprotecteur ou encore l'apoptose des cellules endommagées (Darzynkiewicz *et al.*, 2011). La signalisation physiologique de la présence de dommages causés par une exposition aux UVB passe par l'action du facteur P53 (Renzing *et al.*, 1996).

Chez les daphnies en particulier, il a été démontré que la croissance et la reproduction étaient affectées négativement par les UV (Huebner *et al.*, 2013). Elles s'adaptent de plusieurs manières aux conditions d'irradiation. L'évitement comportemental et la mélanisation sont les plus documentés (Scoville et Pfrender, 2010 ; Miner *et al.*, 2011, 2013, 2016 ; Rose *et al.*, 2012). Il existe par ailleurs une corrélation entre la pigmentation de la carapace et la teneur en DOC du plan d'eau (Hebert, 1987 ; Hessen, 1996 ; Hessen *et*

al., 2002 ; Rautio et Korhola, 2002 ; Scoville et Pfrender, 2010). Une relation entre la mélanisation et l'expression relative de certains gènes, soit le gène de la *dopa-décarboxylase* et de la *phénoloxydase*, a aussi été confirmée (Scoville et Pfrender, 2010). Miner *et al.* (2016) n'ont pas détecté de relation entre la quantité de dommages subie par l'ADN et l'expression des gènes de photoréparation.

Malgré les études antérieures traitant des adaptations des daphnies aux UV, le rôle de la polypléidie et des mécanismes sous-jacents dans les processus adaptatifs à des conditions locales dites extrêmes demeurent inconnus. L'objectif de cette étude était de comparer les effets du rayonnement UV chez des clones diploïdes et polypléïdes afin de valider si ces derniers possédaient une tolérance plus élevée aux variations de ce facteur environnemental qui pourrait expliquer leur distribution géographique particulière. Du fait qu'elles possèdent un jeu de chromosomes supplémentaire, les daphnies triploïdes devraient non seulement exprimer davantage l'ensemble des gènes d'intérêt dans cette situation, mais mieux performer de façon générale sous des conditions simulées en laboratoire d'irradiation extrême, dans les limites de celles retrouvées en milieu naturel.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 ÉCHANTILLONNAGE ET CONSERVATION DES ANIMAUX

L'échantillonnage des daphnies a été réalisé du 1^{er} au 21 juillet 2014, à Churchill au Manitoba (Canada) en collaboration avec le *Churchill Northern Studies Centre* (CNSC) Trente et un (31) étangs peu profonds sélectionnés aléatoirement parmi ceux identifiés par Weider *et al.* (1987 ; 2010) ont été échantillonnés dans la région. Les étangs se distinguaient en deux catégories : rocheux ou toundriques. Les animaux ont été recueillis à l'aide d'un filet à zooplancton de type Student dont l'ouverture des mailles était de 150 µm. Le pH et la conductivité de chacun des plans d'eau ont été mesurés avec une sonde HANNA HI9812-5. Un échantillon de 15 mL d'eau a aussi été prélevé à 10 cm de profondeur pour réaliser les analyses de DOC/TDN et des mesures d'absorbance lumineuse. Pour les mesures de DOC/TDN, 8 mL de l'échantillon ont été filtrés à travers un filtre Whatman GF/F préalablement brûlé (450 °C pendant 5 heures) dans un tube de verre de 9 mL au bouchon doublé de téflon nettoyé selon le protocole de Burdige et Homstead (1994). Le pH a été ajusté à 2 avec du HCl 2N. Pour chaque étang, entre cinq et 25 daphnies ont été conservées dans de l'éthanol 70 %, du *RNAlater*TM (QUIAGEN) et du formaldéhyde 4 %. Enfin, des individus de chaque plan d'eau ont été ramenés vivants au laboratoire, où les clones ont été isolés dans le but d'en faire l'élevage.

Des daphnies de trois étangs de la région de Kuujjuaraapik au Nunavik (Canada) ont été ajoutées à celles de Churchill afin d'assurer une représentativité suffisante de chaque niveau de ploïdie dans l'étude.

2.2 ÉLEVAGE

Les daphnies ont été élevées à l'intérieur d'une chambre environnementale Sanyo MLR-351H. à une température de 16 °C, un cycle jour/nuit de 16/8 heures et une intensité lumineuse en période diurne fixée à 2500 lux. Les individus ont été placés dans des pots Masson de 1 L contenant du médium COMBO (Kilham *et al.*, 1998). Un tiers à la moitié du volume de milieu de culture était renouvelé chaque semaine et les daphnies ont été nourries toutes les 48 heures à partir d'un mélange 1 :1 :1 de trois solutions algales contenant respectivement les genres *Selenastrum*, *Scenedesmus* et *Actinastrum*. Les cellules algales étaient comptées régulièrement en microscopie optique afin de déterminer la quantité de mélange à ajouter au COMBO. La concentration finale de cellules algales dans le médium de culture était de 5×10^5 cellules/mL (Ribeiro *et al.*, 2011 ; Yampolsky *et al.*, 2014). Les algues étaient conservées dans le noir à 4 °C. Afin d'éliminer l'effet maternel, toutes les manipulations ont été réalisées sur des daphnies issues d'au moins la troisième génération à naître dans les conditions d'élevage (Lynch et Ennis, 1983).

2.3 IDENTIFICATION

L'espèce, le clone et le niveau de ploïdie ont été déterminés sur les daphnies en élevage. L'espèce à laquelle chaque clone appartenait fut déterminée par le séquençage du gène mitochondrial de la *NADH déshydrogénase 5 (Mt-ND5)*. Trois extractions d'ADN ont été réalisées par plan d'eau en plaçant chaque individu dans un volume de 50 µl de *Quick Extract*TM (Epicentre) et en suivant le protocole proposé par Dionne *et al.* (2011). L'intégrité et la quantité d'ADN extrait ont été vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop8000 UV-Vis (Thermo Scientific). L'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée dans un volume réactionnel final de 25 µL composé de 2.5 µL de tampon 10X avec MgCl₂ (Invitrogen), 0.5 µL de désoxynucléotides (dNTP) 10 mM (Invitrogen), 1 µL de chaque amorce 10 µM (Tab. 1), 1.5 unités de *Taq* Polymérase (Invitrogen) et 50 ng d'ADN. Le volume résiduel fut comblé avec de l'eau pure de qualité PCR sans DNASE/RNASE (Life technologies). L'amplification a été réalisée

dans les conditions suivantes : 94 °C – 3 min, (94 °C – 1 min ; 55 °C – 1 min ; 72 °C – 1 min) X 35, 72 °C – 10 min. Les produits PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1.5 % puis ont été envoyés pour séquençage au Centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill à Montréal (Canada).

L'identification des clones a été déterminée par le génotypage de quatre marqueurs microsatellites. Les locus utilisés étaient le DPU6, le DPU30, le DPU45 et le DPU502 tels que décrits par Colbourne *et al.* (2004). L'ADN utilisé était le même que pour l'amplification du *ND5*. Le volume réactionnel final de 15 µL était composé de 1.5 µL de tampon 10X avec MgCl₂, de 0.5 µL de dNTP 10 mM, de 0.2 µL de chaque amorce diluée à 10 µM et dont l'amorce « forward » était complexée à une queue M13 fluorescente (Tab. 1), de 1 unité de *Taq* et de 50 ng d'ADN. Le volume résiduel fut comblé avec de l'eau de qualité PCR. L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : 94 °C – 3 min, (94 °C – 45 sec ; 55 °C – 45 sec ; 72 °C – 1 min) X 35, 72 °C – 10 min. Les produits PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 3 % puis ont été envoyés pour génotypage au Centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill à Montréal.

Le niveau de ploïdie des organismes a été déterminé par cytométrie en flux selon le protocole de Vergilino *et al.* (2009) et de Rees *et al.* (2007), en utilisant *Artemia salina* comme standard. Pour un volume de standard, une artémie mature, mais exempte de gamètes, était homogénéisée dans le tampon Galbraith (Galbraith, 1983). Pour chaque pot en culture, cinq daphnies matures ont été homogénéisées dans le tampon, en duplicata. Le filtrat a été transféré dans un tube de 1.5 mL noir suite à quoi 2 µL de standard et 10 µL d'iodure de propidium (IP) (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés au tube. Le tube a été laissé sur glace pendant 30 min avant la mesure de la taille du génome à l'aide d'un cytomètre en flux Epics Altra (Beckman-Coulter). La source lumineuse du cytomètre était un laser d'argon émettant 14 mW de lumière à 488 nm. Considérant le spectre d'émission du complexe ADN-IP, les mesures de fluorescence ont été réalisées de 600 à 640 nm. Pour chaque millilitre d'homogénat, 0.2 µL de billes de verres à la fluorescence rouge (Linear Flow Carmine ; Molecular Probes) ont été ajoutés à la préparation comme standard interne afin

de s'assurer de la stabilité et de l'alignement de l'équipement. Le niveau de ploïdie, exprimé selon la taille du génome (TG), a été déterminé avec le calcul suivant selon l'intensité de la fluorescence (IF) de l'échantillon et du standard :

$$TG = (IF_{\text{Échantillon}}/IF_{\text{Standard}}) \times 2.91 \text{ (i)}$$

où 2.91 pg correspond à la taille du génome d'une artémie diploïde (Rheinsmith *et al.*, 1974).

2.4 DISTRIBUTION ET MELANISATION SUR LE TERRAIN

Les daphnies conservées dans le formaldéhyde 4 % et les échantillons d'eau recueillis sur le site d'étude ont été utilisés afin de mettre en relation la mélanisation de la carapace des daphnies, les paramètres physicochimiques et la teneur en DOC de leur étang respectif. Les daphnies ont été séchées à l'étuve à 60 °C pendant 24 heures, puis pesées à l'aide d'une microbalance Mettler Toledo XP6. La mélanine a été extraite de la carapace en immergeant les organismes individuellement dans 100 µL de NaOH 5 M pendant 96 heures (Scoville et Pfrender, 2010). L'absorbance de la solution contenant la mélanine extraite a été ensuite mesurée par spectrophotométrie à 350 nm avec un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek,). Afin d'obtenir une mesure en $\mu\text{g}_{\text{Mélanine}}/\text{mg}_{\text{Tissus}}$, une courbe standard a été élaborée en diluant de manière successive de la mélanine synthétique (Sigma-Aldrich) dans 100 uL de NaOH 5 M.

La teneur en DOC et en azote dissout (TDN) des étangs a été déterminée en utilisant un analyseur à combustion à haute température Shimadzu TOC-Vcpn équipé d'une unité TNM-1. Chaque échantillon y a été injecté cinq fois et la plus petite et la plus haute valeur ont été rejetées. La valeur de DOC moyenne des plans d'eau a été calculée grâce aux trois valeurs restantes et le coefficient de variation était < 1 %. De l'hydrogénophthalate de potassium et du nitrate de potassium ont été utilisés comme standard au cours des analyses

Tableau 1. Paires d'amorces utilisées dans l'identification des daphnies échantillonnées à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 à l'espèce et au clone par amplification en PCR du gène mitochondrial *ND5* et de quatre marqueurs microsatellites

Nom	Locus	Séquence amorce	Fluorescence	# Accession	Référence
ND5	<i>ND5</i>	F 5'-GGGGTGTATCTATTAATTCG-3' R 5'-ATAAACTCCAATCAACCTTG-3'			Crease <i>et al.</i> , 2012
Dp512	<i>DPU6</i>	F 5'- <u>CACGACGTTGTAAAACGACTTTCGTTCTACCCAGGGAAG</u> -3' [†] R 5'-TTTGCTCGTCTGTGATACGC-3'	FAM	AY619536	Colbourne <i>et al.</i> , 2004
Dp519	<i>DPU30</i>	F 5'- <u>CACGACGTTGTAAAACGACAGTCGCGACGACATAAAGC</u> -3' [†] R 5'-GTGGTAGTTGTGGAATCCG-3'	HEX	AY619544	Colbourne <i>et al.</i> , 2004
Dp523	<i>DPU45</i>	F 5'- <u>CACGACGTTGTAAAACGACGATGATTACTGTATTTTACG</u> -3' [†] R 5'-GAGTTTTATTGCTTTCATAC-3'	FAM	AY619548	Colbourne <i>et al.</i> , 2004
Dp502	<i>DPU502</i>	F 5'- <u>CACGACGTTGTAAAACGACGTCAGCCGACGTTATCAT</u> -3' [†] R 5'-GGATGATGGTGAGGATGGA-3'	HEX	AY619527	Colbourne <i>et al.</i> , 2004

[†]La séquence de nucléotides soulignée correspond à la queue M13 fluorescente complexée à l'amorce « forward » de chaque marqueur microsatellite

de DOC et de TDN respectivement. Après une série de sept analyses, les échantillons étaient systématiquement comparés à de l'eau à faible teneur en carbone (1 pmol/L) et à de l'eau de mer profonde des Sargasses (41-44 pmol/L). Ces standards de DOC ont été produits par le *Hansell's consensus reference materials (CRM) program*.

2.5 EXPOSITION EXPERIMENTALE AUX RAYONS ULTRAVIOLETS.

Les expositions expérimentales aux rayons ultraviolets ont été réalisées avec un système d'irradiation SUNTEST XLS+ Solar Simulator (Atlas) équipé d'une lampe au xénon de 1500 W imitant le spectre solaire naturel entre 250 et 800 nm. Dans le but d'assurer une homogénéité des traitements, l'intensité lumineuse émise par la lampe pour chaque longueur d'onde comprise dans cet intervalle a été mesurée et analysée en triplicata sur 37 positions sous le système à l'aide d'un spectroradiomètre OL-754 équipé d'une sphère optique IS-270 de 5 cm de diamètre (Optikon). À son intensité maximale, la lampe émettait une irradiance équivalente à 91 % de celle du soleil à son zénith en l'absence totale de nuages dans les milieux arctiques et subarctiques, soit 1640 $\mu\text{molphotons}/\text{m}^2*\text{s}$ (Mostajir *et al.*, 1999). Préalablement aux expériences, le spectre d'absorbance complet du COMBO a été mesuré en spectrophotométrie (PowerWave XS2) afin d'en calculer le coefficient d'atténuation (k_λ), puis la profondeur (z) maximale de médium acceptable au cours des expositions pour que l'intensité (I) en UV_{Total} au fond du récipient soit ≥ 95 % de celle en surface. Le calcul utilisé, qui a permis de déterminer une profondeur optimale de 5 cm, était le suivant :

$$I_{\lambda,z} = I_{0,\lambda} \exp(-k_\lambda \times z) \quad (\text{ii})$$

Les récipients utilisés pour les expositions expérimentales étaient des tubes Pyrex® de borosilicate de 20 mm de diamètre et de 150 mm de hauteur (VWR) recouvert de ruban adhésif noir pour empêcher la dispersion de la lumière d'un tube à l'autre au cours du traitement. Ceux-ci étaient plongés dans un bassin d'eau thermorégulé alimenté par une pompe RTE10 (Thermo NESLAB) dont la température était fixée à 16 °C. Les tubes

contrôles étaient recouverts d'un filtre UV bloquant toutes les longueurs d'onde ≤ 380 nm (Edmund Optics). Tous les tubes étaient disposés sous une plaque de quartz bloquant toutes les longueurs d'onde ≤ 280 nm. Afin d'en éliminer la variabilité, l'effet sur la survie des organismes de l'angle et de l'éloignement des tubes par rapport à la source lumineuse a aussi été mesuré dans le but d'établir une liste de position équivalente en termes d'irradiation (Annexe I).

2.5.1 MESURE DE L'EXPRESSION GENIQUE

De l'élevage, cinq daphnies matures provenant d'un même étang, appartenant au même clone et portant des œufs ont été placées dans 20 mL de COMBO au sein d'un tube de verre, sans ajout de nourriture. Les deux traitements (exposé et contrôle) ont été réalisés en triplicata. Les tubes ont été placés sous le système d'irradiation conformément à la description ci-dessus. Les animaux ont été exposés à la lumière pendant 24 heures consécutives (≈ 2 kJ/m² UVB) afin d'imiter fidèlement un jour polaire. Suivant les 24 heures d'exposition, les organismes ont été transférés dans des tubes clairs, nourris à satiété puis replacés dans les conditions d'élevage pour une seconde période de 24 heures. Le nombre d'individus vivants dans chaque tube a été compté après l'exposition et après la période de repos. À la fin de cette période, les animaux survivants ont été transférés dans 1 mL de *RNAlater*TM, placés à 4 °C durant une nuit puis congelés à -80 °C jusqu'à analyse.

L'ARN_{Total} des organismes a été extrait en suivant le protocole d'extraction au réactif TRIZOL de l'Université de l'Indiana (2007), en effectuant toutes les manipulations sur glace, les centrifugations à 4 °C et en remplaçant le TRIZOL par du *RNAZOL® RT* (Molecular Research Center Inc.). Les daphnies conservées dans le *RNAlater*TM ont été éponnées sur du papier buvard avant d'être transférées dans le réactif de lyse. La purification de l'ARN a été réalisée sur colonne à l'aide du kit *AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep* selon les instructions du fabricant (Axygen), toujours sur glace et en centrifugeant à 4 °C. La quantité et l'intégrité de l'ARN extrait ont été vérifiées avec un spectrophotomètre NanoDrop8000. L'ARN a été transformé en ADN complémentaire

(ADN_c) par transcription inverse avec un *Hight Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) en suivant les instructions du fabricant.

L'expression relative de six gènes d'intérêt dans la réponse des daphnies aux UV et de deux gènes de référence (Annexe II) a été mesurée en PCR quantitative à partir de l'ADN_c produit (Tab. 2). Les réactions d'amplification quantitative (qPCR) ainsi que les analyses d'expression ont été réalisées avec un Light Cycler® 480 II (Roche). Une courbe standard de l'expression en fonction de la concentration en ADN_c de départ a été étalonnée pour chacun des gènes et pour chacun des niveaux de ploïdie étudiés afin de mesurer l'efficacité de chaque réaction. Un volume réactionnel final de 15 µL était composé de 7.5 µL de « master mix » SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline), de 0.6 µL de chaque amorce diluée à 10 µM (Tab. 2) et de 1 µg d'ADN_c. Le volume résiduel était complété avec de l'eau de qualité PCR. La réaction d'amplification comprenait 1 cycle à 95 °C – 5 min et 45 cycles à 95 °C – 10 sec ; 60 °C – 10 sec ; 72 °C – 10 sec. Chaque mesure a été effectuée en duplicata (en triplicata lors de l'étalonnage des courbes standard). Un mélange de 24 daphnies provenant de tous les étangs a été utilisé comme calibrateur interne entre chaque réaction. L'expression relative des gènes d'intérêt a été calculée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak et Schmittgen, 2001). Le taux d'expression d'un gène est donc égal à l'efficacité de l'amplification (en théorie égale à 2 mais qui doit être celle de la courbe standard) à la puissance négative de la différence entre le nombre de cycles nécessaires à la détection de la fluorescence par l'équipement du gène d'intérêt et du/des gènes références (le premier ΔC_T) multiplié par cette même différence pour le calibrateur (le second ΔC_T).

2.5.2 TRAITS D'HISTOIRE DE VIE

Trois daphnies âgées de moins de 24 heures et provenant d'un même étang ont été placées dans 20 mL de COMBO au sein d'un tube de verre, sans ajout de nourriture. Les deux traitements ont été réalisés en triplicata. Les tubes ont été placés sous le système d'irradiation conformément à la description ci-haut et les animaux ont été exposés à la lumière pendant 12 heures consécutives ($\approx 1 \text{ kJ/m}^2 \text{ UVB}$). Les organismes ont ensuite été

transférés dans des tubes clairs, le volume de COMBO a été complété à 50 mL, les animaux ont été nourris à satiété puis replacés dans les conditions d'élevage jusqu'à l'atteinte de la maturité. Une fois la maturité atteinte (i.e. lors de l'apparition d'œufs sous la carapace), les daphnies ont été mesurées en microscopie optique grâce au logiciel d'analyse d'image ToupView (OMAX, v.3.7.4798) accompagnant une caméra A35100U (OMAX). Le nombre et le type d'œufs produits ont aussi été notés au cours de cette mesure. Les animaux ont été ensuite séchés à l'étuve à 60 °C pendant 24 heures, puis pesés avec une microbalance Mettler Toledo XP6. Le nombre de daphnies n'ayant pas atteint la maturité a aussi été noté.

Préalablement, entre 10 et 20 individus âgés de moins de 24 heures provenant de chaque étang ont été mesurés en utilisant le même système de capture et d'analyse d'images. Ils ont aussi été séchés et pesés de la même manière afin d'obtenir un point de comparaison standard de la longueur et de la masse pour tous les clones à l'étude.

Deux mesures de valeur adaptative ont été calculées. Une première exprime le taux de croissance somatique (TCS) des organismes à partir de la taille (ou du poids) à maturité (l_f) et à la naissance (l_i) ainsi que du nombre de jours nécessaires à l'atteinte de la maturité (Δ_t) (Pereira et Gonçalves, 2008) :

$$TCS = [\ln(l_f) - \ln(l_i)]/\Delta_t \text{ (iii)}$$

La seconde, l'équation d'Euler-Lotka, intègre les informations obtenues sur la survie et la reproduction (reprise par Pereira et Gonçalves, 2008). Cette équation exprime le taux de croissance d'une population pour un pas de temps donné ($r\Delta_t$) en fonction de la probabilité de survie d'un clone jusqu'à l'âge x (l_x) (ici x est le nombre de jours nécessaires pour atteindre la maturité) et de sa fécondité à ce même moment (m_x) (ici le nombre d'œufs produits corrigé selon le type) :

$$1 = \sum_{x=1}^n e^{r\Delta_t x} l_x m_x \text{ (iv)}$$

2.6 ANALYSES ET ANALYSES STATISTIQUES

2.6.1 IDENTIFICATION

Les séquences de Mt-*ND5* ont été nettoyées à l'aide du logiciel MEGA6 v.6.06 (Tamura *et al.*, 2013) puis comparées aux séquences du système de recherche BLAST. Les chromatogrammes reçus du service de génotypage ont été analysés avec le logiciel Peak Scanner v.1.0 (Applied Biosystems, 2006).

2.6.2 ANALYSES STATISTIQUES

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R v.3.2.4 (R Core Team, 2016). Une analyse canonique de redondance (RDA) a été réalisée sur les données de mélanine et de ploïdie recueillies directement sur le terrain afin de mettre ces paramètres biologiques en relation avec les paramètres environnementaux (bibliothèque *vegan* v.2.4-0 de Oksanen *et al.*, 2016). La distribution des étangs échantillonnés selon leurs conditions respectives a aussi été déterminée à l'aide de la RDA. La significativité des axes et des termes retenus pour la RDA a été testée à l'aide d'une ANOVA. Un cadrage multidimensionnel (MDS) sur les distances de Bray-Curtis des paramètres physicochimiques et une analyse de groupement ont été effectués en complément à la RDA afin d'illustrer les groupes potentiels d'étangs selon ces mêmes conditions (bibliothèque *MASS* v.7.3-45 de Ripley *et al.*, 2015). Une ANOSIM a été réalisée sur ces groupes pour tester leur significativité.

Les ratios normalisés d'expression des six gènes d'intérêt ont été comparés en fonction du clone, du niveau de ploïdie et du traitement par des ANOVA de type III à multiples facteurs (bibliothèque *car* v.2.1-2 de Fox *et al.*, 2016). Le facteur clone a été emboîté dans le facteur ploïdie pour ces analyses. La normalité des résidus et l'homogénéité de la variance ont respectivement été vérifiées avec un test de Shapiro-Wilk et un test de Levene. Les données ont été transformées en conséquence. La présence d'interaction entre les

Tableau 2. Paires d'amorces utilisées dans la quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt de la réponse à une exposition aux ultraviolets des daphnies échantillonnées à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 en qPCR, plus deux gènes de référence

Gène	Séquence amorce	Description	Référence
<i>PHR-Y05</i>	F 5'-AAGAAGTTGGAGCGAGAACC-3' R 5'-CCGGCGTAATCCAATCTACT-3'	Code pour la <i>photolyase</i> – Détecte et excise les dimères de thymine engendrés par les UV	Miner <i>et al.</i> , 2015
<i>PLA-1</i>	F 5'-TGTTTTGAAATCGGTGGTGA-3' R 5'-GGCCTTTACGAAACCAATGA-3'	Homologue au gène <i>photorepair</i> (Miner <i>et al.</i> , 2015); Code pour la <i>photolyase</i>	Cette étude
<i>XPA</i>	F 5'-CCCTGCAAGGATGCAAATGATG-3' R 5'-TCTCCCACAACCTCCAGTGCTCT-3'	Code pour un doigt de zinc du complexe NER – Reconnaît et excise les nucléotides endommagés par les UV et certains chimiques	Tang, 2013
<i>Ddc</i>	F 5'-CATCTGCGAAGAGTATCGTCA-3' R 5'-CCACATGGCAGAACAGTCAA-3'	Code pour la <i>dopa-décarboxylase</i> – Bloque la formation de la mélanine	Scoville et Pfrender, 2010
<i>PO245</i>	F 5'-CCATTCAGTCCTAAACCGGA-3' R 5'-ACCGTCGGAGCATTCTTAAA-3'	Code pour la <i>phénoloxydase</i> – Participe à la synthèse de la mélanine	Schumpert <i>et al.</i> , 2015
<i>P53</i>	F 5'-CGTCAGAGAGAGAGTGTGTTGTG-3' R 5'-AGAACTGAGAGATTTCCAACGTG-3'	Code pour le <i>suppresseur de tumeur P53</i> – Reconnaît les cellules endommagées ou cancéreuses et active l'apoptose	Cette étude

Gène	Séquence amorce	Description	Référence
<i>STX</i>	F 5'-CACATTGGTCGTCCTTAGTCTTG-3' R 5'-TGCTATACGTTACGCTTGTCCCTTAC-3'	Code pour la <i>syntaxine 16</i> – Participe à l'exocytose des cellules (utilisé comme référence)	Spanier <i>et al.</i> , 2010
<i>XBP</i>	F 5'-CCGATATTCGAGACTGCAATG-3' R 5'-AAAGATGGGTGAGCCAGAAATAC-3'	Code pour la <i>X-Box binding protein 1</i> – Facteur de transcription (utilisé comme référence)	Spanier <i>et al.</i> , 2010

variables explicatives a aussi été vérifiée. Les contrastes entre les différentes moyennes ont été déterminés avec un test LSD (bibliothèque agricolae v.1.2-3 de Mendiburu, 2015). Les données de mortalité et de valeur adaptative ont été comparées à l'aide d'analyses similaires. Dans le cas de la mortalité, un facteur temps a été ajouté à l'ANOVA afin de comparer entre eux les taux de mortalité directement après l'exposition et après les 24 heures de repos.

Les normes de réaction de tous ces caractères ont aussi été comparées statistiquement entre les clones (ANOVA de type III) et entre les niveaux de ploïdie (test t de Student). Ces normes de réaction ont été calculées de la façon suivante :

$$Pente = (Valeur_{Contrôle} - Valeur_{Traitement}) / Valeur_{Traitement} (v)$$

Les conditions d'utilisation et la présence d'interactions ont été vérifiées telles que pour les tests réalisés sur les ratios d'expression. Une figure de type *heatmap* incluant une analyse de groupement a finalement été élaborée à partir des données d'expression afin de déterminer de potentielles stratégies d'expression différentielles des gènes à l'étude entre les clones (bibliothèques gplots v.3.0.1 de Warnes *et al.*, 2016).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 RÉSULTATS

3.1.1 ANALYSE DU SITE D'ETUDE

L'analyse de redondance montre que les paramètres physicochimiques des étangs ne sont pas associés à la distribution des individus mélanisés et polyploïdes ($p > 0.05$) (Fig. 3). Les organismes mélanisés semblent toutefois être concentrés dans les étangs à faible teneur en DOC alors que les polyploïdes tendent à se retrouver dans les étangs riches en azote (Fig. 3). Les étangs forment trois groupes statistiquement distincts, principalement selon un gradient DOC/TDN ($R = 0.92$; $p < 0.001$) (Fig. 4). Un premier groupe, comprenant les étangs A11, A21a, A30, A35 et T56, présentait un ratio DOC /TDN très élevé. Un second groupe, composé des étangs B201, B209, C35, C44 et C102 présentait le ratio le plus faible. Enfin, un troisième groupe formé des étangs restants présentait un ratio intermédiaire.

3.1.2 ANALYSES EXPERIMENTALES

3.1.2.1 IDENTIFICATION

Six clones et trois espèces ont été identifiés parmi les daphnies isolées à Churchill, Manitoba (Tab. 3). Deux de ces clones sont diploïdes ($2n$) et appartiennent à l'espèce *D. pulex* (Tab. 3). Les quatre autres clones sont triploïdes ($3n$) et appartiennent aux espèces *D. pulex* (un clone), *D. pulicaria* (deux clones dont un mélanisé) et *D. tenebrosa* (un clone) (Tab. 3). Le clone *D. tenebrosa* s'est avéré être un hybride des deux lignées les plus

divergentes du complexe, soit *D. tenebrosa* (ADNmt) et *D. pulex* (ADN nucléaire). Deux clones (un 2n et un 3n) *D. pulex* provenant de Kuujjuarapik, Québec, déjà en culture au laboratoire ont été ajoutés à l'étude (Tab. 3).

3.1.2.2 TRAIT D'HISTOIRE DE VIE

Le taux de mortalité était significativement plus élevé chez les daphnies ayant été exposées aux UV (50 %) que chez les individus contrôles (15 %) (Fig. 5). L'essentiel de la mortalité est survenu durant les 24 heures suivant l'exposition, passant d'environ 10 % à la fin de l'exposition à 40 % à la fin de la période de repos (Fig. 5A/5C, 5B/5D). Les clones A38, B272 et R202 affichaient le plus haut taux de mortalité tandis qu'il était relativement faible chez les clones A07, C102 et R206. Chez ces derniers, la mortalité n'était pas différente entre le traitement et le groupe contrôle (Fig. 5A, 5C). La ploïdie n'a eu aucun effet sur la mortalité moyenne des clones suivant une exposition aux UV (Fig. 5A, 5D).

Le nombre d'œufs produits à la première portée ne différait pas entre les daphnies exposées et non exposées aux UV (Fig 6). Les clones A07, A11, C01 et R206 avaient en moyenne de 4 à 5 œufs suite à l'exposition aux UV tandis que les clones B272, C102 et R202 ne portaient que 2 ou 3 œufs. Le niveau de ploïdie n'a pas eu d'effets sur la taille de la première portée (Fig. 9C).

Le taux de croissance juvénile (g) était significativement plus faible chez les clones exposés aux UV que chez les clones contrôles. Seuls les clones C01 et B272 avaient un taux de croissance significativement plus faible suite à une exposition aux UV (Fig. 7). Une tendance similaire est observée chez les autres clones mais celle-ci n'est pas significative (Fig. 7). Les clones C102 et R202 avaient des taux de croissance plus faibles que les autres clones en présence et en absence d'UV (Fig. 7). Le taux de croissance des triploïdes était significativement plus faible suite à l'irradiation aux UV (Fig. 9A). Tel qu'attendu, les clones triploïdes contrôles avaient des tailles à la naissance et à la maturité 1.2 fois plus élevées que les clones diploïdes contrôles ($F_{(1,143)} = 12.88$; $p < 0.001$).

L'exposition aux UV a entraîné une diminution du taux de croissance intrinsèque de la population (r) pour l'ensemble des clones (Fig. 8) mais la diminution était significative seulement chez les clones triploïdes (Fig. 9B). Les clones A11 et C01 affichaient des baisses de croissance significatives de l'ordre de 40 % (Fig. 8). Les clones B272 et C102 affichaient des taux de croissance populationnels très faibles sans et sous UV ($r \approx 0.06$) (Fig. 8). Les individus appartenant au clone A38, ayant subi une mortalité élevée, n'étaient pas suffisamment nombreux pour les mesures de r .

3.1.2.3 EXPRESSION GENIQUE

L'exposition aux UV n'a eu aucun effet sur l'expression relative des gènes d'intérêt dans la réponse aux UV (Fig. 10 à 16). Par contre, la ploïdie et le clone ont eu un effet significatif sur le taux d'expression de ces gènes (Fig. 10 à 16). Il y a toutefois une grande variation d'expression entre les clones d'un même niveau de ploïdie (Fig. 10 à 15). L'expression relative des gènes de références ne différait pas entre les clones.

En moyenne, les triploïdes exprimaient significativement plus la *photolyase* que les diploïdes (Fig. 16A). Les clones A07 et C01 exprimaient le plus *PHR-Y05* alors que les clones A11 et R202 l'exprimaient près de dix fois moins (Fig. 10). Le patron d'expression de *PLA-1* différait de celui de son homologue *PHR-Y05*. Comme pour *PHR-Y05*, les daphnies triploïdes produisaient statistiquement plus de *photolyase-1* que les daphnies diploïdes (Fig. 16B), mais ce sont les clones A07, A11 et C01 qui présentaient les plus fortes expressions de *photolyase-1*, suivi des clones A38, B272 et R206 (Fig. 11).

L'expression relative moyenne de *XPA* était statistiquement supérieure chez les clones triploïdes que chez les clones diploïdes (Fig. 16C). Il était aussi plus exprimé par le clone A07, suivi des clones C01 et R206 qui l'exprimaient de façon équivalente (Fig. 12). L'exposition aux UV a engendré une diminution d'environ 50 % du taux d'expression de *XPA* chez le clone A11, diminution que le test de contraste caractérise de significative *a contrario* de l'analyse de variance (Fig. 12)

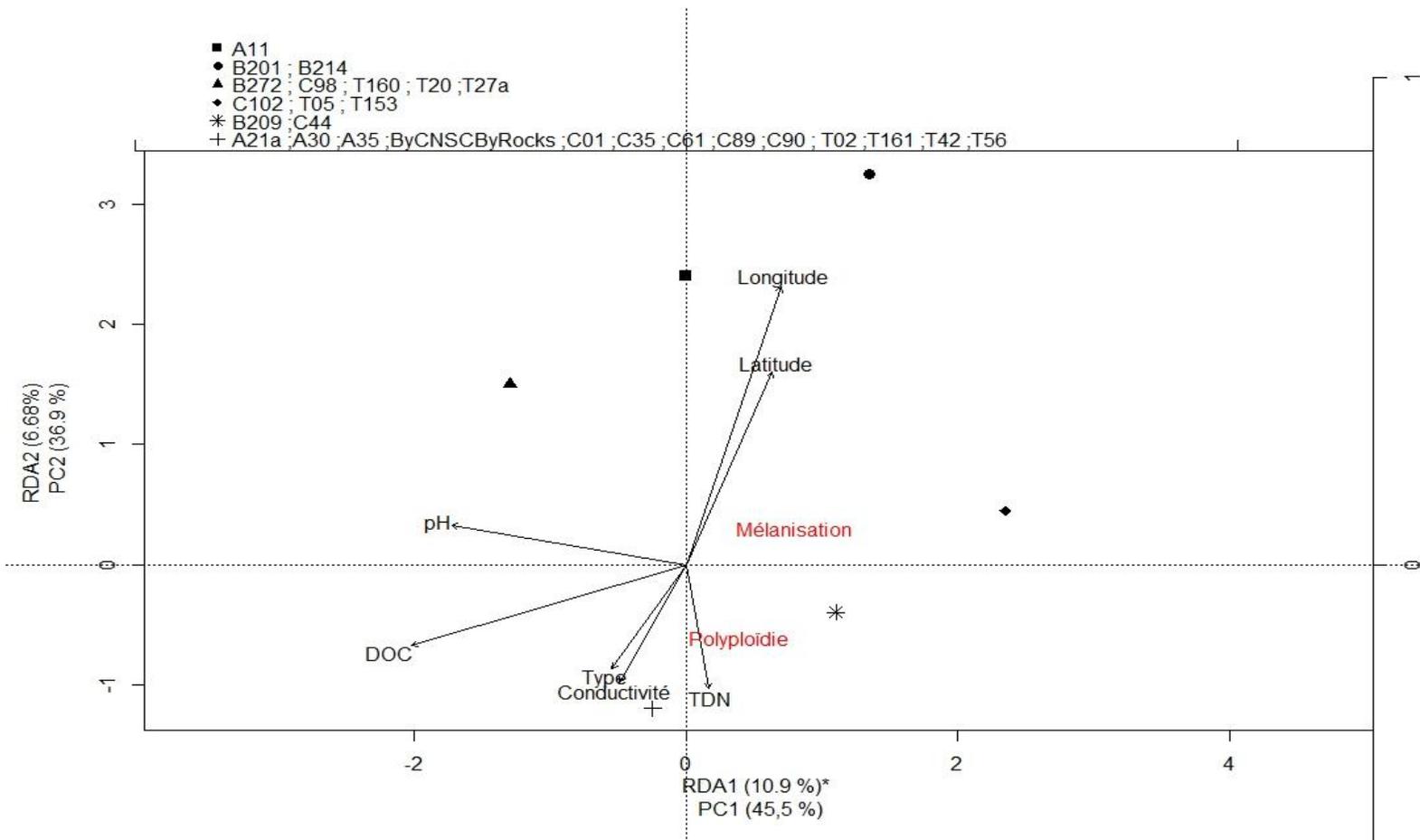


Figure 3. Analyse canonique de redondance (RDA) sur la fréquence de daphnies mélanisées et polyploïdes (rouge) dans les différents étangs (points noirs) échantillonnés à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 en fonction des paramètres environnementaux (flèches noires)

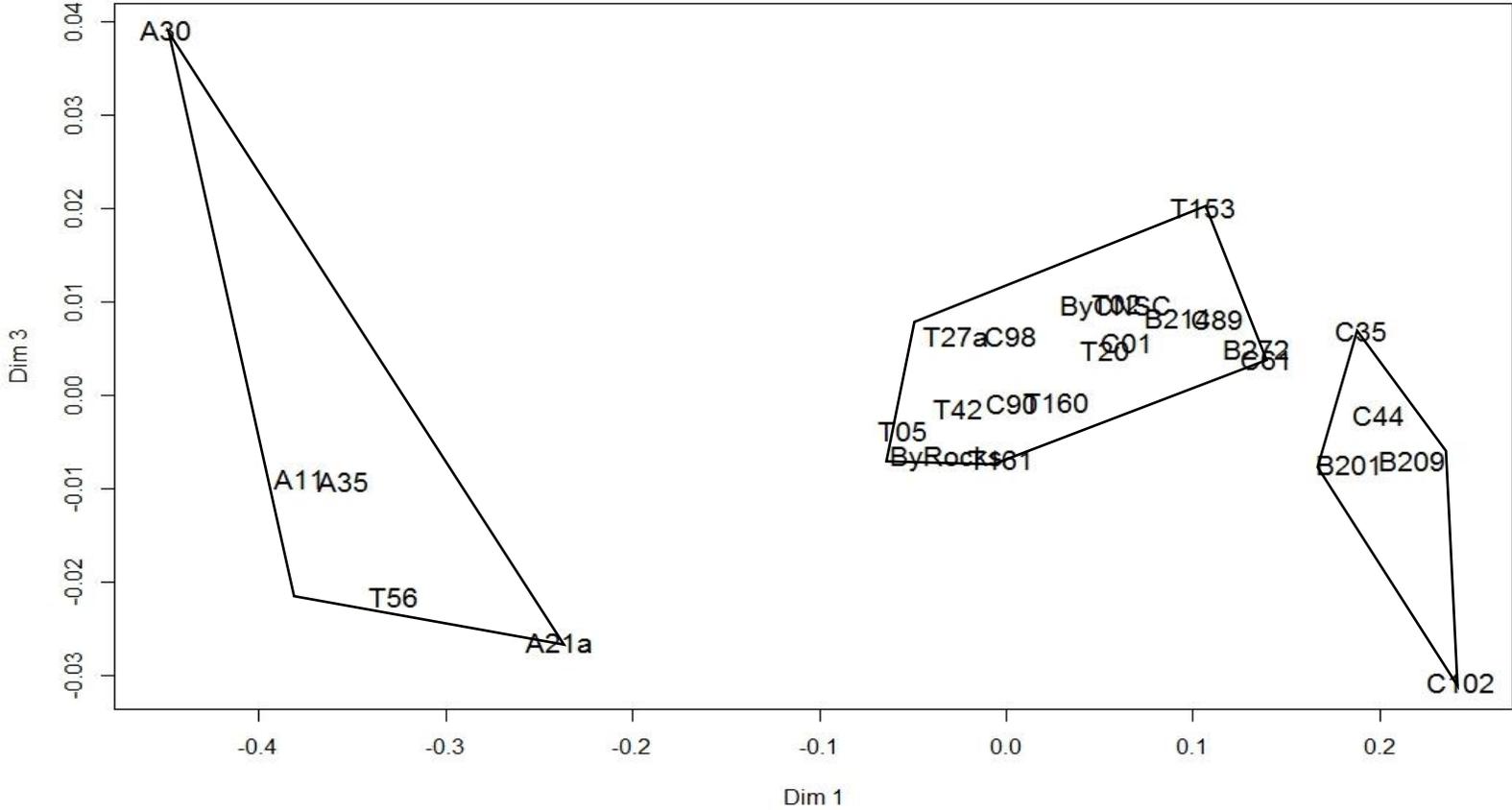


Figure 4. Cadrage multidimensionnel (MDS) à trois dimensions (stress = 0.04) des distances de Bray-Curtis des paramètres physicochimiques des étangs et des étangs échantillonnés à Churchill (Manitoba) en juillet 2014. Les groupements issus de l'analyse de groupement à 80 % de similarité sont illustrés sur la MDS

Tableau 3. Identification des clones en élevage parmi les daphnies échantillonnées à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 (plus deux clones provenant de Kuujjuaraapik) sur trois niveaux : l'espèce, quatre marqueurs microsatellites et le niveau de ploïdie

Clone	Lieu	Espèce	Marqueur microsatellite				Ploïdie
			DPU6	DPU30	DPU45	DPU502	
A07 [†]	Churchill	<i>D. pulicaria</i>	258/276/278	160/164	153	N/A	Triploïde
A11	Churchill	<i>D. pulex</i>	251/261	160/164	153	N/A	Diploïde
C01	Churchill	<i>D. pulicaria</i>	251/253/270	164/166	151/153	124/126/130	Triploïde
A38	Churchill	<i>D. pulex</i>	259/260	164/166/174	153	124/130	Triploïde
B272	Churchill	<i>D. pulex</i>	251/267	164/166	151/153	124/130	Diploïde
C102	Churchill	<i>D. tenebrosa</i>	256/274/276	165/168/170	153/155	N/A	Triploïde
R202	Kuujjuaraapik	<i>D. pulex</i>	255/263/265	166/170	149/151/153	N/A	Triploïde
R206	Kuujjuaraapik	<i>D. pulex</i>	251/261	166/170	153/155	124/130	Diploïde

[†]Clone à la carapace mélanisée

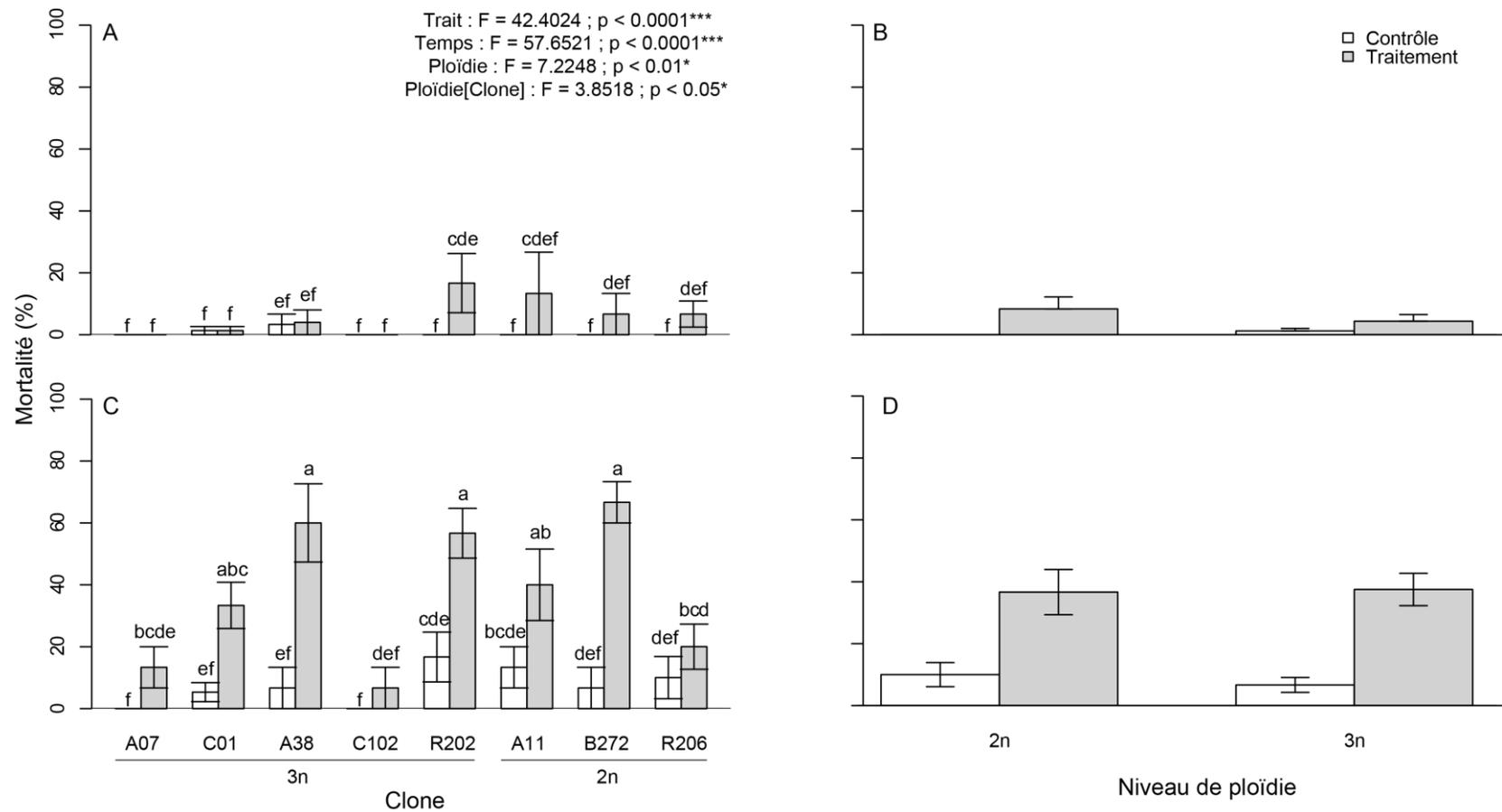


Figure 5. Taux de mortalité en fonction du clone (a et c), de la ploïdie (b et d), du traitement d'exposition expérimental aux UV et du temps suivant l'expérimentation (a et b : post-exposition ; c et d : post-repos(total)). Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique

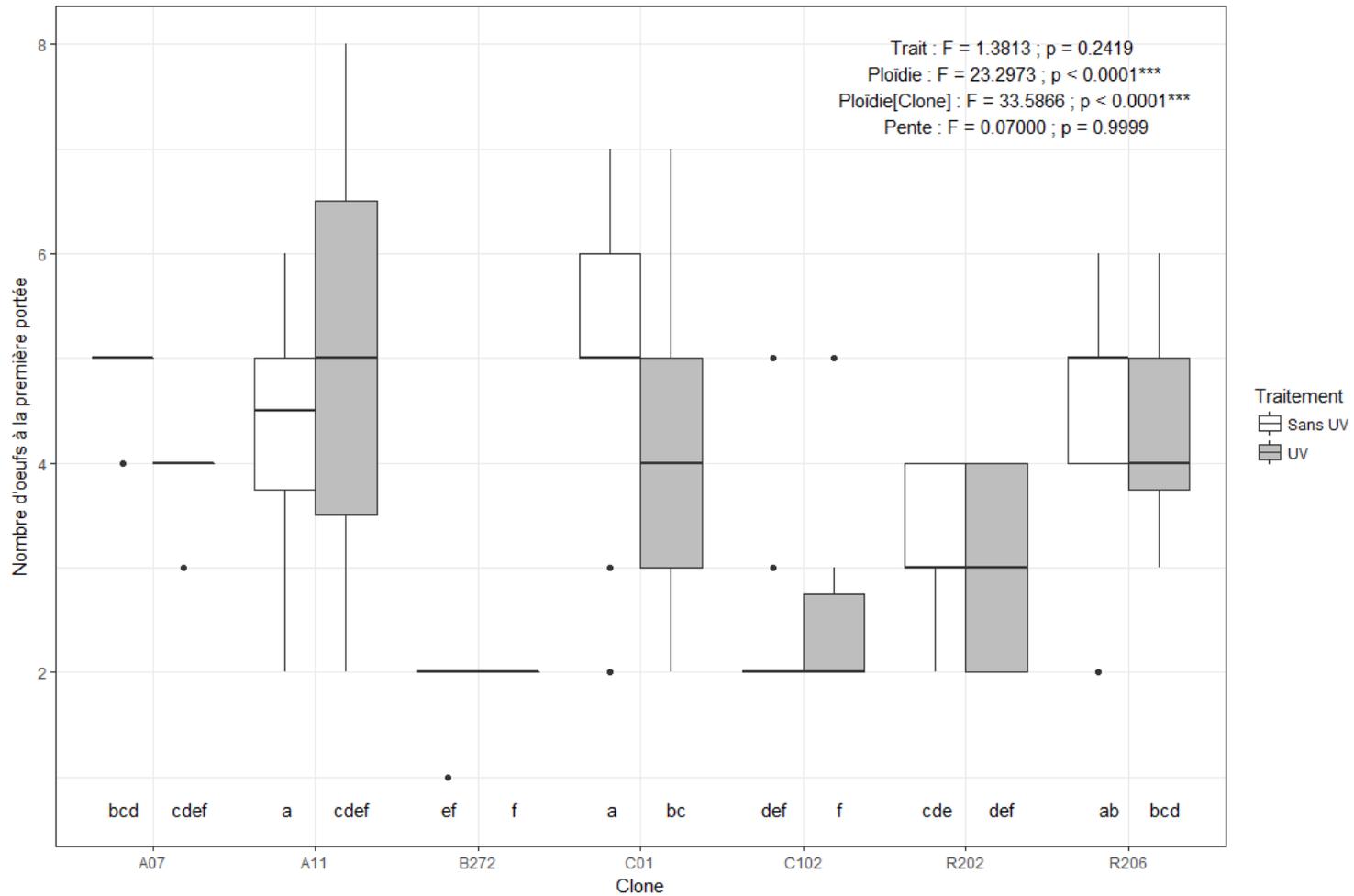


Figure 6. Nombre d'œufs de la première portée en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

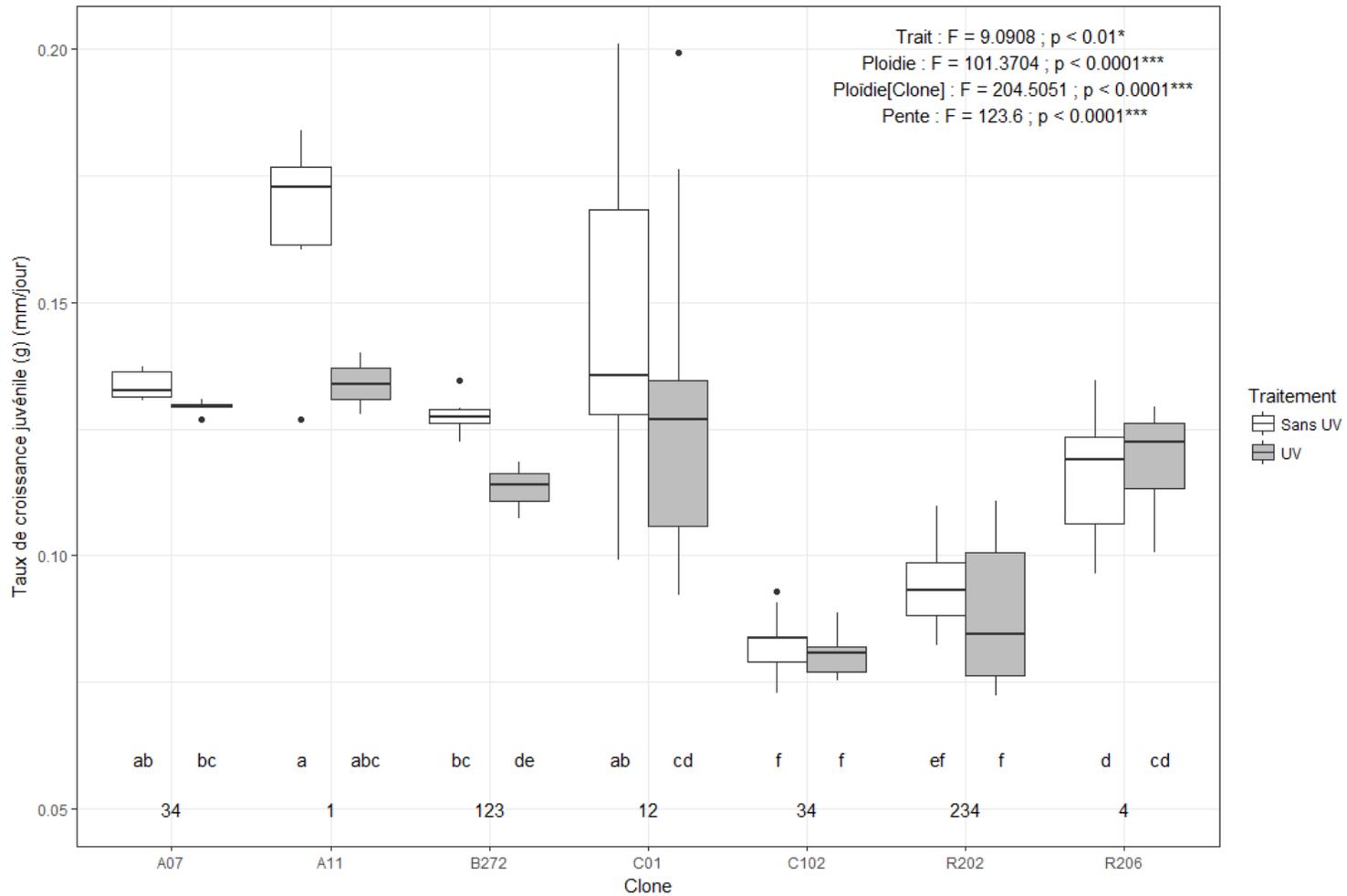


Figure 7. Taux de croissance juvénile (g) en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD (lettres) sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA et des groupes LSD (chiffres) sur les normes de réaction (pente)

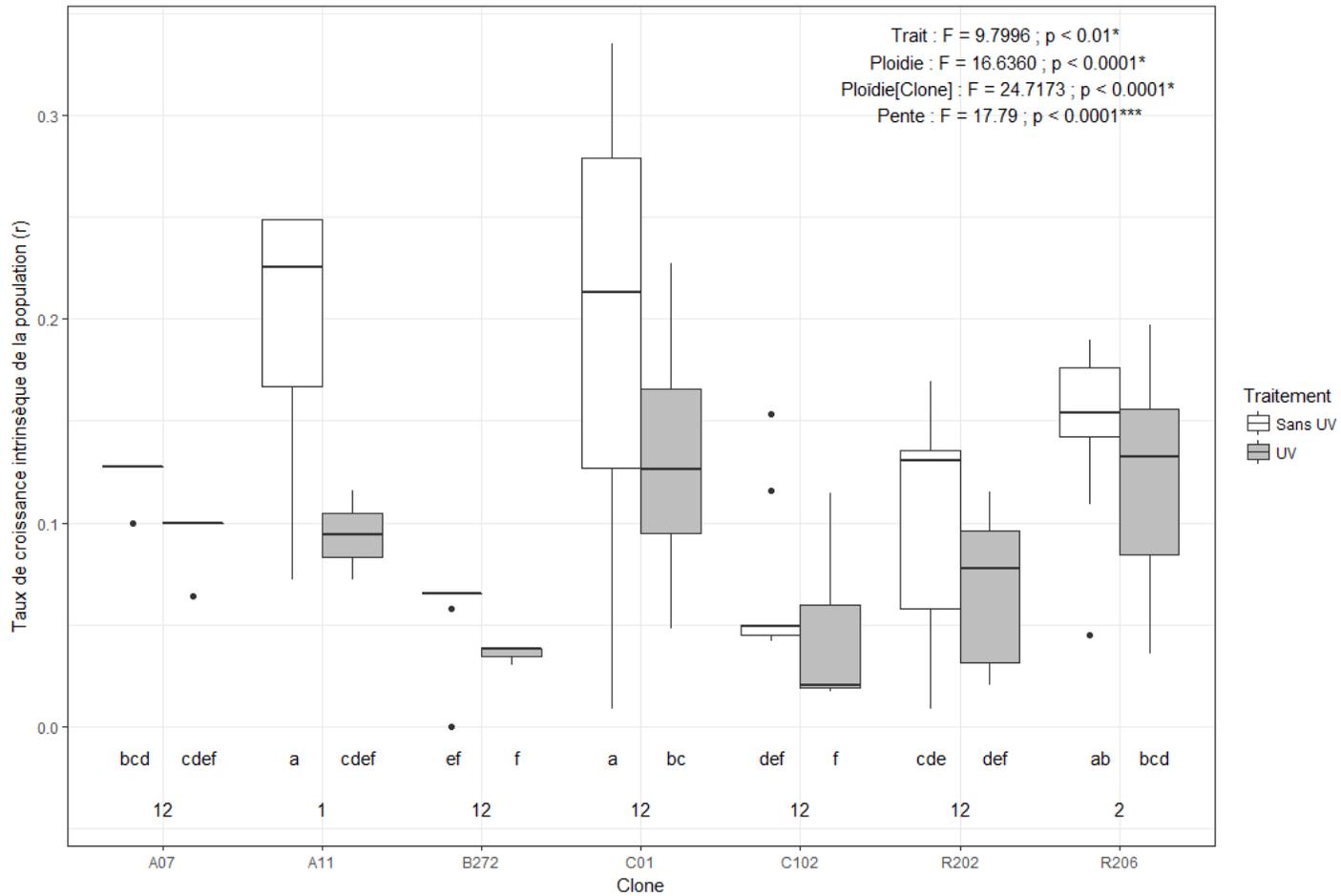


Figure 8. Taux de croissance intrinsèque de la population (r) selon l'équation d'Euler-Lotka en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD (lettres) sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA et des groupes LSD (chiffres) sur les normes de réaction (pente)

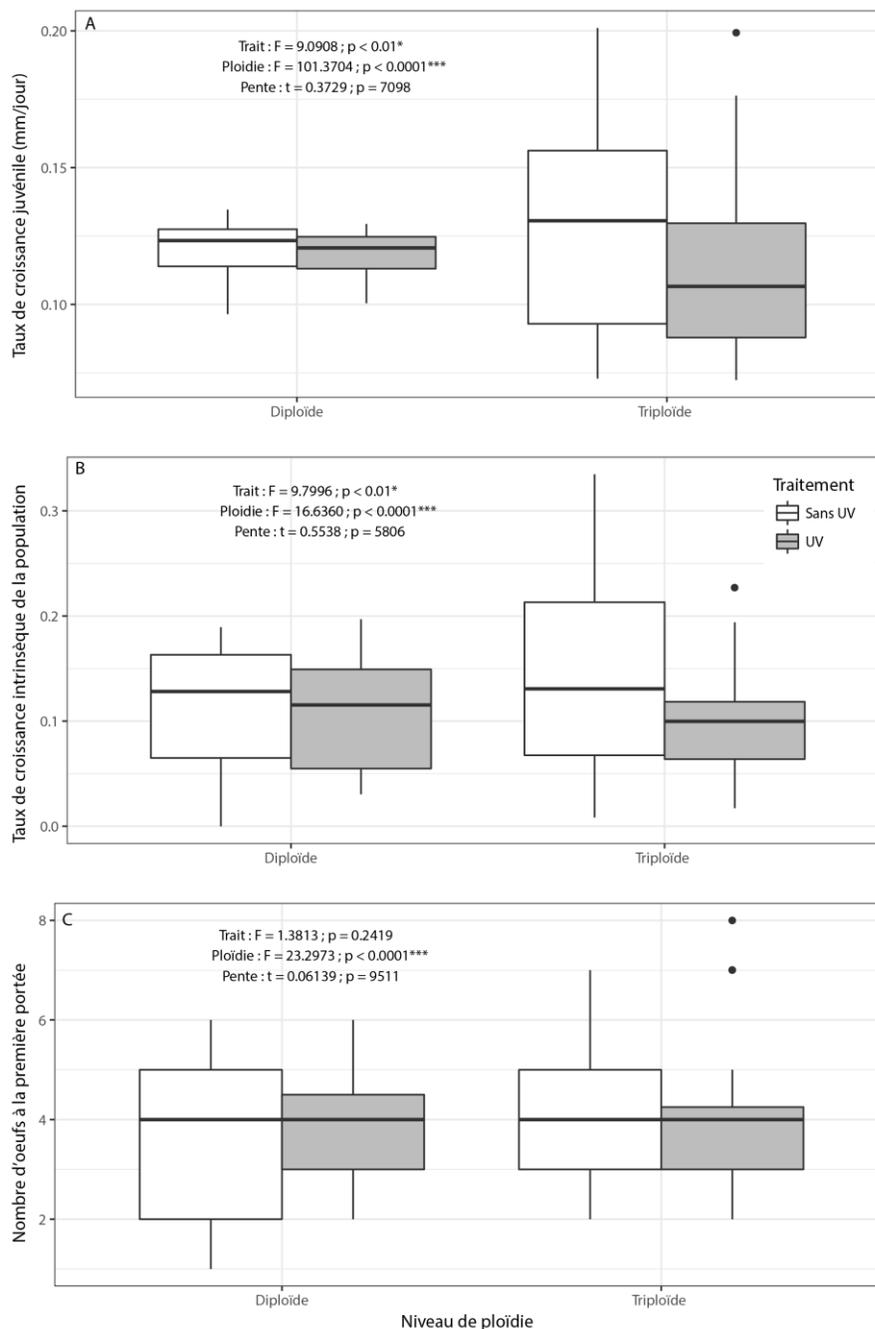


Figure 9. Taux de croissance juvénile (g) (A), taux de croissance intrinsèque de la population (r) (B) et nombre d'œufs à la première portée (C) en fonction du niveau de ploïdie et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

La *phénoloxydase* (*PO245*) était significativement plus exprimée chez les clones triploïdes que chez les clones diploïdes (Fig. 16D). Elle était plus exprimée chez les clones A07 et C01 (Fig. 13). Les clones A38, C102 et R202 sont ceux dont l'expression relative de *PO245* était la plus faible, jusqu'à huit fois inférieure à l'expression du gène chez les clones A07 et C01 (Fig. 13). L'expression de *PO245* est relativement similaire entre les trois clones diploïdes (Fig. 13).

En moyenne, les daphnies triploïdes exprimaient statistiquement plus la *dopa-décarboxylase* (*Ddc*) que leurs congénères diploïdes (Fig. 16E). La *Ddc* était aussi plus exprimée chez les clones A07 et C01, et équivalente chez le clone C102 (Fig. 14). Les autres clones exprimaient tous le gène *Ddc* de manière équivalente, exception faite du clone R206 une fois exposé aux UV (Fig. 14). Malgré cet écart, l'ANOVA et le LSD n'ont pas détecté de différences entre les traitements (Fig. 14). La valeur d'expression la plus faible équivaut à environ 1/10 de la valeur la plus forte (Fig. 14).

Les triploïdes exprimaient statistiquement moins le gène *P53* que les diploïdes (Fig. 16F). Le facteur *P53* était très exprimé chez les clones A07, A11 et B272 (Fig. 15). Les clones A38, C102 et R202 sont les clones qui exprimaient le moins ce gène (Fig. 15).

Les clones sont distribués en trois groupes selon la combinaison du taux d'expression relatif de chacun des gènes d'intérêts ($h = 0.30$; $R = 0.88$; $p < 0.01$) (Fig. 17). Un premier groupe, composé des clones A07 et C01, exprimait davantage l'ensemble des gènes à l'étude que les autres clones (Fig. 17). Un second groupe, composé des clones C102 et R202, exprimait le plus faiblement *PLA-I* et *P53* (Fig. 17). Le troisième et dernier groupe, composé des clones restants, exprimait de manière intermédiaire les gènes *PLA-I* et *P53* et très faiblement l'ensemble des autres gènes d'intérêt (Fig. 17)

3.2 DISCUSSION

3.2.1 SITE D'ETUDE ET DISTRIBUTION DES DAPHNIES

Il était attendu que certains des paramètres physicochimiques des étangs, notamment la concentration en DOC, auraient un impact direct sur la distribution des clones mélanisés. Plusieurs études antérieures ont rapporté que les daphnies pigmentées habitent principalement les étangs à faible concentration de DOC alors que les clones non pigmentés sont plus à même d'être retrouvés dans les étangs à forte teneur en DOC (Hebert et McWalter 1983 ; Beaton et Hebert 1988 ; Hebert et Emery 1990 ; Hessen et Sorensen 1990 ; Rautio et Korhola 2002). Des expériences de transplantation ont d'ailleurs confirmé que les clones clairs ne sont pas aptes à survivre dans des étangs à faible DOC (Hebert & Emery 1990). Il a aussi été observé que, dans certains étangs, les clones mélanisés coexistent avec leurs homologues non pigmentés, mais que ceux-ci occupent des microhabitats distincts. Les clones pigmentés se retrouvent en effet plus près de la surface lors des périodes d'irradiation (Hebert et Emery, 1990). Nos résultats ne démontrent cependant pas de différences significatives au niveau de la distribution des clones mélanisés. Par contre, ces clones tendent tout de même à se retrouver dans les étangs avec moins de DOC, ce qui correspond aux résultats des études susmentionnées abordé dans le sens des prédictions de départ. Le nombre restreint d'étangs échantillonnés, dû à des conditions climatiques exceptionnelles ayant entraîné l'évaporation complète de plusieurs plans d'eau en juillet 2014, expliquerait pourquoi cette relation n'a pu être démontrée ici.

Il était aussi prévu que les clones polyploïdes peuplent les étangs aux conditions environnementales moins favorables (i.e. dont les paramètres physicochimiques présentent des valeurs extrêmes) que les diploïdes. Cette hypothèse est cependant rejetée puisqu'aucun des paramètres mesurés n'a d'effet significatif sur la distribution des clones triploïdes. Les résultats ne concordent pas non plus avec les recherches antérieures, où il a été démontré que les clones triploïdes ne coexistent pas avec les clones diploïdes et sont distribués le

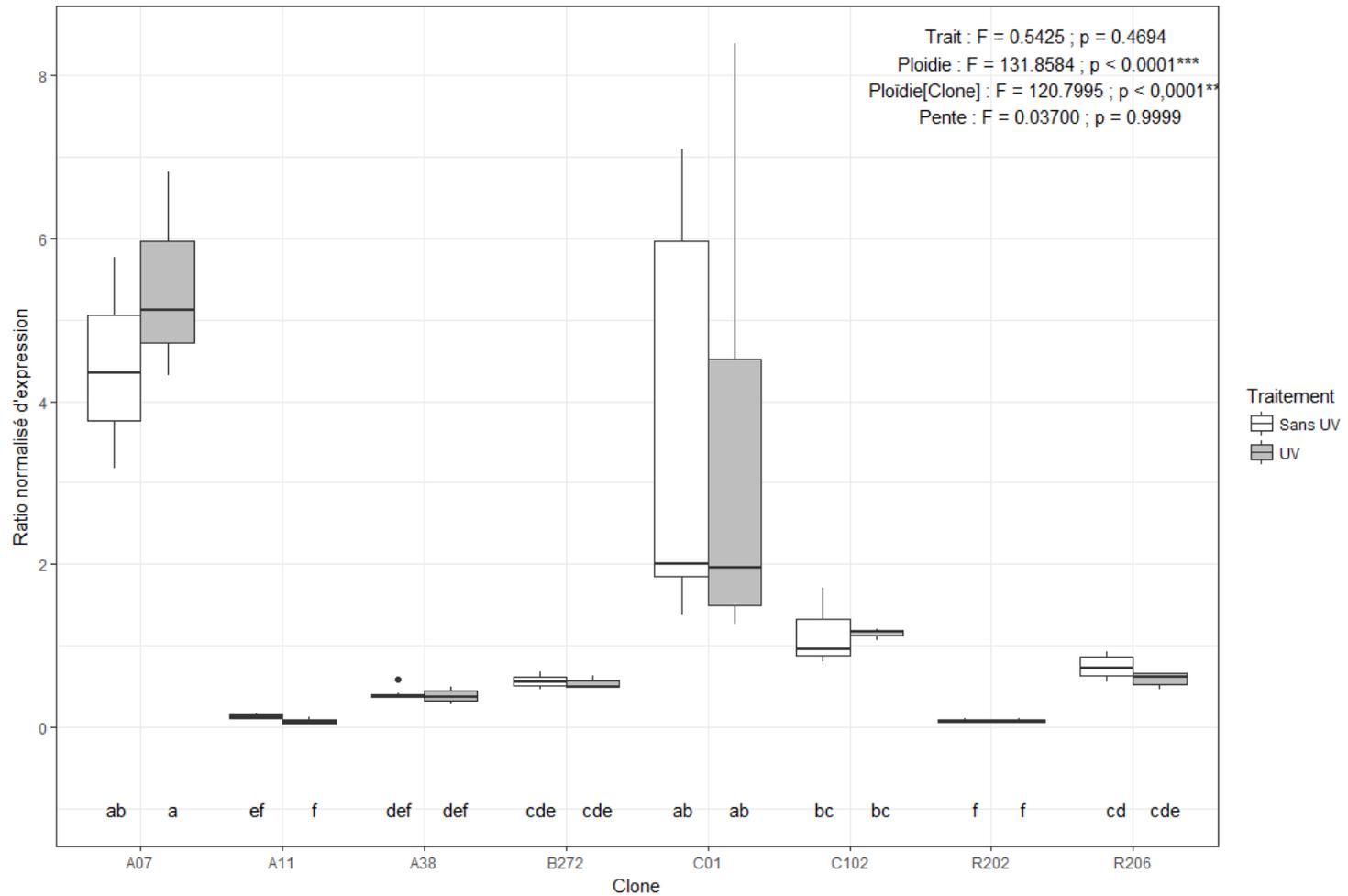


Figure 10. Expression relative normalisée de *PHR-Y05* en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

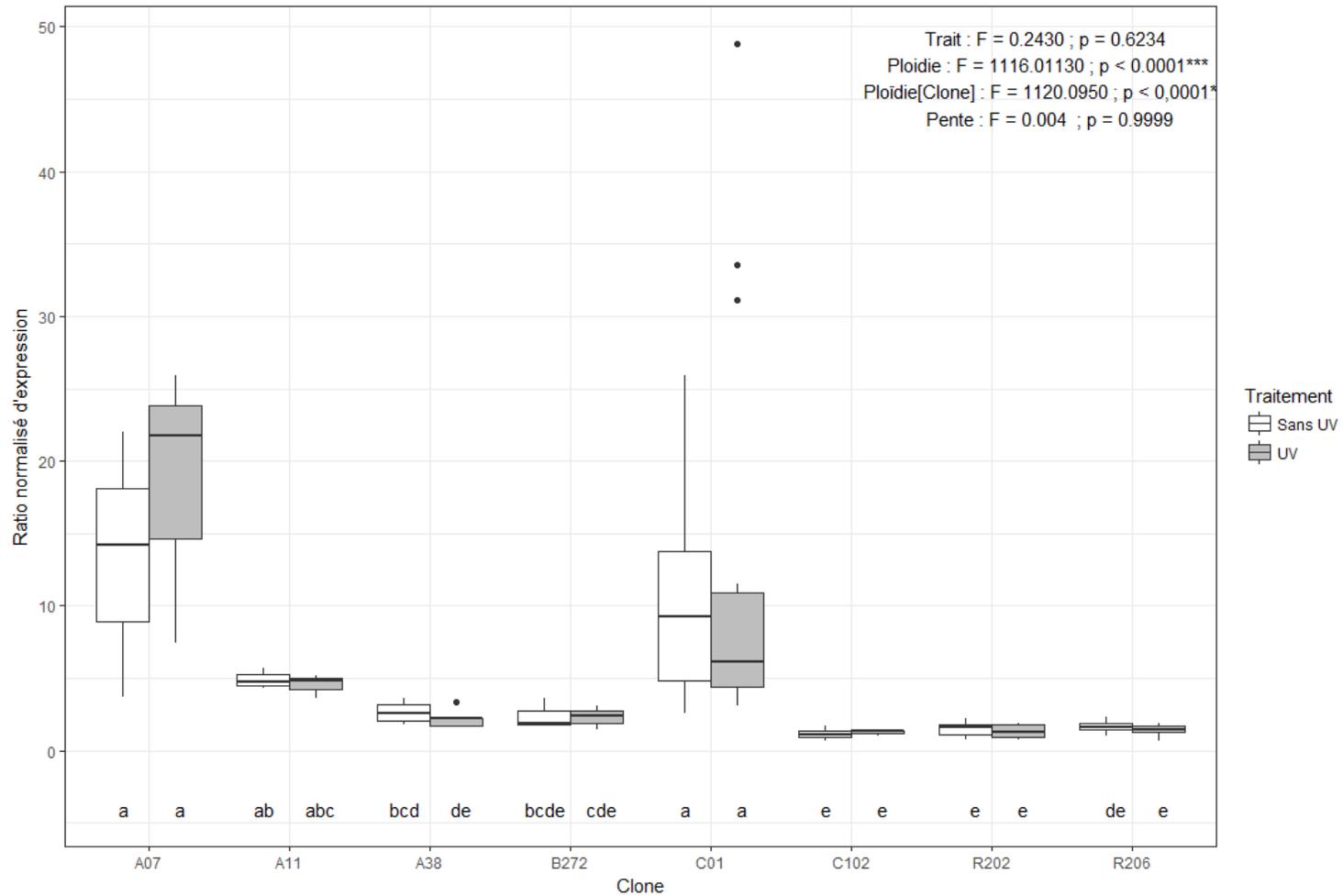


Figure 11. Expression relative normalisée de *PLA-1* en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

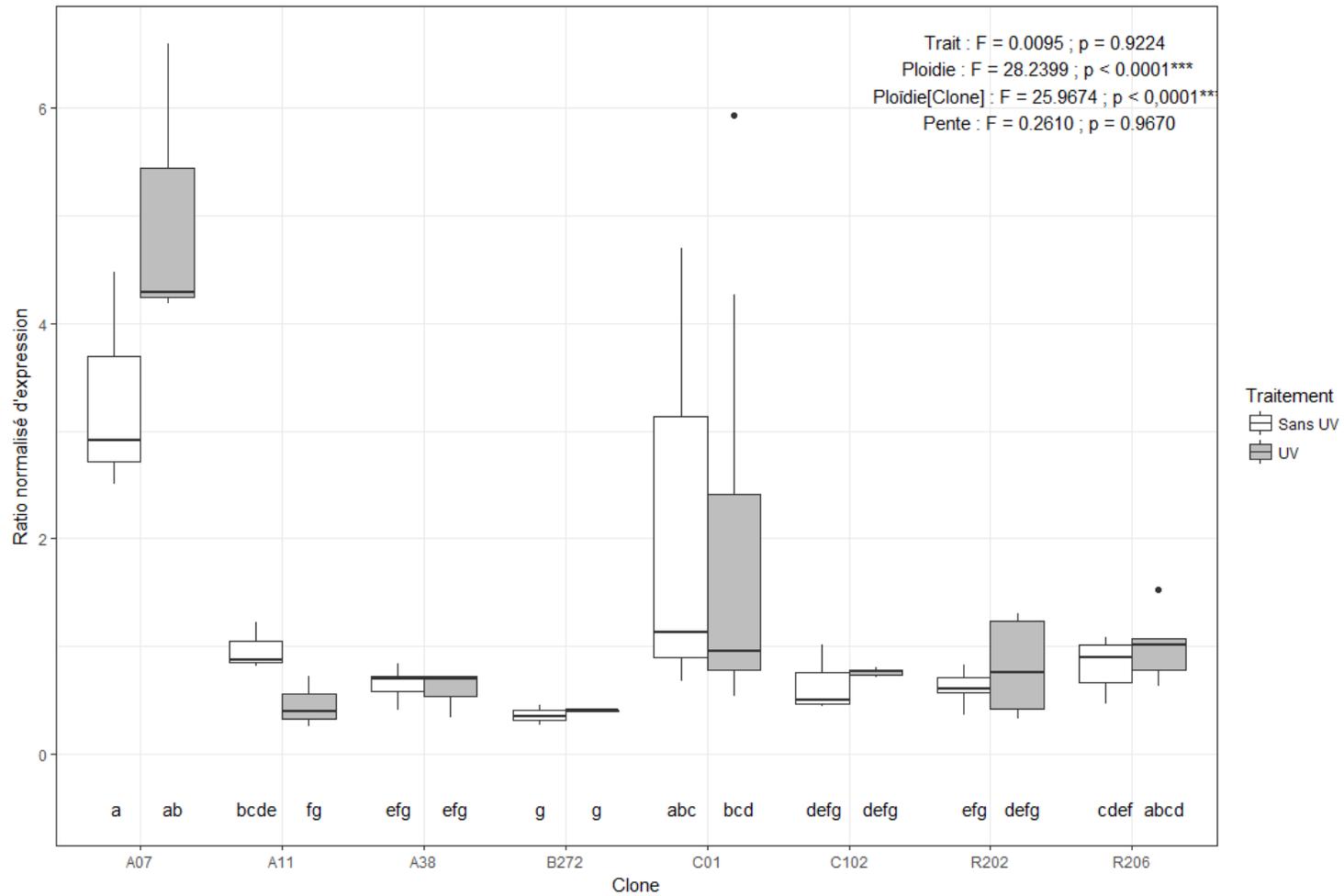


Figure 12. Expression relative normalisée de XPA en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

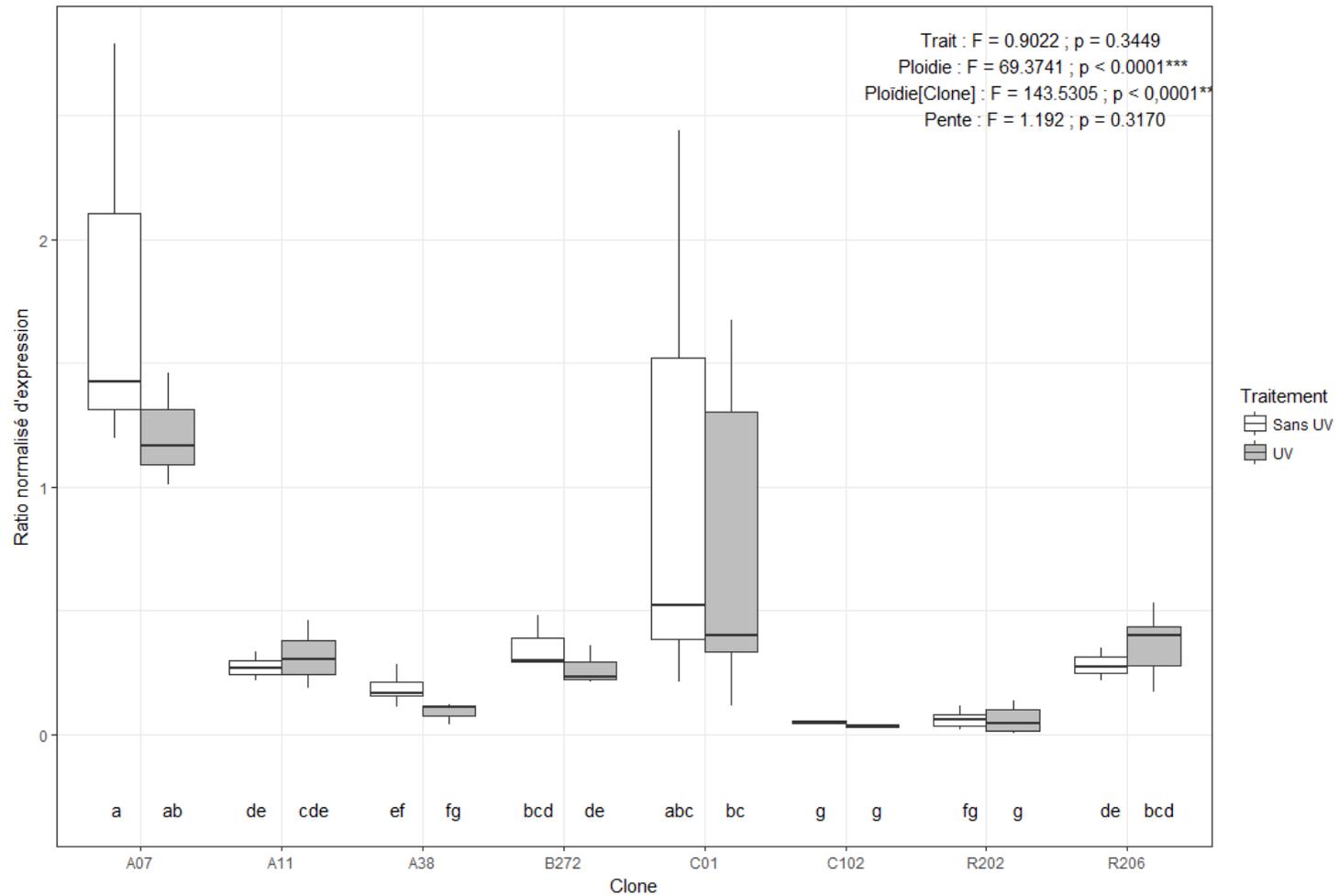


Figure 13. Expression relative normalisée de *PO245* en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

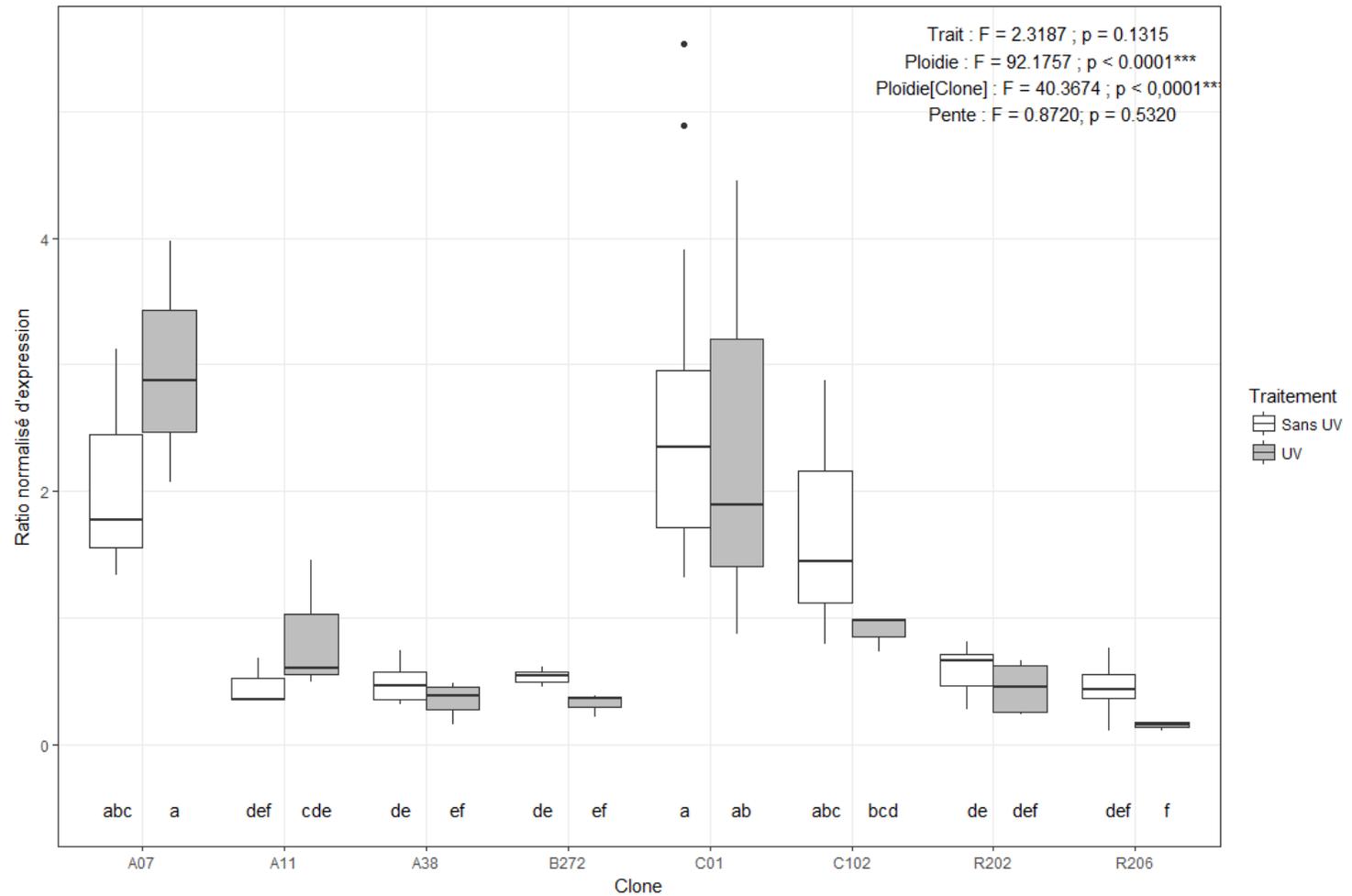


Figure 14. Expression relative normalisée de *Ddc* en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

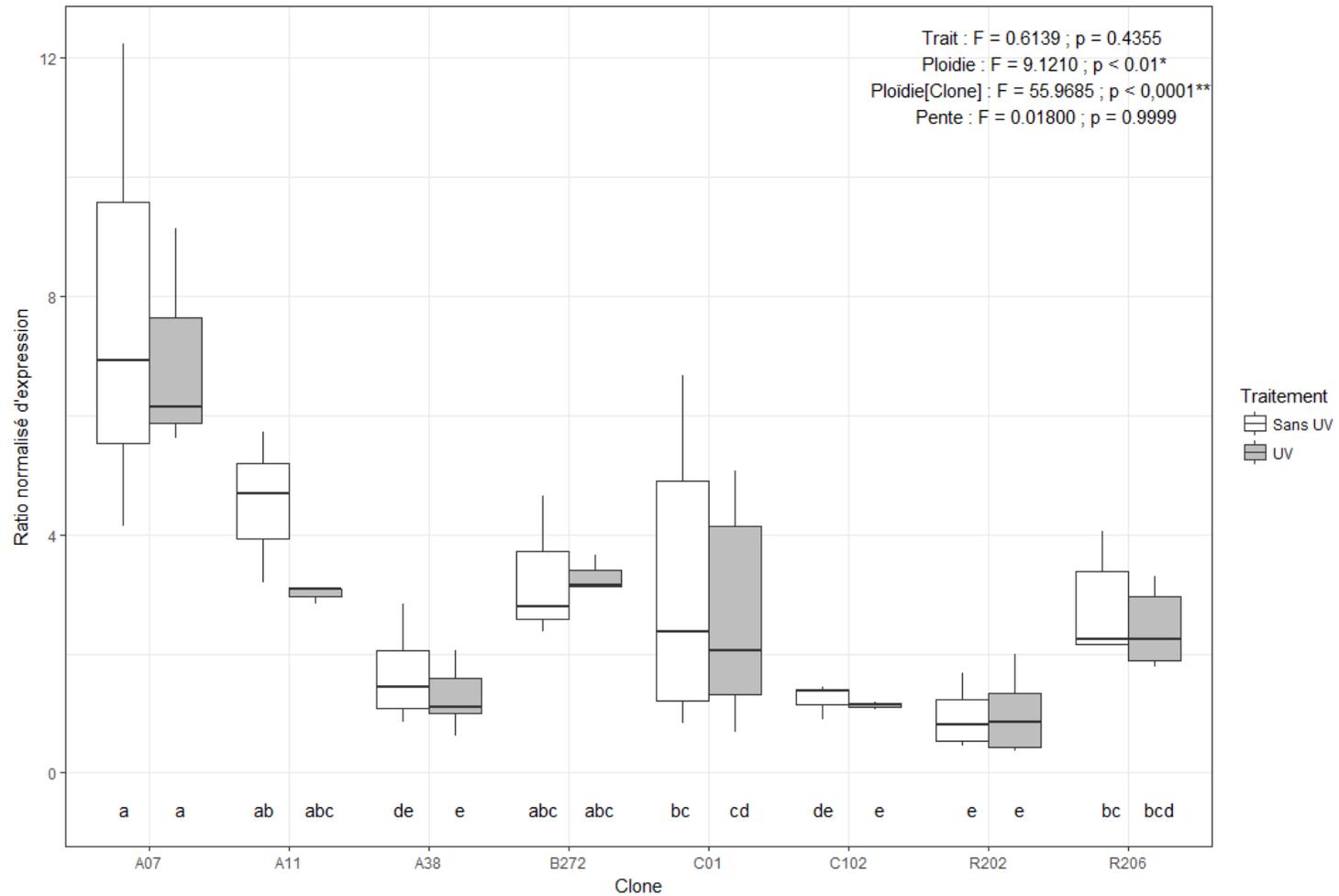


Figure 15. Expression relative normalisée de *P53* en fonction du clone et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

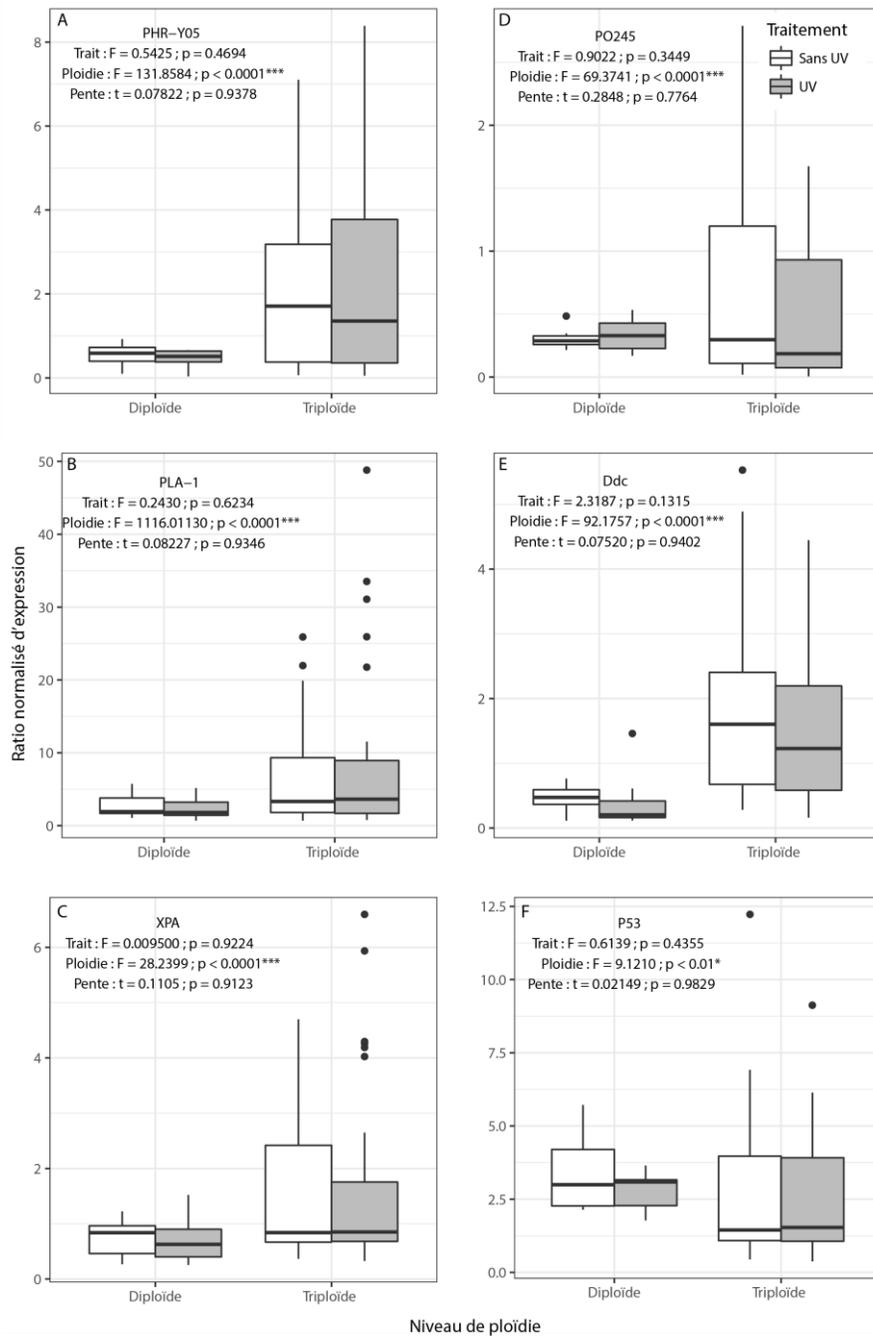


Figure 16. Expression relative normalisée des six gènes d'intérêt dans la réponse aux UV en fonction du niveau de ploïdie et du traitement d'exposition expérimental aux UV. Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sur les rangs sont affichés sur le graphique en plus des résultats de l'ANOVA sur les normes de réaction (pente)

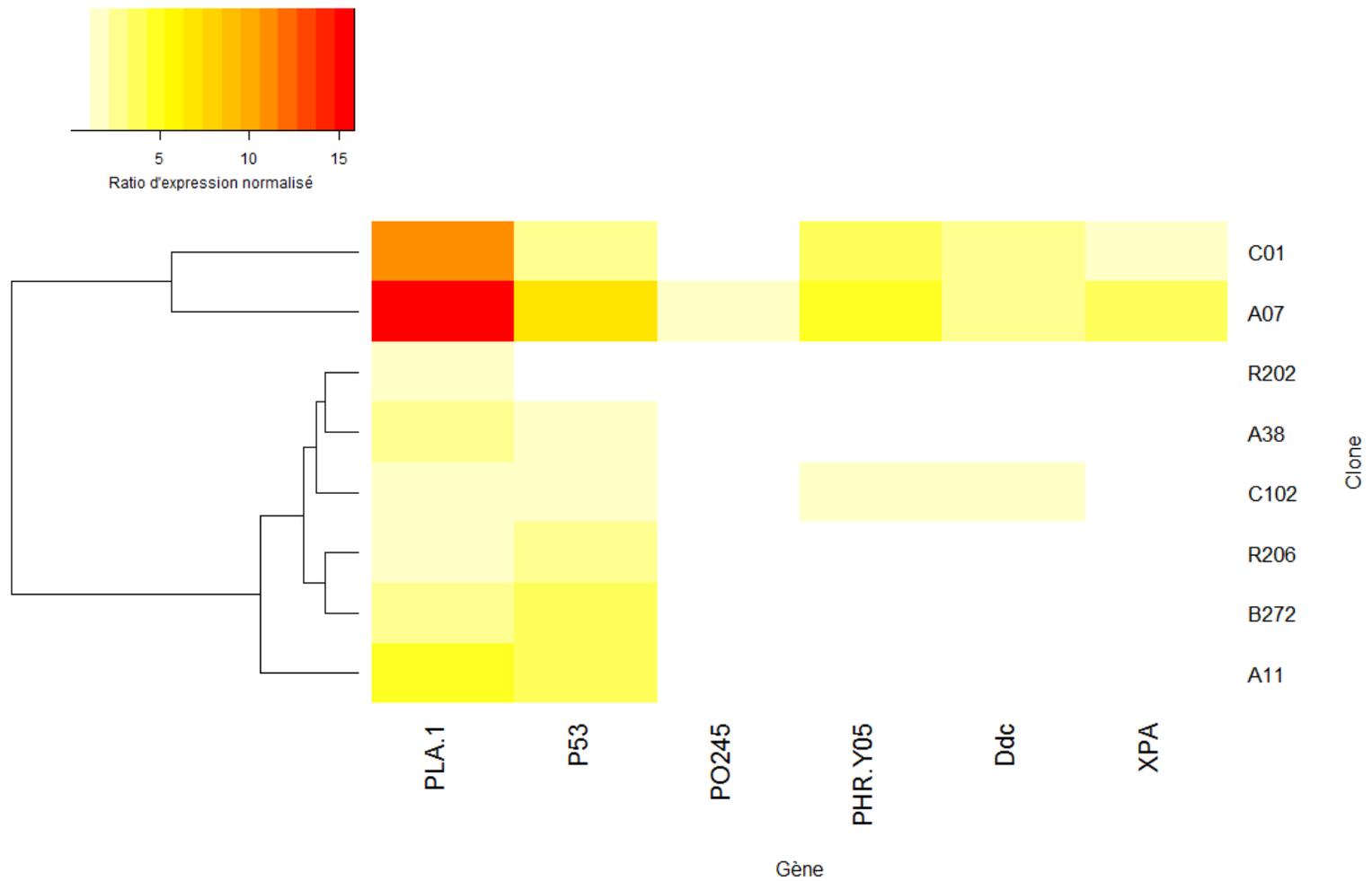


Figure 17. Représentation de l'expression relative normalisée des six gènes d'intérêt dans la réponse aux UV et des stratégies différentielles d'expression génique en fonction du clone

long d'un gradient de paramètres abiotiques et biotiques distinct (Dionne *et al.*, 2017). Cette relation n'a probablement pas pu être établie pour les mêmes raisons ayant empêché la mise en évidence de la relation pourtant vérifiée entre le taux de mélanisation et la concentration en DOC de l'eau.

3.2.2 EXPOSITION EXPERIMENTALE

Bien que de nombreuses études se soient penchées sur l'effet des UV sur les daphnies, cette étude est l'une des rares où les organismes ont été exposés au spectre lumineux d'un simulateur solaire dans le but de reproduire le plus fidèlement les conditions d'irradiation naturelles. À titre comparatif, Miner *et al.* (2011 ; 2015) ont exposé leurs daphnies à un total de 33 kJ/m² d'UVB sur une période de 12 heures, soit une dose plus de 30 fois supérieure à celle de la présente étude, et Connelly (2007) a atteint un maximum à plus de 160 kJ/m² pour une heure d'exposition (Annexe III). Ainsi, les résultats présentés ici ne sont pas directement comparables avec ceux de la littérature scientifique actuelle, car toutes ces études ont opté pour l'utilisation de fluorescents émettant uniquement dans le UV et/ou pour des conditions expérimentales aux valeurs extrêmes qui ne sont jamais observées en nature.

3.2.2.1 TRAITS D'HISTOIRE DE VIE

Tel qu'attendu, l'exposition aux UV cause une hausse importante de la mortalité chez tous les clones. Ces résultats sont soutenus par plusieurs études antérieures (Grad *et al.*, 2001 ; Huebner *et al.*, 2013). La majorité de la mortalité survient durant les 24 heures suivant l'exposition ce qui suggère que les mécanismes de réparation sont moins rapides que le taux d'accumulation de lésions et qu'ils ne suffisent pas à ramener la quantité de dommages à un niveau acceptable au sein du génome. La grande variabilité en termes de mortalité observée entre les clones, pré- et post-repos, sous-entend que ceux-ci diffèrent de par leur tolérance intrinsèque aux UV. De ce fait, deux groupes de clones se distinguent parmi les clones exposés : ceux tolérant une plus grande plage d'irradiation solaire et ceux présentant une forte sensibilité à ce type de radiations. Les clones A07 et C102 sont ceux

qui ont le mieux survécu au traitement. La mélanisation de la carapace du clone A07 explique assurément sa plus grande résistance aux UV. Il a en effet été démontré dans de nombreuses études que la pigmentation chez les daphnies leur confère une tolérance supérieure à ce type de rayonnement (Luecke & O'Brian, 1983 ; Hebert & Emery, 1990 ; Zellmer, 1995 ; Hessen, 1996 ; Hessen *et al.*, 1999 ; Rhode *et al.*, 2001). La forte résistance du clone C102 est quant à elle très intrigante. Tout d'abord, ce clone n'est pas pigmenté et se retrouve, en milieu naturel, dans des étangs faibles en DOC, ce qui va à l'encontre de la relation mélanisation-DOC décrite plus tôt. Il est plausible que de telles conditions favorisent l'acclimatation de ce clone à un spectre plus large d'irradiation solaire. Autre spécificité, le clone C102 est issu d'une hybridation passée entre *D. pulex* et *D. tenebrosa* et il est possible que ce bagage génétique particulier lui procure un avantage sous de telles conditions. En ce qui a trait aux hypothèses sur l'effet de la polyploïdie, les clones polyploïdes présentent en moyenne un taux de mortalité légèrement plus faible que les clones diploïdes, ce qui concorde avec les prédictions initiales. Cependant, la distribution hétérogène des clones en milieu naturel ne permet d'expliquer un tel constat. La hausse d'hétérozygotie qui résulte de la polyploïdie (Vergilino *et al.*, 2009) peut conférer aux daphnies un potentiel adaptatif supérieur face à un plus large éventail de conditions environnementales, incluant l'irradiation solaire.

Les prédictions de départ quant à l'effet des UV sur les traits d'histoire de vie se sont aussi avérées, puisque l'exposition aux UV a un impact négatif sur les taux de croissance juvénile (g) et populationnel (r) des daphnies. Ces observations concordent d'ailleurs avec ce qu'ont observé par le passé Grad *et al.* (2001) et par Huebner *et al.* (2013) sur *D. pulex* et *D. magna* respectivement. Bien qu'il existe en milieu naturel une grande variabilité entre les clones pour ces deux traits, c'est plutôt les normes de réaction, soit l'amplitude de l'effet du traitement, qui sont d'un intérêt particulier ici. Ainsi, les clones A07 et C102 demeurent parmi les moins affectés par le traitement ce qui s'inscrit dans la continuité de ce qui est observé et inféré à partir des taux de mortalité. À partir des résultats de distribution, seule la sensibilité des clones C01, R202 et R206 s'explique par la relation qui existe entre la concentration en DOC de l'eau et les limites adaptatives qui en

découlent puisque ceux-ci habitent majoritairement des étangs à forte teneur en DOC (Dionne *et al.*, 2017 pour les clones provenant de Kuujjuarapik). Cette observation résonne aussi avec les taux de mortalité obtenus. Les autres clones peuplent tous des étangs faibles en DOC en milieu naturel. Il serait donc attendu qu'ils soient mélanisés ou encore simplement adaptés localement aux UV à l'image du clone C102. Leur sensibilité suggère plutôt qu'ils mettent en place des stratégies alternatives tel que l'évitement comportemental, comme l'ont déterminé Rose *et al.* (2012). En moyenne et contrairement à ce qui était prédit, les triploïdes sont affectés plus négativement par le rayonnement UV. En conditions optimales, il existe déjà un écart connu entre les taux de croissance individuel et populationnel des polyploïdes et des diploïdes (Lynch, 1984 ; Weider *et al.*, 1987 ; Beaton et Hebert, 1988 ; revu par Otto et Whitton, 2000).

3.2.2.2 EXPRESSION GENIQUE

L'expression relative normalisée des gènes d'intérêt sélectionnés dans le cadre de cette étude est indépendante de la présence de radiations UV, ce qui va à l'encontre des prédictions initiales. L'effet seuil pourrait être en cause ici (revu par Little, 2005). La régulation de l'expression des gènes étant un processus très coûteux et complexe, le seuil au-dessus (ou au-dessous) duquel un gène sera exprimé de manière différentielle est souvent très élevé (ou très bas). Les conditions d'irradiation déclenchant une régulation de l'expression de ces gènes n'ont donc probablement pas été atteintes lors de l'expérience pour l'ensemble des gènes. Bien qu'aucun des six gènes ne présente de variation significative dans son taux d'expression entre les traitements, la grande variabilité interclonale observée avec les traits d'histoire de vie demeure, renforçant l'hypothèse d'une forme d'adaptation propre à chacun des clones.

L'expression relative moyenne selon le niveau de ploïdie des deux gènes codant pour la *photolyase* et la *photolyase-1* montre que les triploïdes ont un taux de réparation des dommages génomiques spécifiques à une irradiation aux UV plus élevée que leurs homologues diploïdes. En ce sens, les prédictions de départ seraient avérées. Cependant, les clones A07 et C01 expriment quatre à cinq fois plus les gènes *PHR-Y05* et *PLA-1* que les

autres clones triploïdes, nivelant ainsi cette moyenne vers le haut et restituant cette interprétation à la simple hypothèse. Ce sont aussi les deux clones pour lesquels l'amplitude de la réponse face au traitement (normes de réaction) est la plus élevée. Il est intrigant que le clone A07 exprime à ce point ces gènes de réparation, l'efficacité protectrice de la mélanisation ayant été démontrée à mainte reprise par le passé (Hebert et Emery 1990 ; Connelly, 2007). Il en va de même pour le clone C01, qui peuple naturellement des étangs concentrés en DOC et qui n'est donc pas exposé directement à de fortes irradiances. Ces résultats suggèrent que l'expression des gènes de photoréparation a été sélectionnée lors d'événements adaptatifs passés puis conservée dans le temps selon les variations locales. Les particularités du clone C102 mentionnées plus tôt s'illustrent aussi à travers ce patron d'expression, puisqu'il exprime relativement peu ces deux gènes, mais habite naturellement des étangs faibles en DOC. La faible expression de *PHR-Y05* et *PLA-1* des autres clones concorde avec ce qui était attendu, puisqu'ils habitent, en milieu naturel, des étangs à forte teneur en DOC. Bien qu'il n'y ait eu aucun effet du traitement, les résultats d'expression des gènes *PHR-Y05* et *PLA-1* concordent avec ceux obtenus par Miner *et al.* (2015) qui, malgré une irradiation plus de 30 fois supérieure à celle présentée ici, n'a pas observé de différence dans l'expression des gènes de photoréparation entre des daphnies provenant d'habitats contrastés en termes d'irradiance. Cependant, considérant le niveau d'irradiation très élevé de l'étude de Miner *et al.* (2015) et sachant que l'activation de ces gènes est régulée par la présence de lumière visible, il est plus probable que cette famille de gènes ne subisse aucune forme de régulation graduelle, mais plutôt une régulation selon l'effet seuil (revu par Little, 2005). Les résultats obtenus pour le gène de réparation non spécifique *XPA* s'inscrivent dans la continuité de ceux obtenus pour *PHR-Y05* et *PLA-1*. L'absence de différence entre les triploïdes et les diploïdes en ce qui a trait aux normes de réaction suggère finalement que ces premiers ne sont pas plus efficaces dans la réparation des dommages causés à leur matériel génétique.

Comme pour les gènes de réparation, les clones A07 et C01 sont ceux qui expriment le plus la *phénoloxydase* et la *dopa-décarboxylase*. L'explication proposée ici est la même que celle soulevée dans le cas des gènes de réparation. Bien que la relation entre

l'expression de *Ddc* et la mélanisation de la carapace soit complexe, Scoville et Pfrender (2010) en sont arrivés à la conclusion qu'une hausse de l'expression de ce gène entraînait généralement une diminution du taux de mélanisation chez les daphnies. Au contraire, l'expression de *PO245* est directement liée à la production de mélanine (Schumpert *et al.*, 2015). L'expression de *Ddc* est légèrement supérieure à celle de *PO245* chez tous les clones, tous traitements confondus, empêchant les daphnies de déposer la mélanine dans les cellules de leur carapace. Il était tout de même attendu que les daphnies mélanisent leur carapace au cours de la période de repos, ce qui n'a pas été le cas. Cette période de repos était potentiellement trop courte pour permettre la mue des daphnies après l'exposition. Dans le cas du clone A07, qui présente le même patron d'expression, le fait que la carapace soit déjà pourvue du pigment indique que celui-ci ne soit pas en instance de production de mélanine. Le dépôt du pigment s'effectue en effet lors de la mue (Hessen, 1996) et il est probable que les gènes impliqués dans la synthèse du pigment ne soient exprimés en conséquence qu'à cette étape du développement. En ce qui a trait à l'effet de la polyploidie sur l'expression de ces gènes, le cas de figure observé pour les gènes de réparation semble se répéter. En effet, les clones A07 et C01 ont pour effet de gonfler la moyenne calculée pour les triploïdes, limitant ainsi l'interprétation. Le spectre d'expression (normes de réaction) montre aussi que la réponse de protection chez les triploïdes n'est pas plus efficace que celle des diploïdes.

Cette étude est de plus l'une des rares à avoir mesuré l'expression relative du facteur *P53* chez les daphnies exposées aux radiations UV, facteur qui aurait un rôle direct dans la voie métabolique menant à l'apoptose cellulaire (Hwang *et al.*, 2010). Les résultats suggèrent que les clones triploïdes subiraient en moyenne un taux de mort cellulaire moins élevé que les diploïdes ce qui concorde avec les taux de mortalité observé et qui confirme l'hypothèse de départ.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

4.1 CONCLUSION DU PROJET DE RECHERCHE

Ce projet de recherche est l'un des rares à s'être intéressé aux effets des conditions d'irradiation en milieu naturel sur le complexe *D. pulex* en hautes latitudes, en plus d'intégrer la polyploïdie dans les analyses afin de comprendre l'origine et la présence de la triploïdie dans les régions arctiques et subarctiques. Les résultats obtenus n'ont permis que de confirmer l'hypothèse selon laquelle les daphnies triploïdes survivent mieux à des conditions extrêmes d'irradiation UV que les diploïdes, sans pour autant permettre d'expliquer avec précision un tel constat. Les autres traits d'histoire de vie mesurés soulèvent au contraire plusieurs questions quant aux coûts métaboliques intrinsèques de la polyploïdie chez les animaux. Autrement, il semble que la performance générale ainsi que la régulation de l'expression des gènes d'intérêt dans la réponse aux UV des différents clones ne soient pas directement tributaires à leurs étangs d'origine. En effet, la grande variabilité interclonale suggère la pérennité de phénotypes issus d'événements adaptatifs locaux passés qui n'ont que très peu à voir avec les conditions actuelles des plans d'eau. L'absence d'effet du traitement sur la régulation des gènes vient appuyer les résultats de Miner *et al.* (2015) et l'hypothèse selon laquelle la production de ces enzymes n'est affectée que par la présence de lumière visible. Ces observations appuient aussi l'hypothèse voulant que leur régulation soit normalement attribuable à l'effet seuil. En somme, après les travaux de Ratté (2011) sur le métabolisme, cette étude n'a pas non plus été en mesure de déterminer avec certitude les mécanismes via lesquels la polyploïdie favoriserait l'adaptation aux environnements aux conditions changeantes et difficiles.

4.2 CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de cette étude était de 1) déterminer certains des mécanismes via lesquels la polyploïdie participe à l'adaptabilité des organismes vivants en plus de 2) s'intéresser aux processus, en lien avec cet état chromosomique, pouvant expliquer la distribution géographique des daphnies, plus précisément des clones triploïdes du complexe d'espèces *D. pulex* en hautes latitudes. Dans cette optique, des daphnies diploïdes et triploïdes en provenance de Churchill, Manitoba et de Kuujuaaraapik, Québec, ont été élevées en laboratoire en conditions standardisées, puis ont été irradiées expérimentalement à l'aide d'un simulateur solaire imitant les conditions de rayonnement naturelles, mais extrêmes, propre aux latitudes arctiques et subarctiques. Des mesures de mortalité et de valeur adaptative ont été réalisées dans le cadre de ces expositions, mais surtout, le taux d'expression relatif de six gènes d'intérêt dans la réponse physiologique photoinduite chez les daphnies a été calculé. Le tout a été mis en relation et en parallèle avec les paramètres physicochimiques des étangs d'origine des différents clones utilisés. Les résultats obtenus ne montrent pas d'effets de la polyploïdie sur l'expression des gènes et les traits d'histoire de vie à l'exception du taux de mortalité qui était légèrement plus faible chez les daphnies triploïdes.

Le nombre de clones n'était probablement pas suffisant pour établir avec précision l'effet de la polyploïdie sur les performances globales des daphnies et sur l'expression relative des gènes sélectionnés. Ce nombre a été limité par les conditions climatiques exceptionnelles qui ont affecté le site d'échantillonnage à l'été 2014 en entraînant l'évaporation complète d'un grand nombre d'étangs. Un plus grand nombre de clones aurait permis de mieux établir la relation fine entre les patrons de distribution des clones et les caractéristiques physicochimiques des étangs comme rapporté par plusieurs études antérieures (Hebert et McWalter 1983 ; Beaton et Hebert 1988 ; Bogart *et al.*, 1989 ; Hebert et Emery 1990 ; Hessen et Sorensen 1990 ; Dufresne et Hebert, 1998 ; Ramsey et Schemske, 1998 ; Rautio et Korhola 2002 ; Dionne *et al.*, 2017). Améliorer cet aspect de

l'expérience permettrait aussi de tamponner les valeurs « extrêmes » observées, chez certains clones (relativement aux autres clones), valeur ayant visiblement eu une grande influence sur les résultats obtenus.

Cette étude a tout de même permis d'émettre plusieurs hypothèses pour expliquer la disparité entre les clones et leur stratégie respective, sans pour autant qu'il y ait de patron avec le niveau de la ploïdie. Pour certains clones, les relations connues entre les conditions environnementales des étangs d'origine et la réponse physiologique étaient suffisantes pour expliquer les mesures obtenues post-irradiation. La réponse des autres clones ne cadrerait cependant pas avec ce qui a été démontré par le passé ce qui suggère que ces derniers ont conservé un phénotype issu d'événements adaptatifs passés qui demeure adéquat dans les conditions actuelles de leur habitat respectif. Cela suppose aussi que les conditions de l'expérimentation n'ont pas permis à tous les clones d'adopter leur stratégie préférentielle, comme l'évitement comportemental.

D'un autre côté, l'absence d'effet du traitement sur l'expression des gènes laisse croire à la fois que celle-ci n'est pas régulée graduellement, mais uniquement à la détection d'un seuil au niveau des stimuli environnementaux, et qu'elle est déjà maximale et/ou optimale en milieu naturel. Encore une fois, les clones présentaient des stratégies différentes en ce qui a trait à l'expression des gènes sélectionnés, certains les exprimant tous très fortement ou inversement. Il existe donc fort probablement un lien entre l'expression de ces gènes et les stratégies de protection et d'évitement alternatives.

Il serait d'ailleurs intéressant d'établir concrètement, dans le futur, les liens qui existent entre les diverses stratégies de réparation, de protection et d'évitement des dommages causés par une exposition au rayonnement solaire, soit entre l'expression des gènes, la mélanisation et l'évitement comportemental, et de constater de leur exclusivité mutuelle.

Malgré le fait que le potentiel adaptatif de la polyploïdie chez les daphnies et que les mécanismes sous-tendant la distribution géographique des clones triploïdes demeurent encore inconnus, cette étude est l'une des rares parmi toutes celles s'étant intéressées à l'effet du rayonnement solaire, plus particulièrement du spectre ultraviolet, sur l'intégrité et les performances des daphnies du complexe *Daphnia pulex* à avoir intégré le niveau de ploïdie dans ses analyses. Elle est aussi l'une des rares à avoir utilisé un simulateur solaire pour effectuer l'exposition, alors que la majorité des études optent pour un fluorescent dont l'émission est limitée au spectre UVB, en plus de s'être intéressé à l'expression de multiples gènes. Les résultats suggèrent cependant que la sélection des polyploïdes en hautes latitudes ne réside pas dans l'expression de leur gène et qu'elle n'affecte pas leur performance globale. Les clones échantillonnés sont donc adaptés depuis un bon moment à l'éventail des conditions de leur milieu. Il n'en demeure pas moins que les daphnies triploïdes ont mieux survécu au traitement que les diploïdes et que l'exposition réalisée ici peut être jugée efficace, justement puisqu'elle a entraîné une hausse importante de la mortalité chez l'ensemble des clones. Les études à venir sur le sujet devront s'intéresser à un nombre de clones nettement supérieur tout en considérant d'autres mécanismes adaptatifs que l'expression des gènes pour expliquer la relation qui existe entre leur distribution géographique et leur niveau de ploïdie.

ANNEXES

**ANNEXE I. DONNEES DE MELANISATION OBTENUES SUR LES DAPHNIES DU COMPLEXE *DAPHNIA PULEX* ECHANTILLONNEES
COMPAREES AUX PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES DE LEUR ETANG D'ORIGINE**

Tableau AI. Données physicochimiques recueillies dans les étangs échantillonnés à Churchill (Manitoba) en juillet 2014 et mélanisation de la carapace par unité de masse (mg/μg) des daphnies en provenance de ces étangs

Identité			Mélanine (mg/μg)	Paramètres physicochimiques					
Numéro	Type d'étang	Clone		pH	Conductivité	Latitude	Longitude	DOC (mg/L)	TDN (mg/L)
1	tundra	T27a	0,778	8,3	500	58,742	266,145	13,367	0,673
2	tundra	T27a	0,897	8,3	500	58,742	266,145	13,367	0,673
3	rockbluff	A35	0,619	9	1370	58,770	266,160	14,007	1,110
4	rockbluff	C90	1,333	8,5	450	58,760	266,133	9,068	0,605
5	rockbluff	C90	0,787	8,5	450	58,760	266,133	9,068	0,605
6	rockbluff	B214	0,587	8,6	310	58,769	266,157	9,359	0,599
7	rockbluff	B214	1,086	8,6	310	58,769	266,157	9,359	0,599
8	rockbluff	B209p	1,176	7,6	130	58,769	266,158	3,262	0,261
9	rockbluff	A21a	0,462	8,8	960	58,770	266,161	8,899	0,703
10	rockbluff	A21a	0,694	8,8	960	58,770	266,161	8,899	0,703

Identité			Mélanine (mg/μg)	Paramètres physicochimiques					
Numéro	Type d'étang	Clone		pH	Conductivité	Latitude	Longitude	DOC (mg/L)	TDN (mg/L)
11	rockbluff	C102	0,664	7,8	80	58,767	266,133	4,994	0,429
12	rockbluff	C102	0,525	7,8	80	58,767	266,133	4,994	0,429
13	rockbluff	B201p	0,052	8,6	180	58,769	266,157	5,014	0,342
14	rockbluff	B201p	0,177	8,6	180	58,769	266,157	5,014	0,342
15	tundra	ByCNSC	0,278	8,3	360	58,737	266,180	10,177	0,593
16	tundra	ByCNSC	0,402	8,3	360	58,737	266,180	10,177	0,593
17	tundra	T160	0,240	8,8	410	58,760	266,147	8,883	0,587
18	tundra	T160	0,403	8,8	410	58,760	266,147	8,883	0,587
19	rockbluff	B272	0,407	8,5	250	58,769	266,157	7,736	0,463
20	rockbluff	B272	0,345	8,5	250	58,769	266,157	7,736	0,463
21	tundra	T153p++	1,086	8,6	288	58,754	266,145	12,440	0,926
22	tundra	T153p++	0,964	8,6	288	58,754	266,145	12,440	0,926
23	rockbluff	C61	0,524	8,0	240	58,759	266,133	8,137	0,447

Identité			Mélanine (mg/µg)	Paramètres physicochimiques					
Numéro	Type d'étang	Clone		pH	Conductivité	Latitude	Longitude	DOC (mg/L)	TDN (mg/L)
24	rockbluff	C61	0,334	8,0	240	58,759	266,133	8,137	0,447
25	rockbluff	A30	0,557	8,6	2000	58,770	266,160	12,913	1,781
26	rockbluff	A30	0,911	8,6	2000	58,770	266,160	12,913	1,781
27	tundra	T153p+	0,692	8,6	288	58,754	266,145	12,440	0,926
28	tundra	T153p+	0,077	8,6	288	58,754	266,145	12,440	0,926
29	tundra	ByRocks	0,527	8,8	510	58,769	266,159	7,288	0,620
30	tundra	ByRocks	0,201	8,8	510	58,769	266,159	7,288	0,620
31	rockbluff	B214p	0,468	8,6	310	58,769	266,157	9,359	0,599
32	rockbluff	B214p	0,155	8,6	310	58,769	266,157	9,359	0,599
33	tundra	T161	0,704	8,4	460	58,758	266,145	6,484	0,466
34	tundra	T161	0,466	8,4	460	58,758	266,145	6,484	0,466
35	tundra	T05p+	0,176	7,9	550	58,739	266,177	10,069	0,549
36	tundra	T05p+	0,419	7,9	550	58,739	266,177	10,069	0,549

Identité			Mélanine (mg/μg)	Paramètres physicochimiques					
Numéro	Type d'étang	Clone		pH	Conductivité	Latitude	Longitude	DOC (mg/L)	TDN (mg/L)
37	rockbluff	C44	0,850	8,5	150	58,758	266,132	7,084	0,634
38	rockbluff	C44	0,716	8,5	150	58,758	266,132	7,084	0,634
39	rockbluff	C01	0,695	8,3	350	58,758	266,132	NA	NA
40	rockbluff	C01	0,269	8,3	350	58,758	266,132	NA	NA
41	rockbluff	C89	0,471	8,6	280	58,759	266,133	9,053	0,508
42	rockbluff	C89	0,328	8,6	280	58,759	266,133	9,053	0,508
43	rockbluff	B201	0,136	8,6	180	58,769	266,157	5,014	0,342
44	rockbluff	B201	0,052	8,6	180	58,769	266,157	5,014	0,342
45	tundra	T56	0,459	7,6	1260	58,753	266,091	9,280	0,609
46	tundra	T56	0,403	7,6	1260	58,753	266,091	9,280	0,609
47	rockbluff	A11p	0,531	8,8	1490	58,769	266,160	9,312	0,959
48	rockbluff	A11p	0,579	8,8	1490	58,769	266,160	9,312	0,959
49	rockbluff	C98	0,467	7,8	450	58,760	266,133	11,993	0,796

Identité			Mélanine (mg/μg)	Paramètres physicochimiques					
Numéro	Type d'étang	Clone		pH	Conductivité	Latitude	Longitude	DOC (mg/L)	TDN (mg/L)
50	rockbluff	C98	0,516	7,8	450	58,760	266,133	11,993	0,796
51	tundra	T20	0,402	8,3	370	58,740	266,162	9,138	0,384
52	tundra	T20	0,348	8,3	370	58,740	266,162	9,138	0,384
53	tundra	T42	0,720	8,6	500	58,740	266,130	NA	NA
54	tundra	T42	0,768	8,6	500	58,740	266,130	NA	NA
55	tundra	T05p	0,630	7,9	550	58,739	266,177	10,069	0,549
56	tundra	T05p	0,701	7,9	550	58,739	266,177	10,069	0,549
57	rockbluff	C35	0,640	8,3	160	58,759	266,133	10,570	0,500
58	rockbluff	C35	0,375	8,3	160	58,759	266,133	10,570	0,500
59	rockbluff	B209	0,517	7,6	130	58,769	266,158	3,262	0,261
60	rockbluff	B209	0,275	7,6	130	58,769	266,158	3,262	0,261
61	tundra	T02	0,439	8,8	360	58,739	266,177	10,407	0,473
62	tundra	T02	0,290	8,8	360	58,739	266,177	10,407	0,473

ANNEXE II. MORTALITE DES DAPHNIES EN FONCTION DU NIVEAU D'IRRADIATION SOUS LE SIMULATEUR SOLAIRE. LE NIVEAU D'IRRADIATION EST TRIBUTAIRE DE LA POSITION DU TUBE SOUS LA LAMPE (ANGLE)

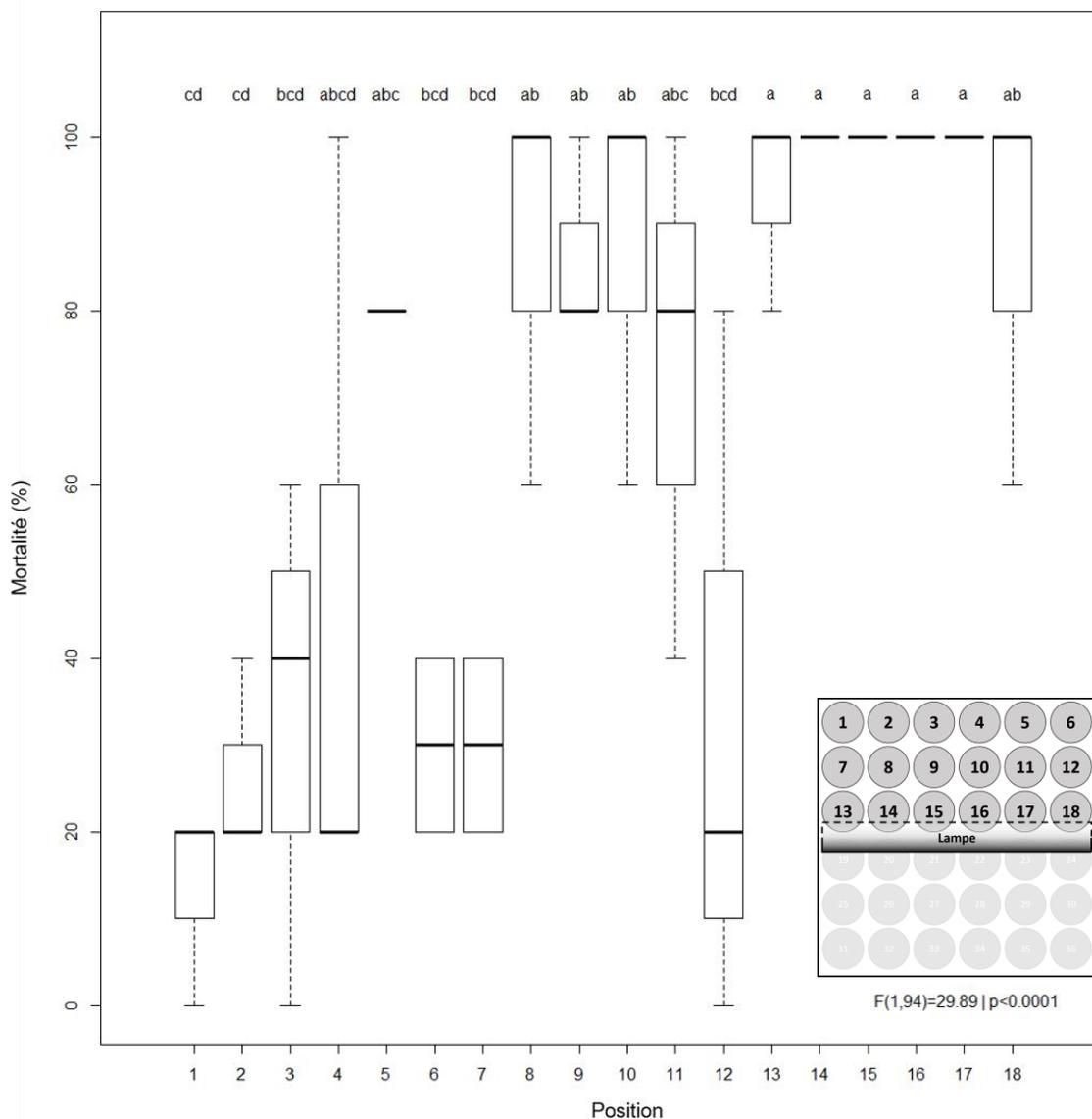


Figure AII.1. Mortalité du clone A07 en fonction de sa position sous la lampe. Les positions forment trois rangées à diverses distances de la lampe (encadré). Les résultats de l'ANOVA et les groupes LSD sont sur le graphique

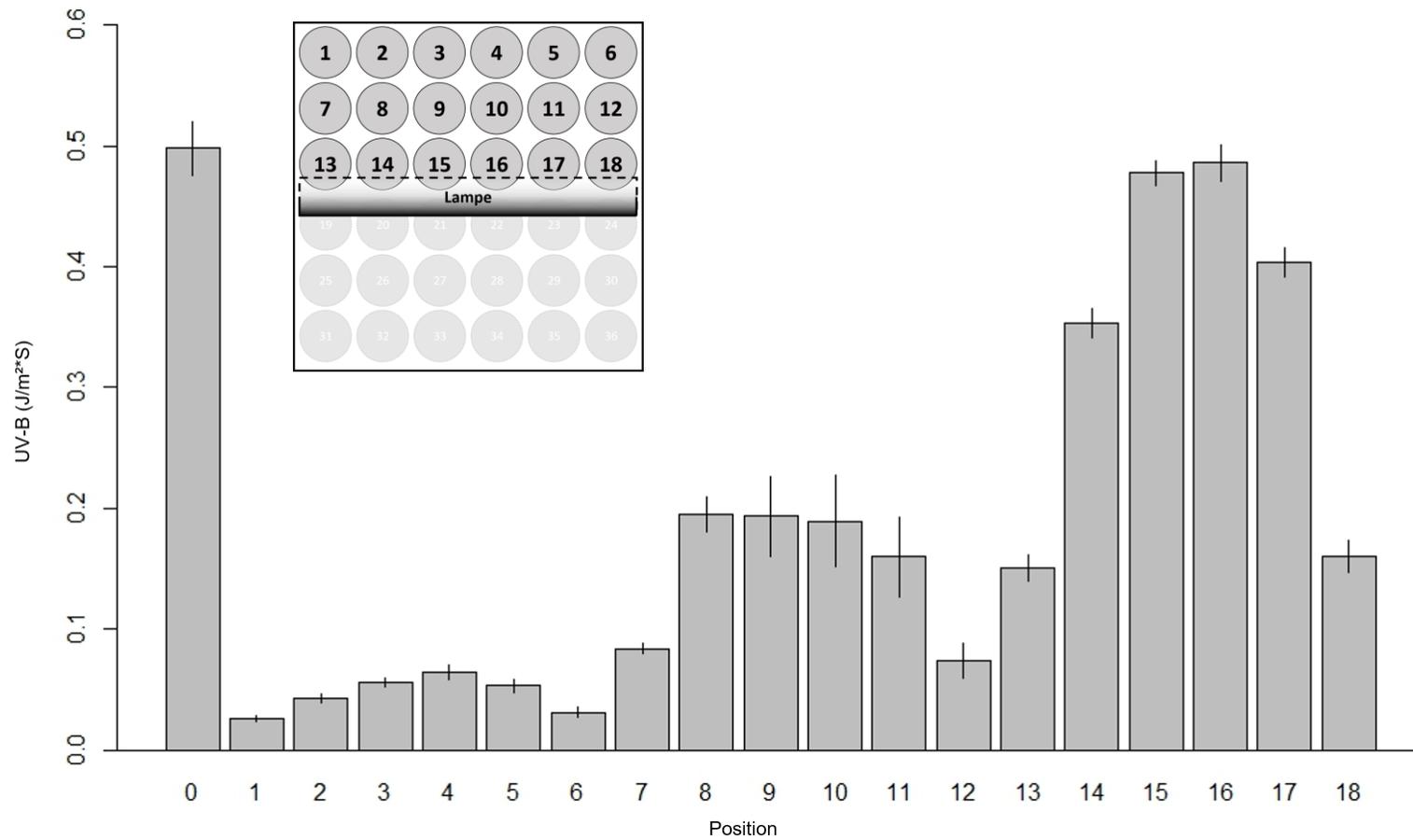


Figure AII.2. Intensité du spectre UVB en fonction de la position sous la lampe. Les positions forment trois rangées à diverses distances de la lampe (encadré)

ANNEXE III. EXPRESSION DES GENES DE REFERENCE UTILISES DANS LE CALCUL DE L'EXPRESSION RELATIVE DES GENES D'INTERET DANS LA REponse DES DAPHNIES AUX UV EN FONCTION DU CLONE ET DU TRAITEMENT D'EXPOSITION (0 ETANT NON EXPOSE ET 1 EXPOSE)

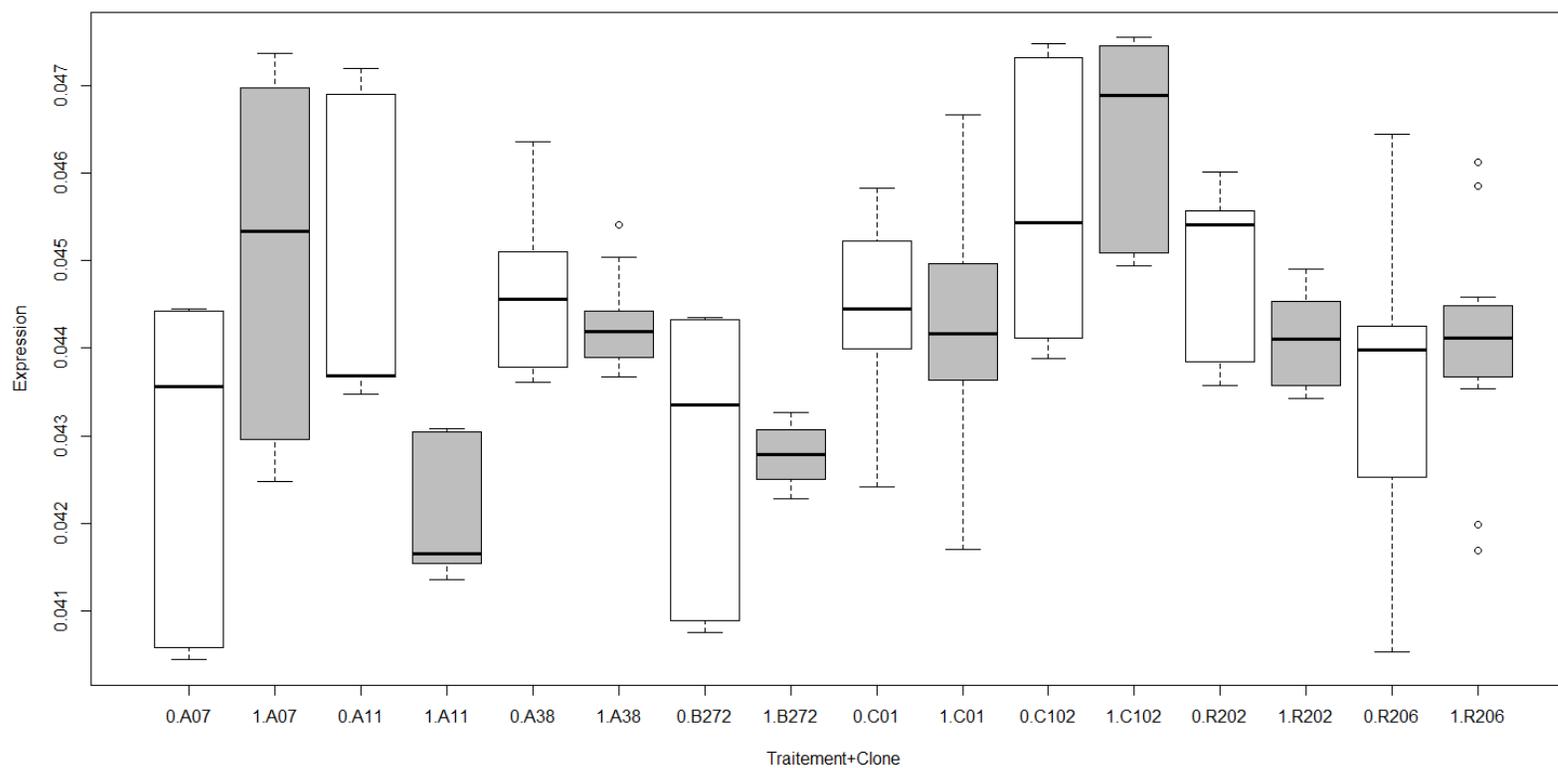


Figure AIII.1. Expression du gène *STX* en fonction du traitement et du clone

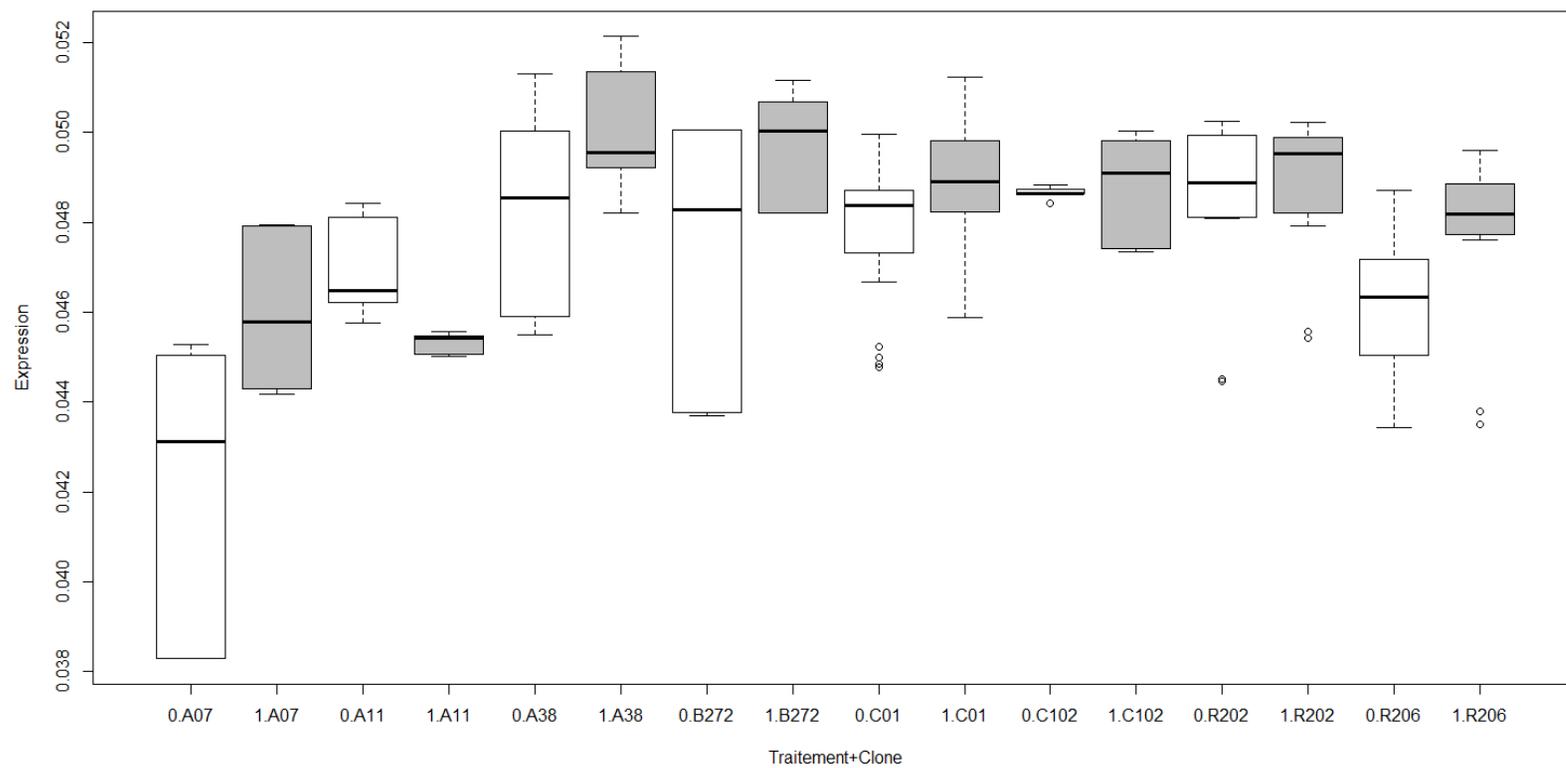


Figure AIII.2. Expression du gène *XBP* en fonction du traitement et du clone

ANNEXE IV. INTENSITE ET DUREE D'EXPOSITION AUX UVB LORS D'EXPERIMENTATIONS DE QUELQUES ETUDES ANTERIEURES SIMILAIRES

Tableau AIV. Recensement des principales informations (intensité, durée, effets) sur les expériences d'exposition aux UV d'études antérieures similaires

Étude	Intensité UVB totale reçue (kJ/m ²)	Durée (heures)
Cette étude	2	24
Miner <i>et al.</i> , 2011 ; 2015	33	12
Huebner <i>et al.</i> , 2013	182	12 jours
Connelly, 2007	160	1
Hebert et Emery, 1990	864	12

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahloowalia, B. S. et M. Maluszynski, 2001. Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* **118**(2): 167-173.
- Allis, C. D., T. Jenuwein et D. Reinberg, 2007. Epigenetics, 1^{ère} éd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 502p.
- Auld, J. R., A. A. Agrawal et R. A. Relyea, 2010. Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proc. Biol. Sci.* **277**: 503-511.
- Bais, A.F., K. Tourpali, A. Kazantzidis, H. Akiyoshi, S. Bekki, P. Braesicke, M. P. Chipperfield, M. Dameris, V. Eyring, H. Garny, D. Iachetti, P. Jöckel, A. Kubin, U. Langematz, E. Mancini, M. Michou, O. Morgenstern, T. Nakamura, P. A. Newman, G. Pitari, D. A. Plummer, E. Rozanov, T. G. Shepherd, K. Shibata, W. Tian et Y. Yamashita, 2011. Projections of UV radiation changes in the 21st century: Impact of ozone recovery and cloud effects. *Atmos. Chem. Phys.* **11**: 7533-7545.
- Beaton, M. J. et p. D. N. Hebert, 1988. Geographical parthenogenesis and polyploidy in *Daphnia pulex*. *Am. Nat.* **132**: 837-845.
- Beatty, R. A., 1957. Parthenogenesis and Polyploidy in Mammalian Development, 1^{ère} éd., Cambridge University Press, Cambridge, 144p.
- Bogart, J. P., R. P. Elinson, L. E. Licht, 1989. Temperature and sperm incorporation in polyploid salamanders. *Science* **246**: 1032-1034.
- Bonasio, R., S. Tu et D. Reinberg, 2010. Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* **330**: 612-616.
- Burdige, D. J. et J. Homstead, 1994. Fluxes of dissolved organic carbon from Cheasepeake Bay sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **58**: 3407-3424.
- Cavalier-Smith, T., 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of DNA C-value paradox. *J. Cell. Sci.* **34**: 247-278.

- Choi, J. H., A. Besaratinia, D. H. Lee, C. S. Lee et G. P. Pfeifer, 2006. The role of DNA polymerase ι in UV mutational spectra. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **599**: 58-65.
- Colbourne, J. K. et P. D. Hebert, 1996. The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philos. T. Roy. Soc. B* **351(1337)**: 349-360.
- Colbourne, J. K., B. Robison, K. Bogart et M. Lynch, 2004. Five hundred and twenty-eight microsatellite markers for ecological genomic investigations using *Daphnia*. *Mol. Ecol. N.* **4**: 485-490.
- Connelly, S. J., 2007. Effects of Ultraviolet Radiation (UVR) Induced DNA Damage and Other Ecological Determinants on cryptosporidium Parvum, Giardia Lamblia, and *Daphnia* spp. in Freshwater Ecosystems. Thèse de doctorat. Miami University, Miami, 132p.
- Cornai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 836-846.
- Crease, T. J., A. R. Omilian, K. S. Costanzo, et D. J. Taylor, 2012. Transcontinental phylogeography of the *Daphnia pulex* species complex. *PLoS One* **7(10)**: 1-11
- Crispo, E., 2007. The Baldwin Effect and Genetic Assimilation: Revisiting Two Mechanisms of Evolutionary Change Mediated By Phenotypic Plasticity. *Evolution.* **61**: 2469-2479.
- Darzynkiewicz, Z., F. Traganos, H. Zhao, H. D. Halicka, J. Skommer et D. Wlodkowic, 2011. Analysis of individual molecular events of DNA damage response by flow and image assisted cytometry. *Methods in cell biology* **103**: 115-147.
- DeWitt, T. J., A. Sih, et D. S. Wilson, 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* **13**: 77-81.
- Dionne, K., C. Jose, A. Caron et F. Dufresne, 2017. Association between clonal diversity and species diversity in subarctic zooplankton communities. *J. Plankton Res.* **39(2)**: 232-245.
- Dionne, K., R. Vergilino, F. Dufresne, F. Charles et C. Nozais, 2011. No Evidence for Temporal Variation in a Cryptic Species Community of Freshwater Amphipods of the *Hyalella azteca* Species Complex. *Diversity* **3(3)**: 390-404.

- Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth et J. F. Crow, 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**: 1667-1686.
- Dufresne, F. et P. D. Hebert, 1994. Hybridization and origins of polyploidy. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* **258(1352)**: 141-146.
- Dufresne, F. et P. D. Hebert, 1998. Temperature-related differences in life-history characteristics between diploid and polyploid clones of the *Daphnia pulex* complex. *Ecoscience*, **5(4)**: 433-437.
- Fankhauser, G., 1945. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Q. Rev. Biol.* **20**: 20-78.
- Galbraith D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma, E. Firoozabady, 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**: 1049-1051.
- Grad, G., C. E. Williamson et D. M. Karapelou, 2001. Zooplankton survival and reproduction responses to damaging UV radiation: a test of reciprocity and photoenzymatic repair. *Limnol. Oceanogr.* **46(3)**: 584-591.
- Hebert, P. D. et D. B. McWalter, 1983. Cuticular pigmentation in arctic *Daphnia*: adaptive diversification of asexual lineages? *Am. Nat.* **122(2)**: 286-291.
- Hebert, P. D. N., 1987. Genotypic characteristics of the Cladocera. *Hydrobiologia* **145**: 183-193.
- Hebert, P. D. N., et C. J. Emery, 1990. The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Funct. Ecol.* **4**: 703-710.
- Hessen, D. O., 1996. Competitive trade-off strategies in Arctic *Daphnia* linked to melanism and UVB stress. *Polar Biol.* **16**: 573-579.
- Hessen, D. O., et K. Sørensen, 1990. Photoprotective pigmentation in alpine zooplankton populations. *Aqua Fennica* **20(2)**: 165-170.
- Hessen, D. O., J. Borgeraas et J. B. Ørbæk, 2002. Responses in pigmentation and antioxidant expression in Arctic *Daphnia* along gradients of DOC and UV exposure. *J. Plankton Res.* **24**: 1009-1017.
- Hessen, D. O., J. Borgeraas, K. Kessler et U. H. Refseth, 1999. UV-B susceptibility and photoprotection of Arctic *Daphnia* morphotypes. *Polar Res.* **18(2)**: 345-352.

- Huebner, J. D., N. L. Loadman, M. D. Wiegand, E. Huebner, D. J. Palitsky et W. H. Husarewycz, 2013. UVB radiation affects growth, reproduction and tissue structure of *Daphnia magna* across several temperatures. *Photochem. Photobiol.* **89**: 103-110.
- Hwang, D. S., J. S. Lee, J. S. Rhee, J. Han, Y. M. Lee, I. C. Kim, G. S. Park, J. Lee et J. S. Lee, 2010. Modulation of p53 gene expression in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to alkylphenols. *Mar. Environ. Res.* **69**: S77-S80.
- Ikehata, H. et T. Ono, 2011. The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res.* **52**: 115-125.
- Karp, G. C., 2004. Biologie cellulaire et moléculaire, 2^e éd., Bruxelles, De Boeck, 850p.
- Kawecki, T. J. et D. Ebert, 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* **7**: 1225-1241.
- Kihara, H., T. Ono, 1926. Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **4**:475-81.
- Kilham, S. S., D. A. Kreeger, S. G. Lynn, C. E. Goulden et L. Herrera, 1998. COMBO: A defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147-159.
- Laforsch, C. et R. Tollrian, 2004. Inducible defenses in multipredator environments: cyclomorphosis in *Daphnia cucullata*. *Ecology* **85(8)**: 2302-2311.
- Leach, T. H., C. E. Williamson, N. Theodore, J. M. Fischer, et M. H. Olson, 2015. The role of ultraviolet radiation in the diel vertical migration of zooplankton: an experimental test of the transparency-regulator hypothesis. *J. Plankton Res.* **0(0)**: 1-11.
- Levin, D. A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *Am. Nat.* **122**: 1-25.
- Lewis, W. H., 1980. Polyploidy: Biological Relevance, 1^{ère} éd, Springer, New York, 583p.
- Little, J. W., 2005. Threshold effects in gene regulation: When some is not enough. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **102(15)**: 5310-5311.
- Livak, K. J. et T. D. Schmittgen, 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* **25**: 402-408.

- Lokki, J. et A. Saura, 1980. Polyploidy in insect evolution. Dans W. H. Lewis, (éd) Polyploidy: Biological Relevance, 1^{ère} éd, Springer, New York, p. 277-312.
- Luecke, C. et W. J. O'Brien, 1981. Phototoxicity and fish predation: selective factors in color morphs in *Heterocope*. *Limnol. Oceanogr.* **26**: 454-460.
- Lüning, J., 1992. Phenotypic plasticity of *Daphnia pulex* in the presence of invertebrate predators: morphological and life history responses. *Oecologia* **92(3)**: 383-390.
- Lynch, M. et B. Walsh 1998. Genetics and Analysis of Quantitative Traits, OUP USA Sinauer Associates, Sinauer, 980p.
- Lynch, M., 1984. Destabilizing hybridization, general purpose phenotypes and geographic parthenogenesis. *Q. Rev. Biol.* **59**: 257-290.
- Lynch, M., 1987. Destabilizing hybridization, general pupose phenotypes and geographic parthenogenesis. *Q. Rev. Biol.* **59**: 257-290.
- Lynch, M., et R. Ennis, 1983. Resource availability, maternal effects, and longevity. *Experimental Gerontology* **18**: 147-165.
- MacFadyen, E. J., C. E. Williamson, G. Grad, M. Lowery, W. H. Jeffrey et D. L. Mitchell, 2004. Molecular response to climate change: Temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulicaria*. *Glob. Chang. Biol.* **10**: 408-416.
- Martins M. J., M. J. Collares-Pereira, I. G. Cowx et M. M. Coelho, 1998. Diploids v. triploids of *Rutilus alburnoides*: spatial segregation and morphological differences. *J. Fish Biol.* **52**:817-828.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**: 421-423.
- McKenzie, R. L., P. J. Aucamp, A. F. Bais, L. O. Björn, M. Ilyas et S. Madronich, 2011. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**: 182-198.
- Miner, B. E. et B. Kerr, 2011. Adaptation to local ultraviolet radiation conditions among neighbouring *Daphnia* populations. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* **278(1710)**: 1306-1313.

- Miner, B. E., P. M. Kulling, K. D. Beer et B. Kerr, 2015. Divergence in DNA photorepair efficiency among genotypes from contrasting UV radiation environments in nature. *Mol. Ecol.* **24(24)**: 6177-6187
- Miner, B. E., R. A. Knapp, J. K. Colbourne et M. E. Pfrender, 2013. Evolutionary history of alpine and subalpine *Daphnia* in western North America. *Freshw. Biol.* **58**: 1512-1522.
- Morris, D. P., H. Zagarese, C. E. Williamson, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. Modenutti, R. Moeller et C. Queimalinos, 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1381-1391.
- Mostajir, B., S. Demers, S. de Mora, C. Belzile, J. P. Chanut, M. Gosselin, S. Roy, P. Z. Villegas, J. Fauchot, J. Bouchard, D. Bird, P. Monfort, M. Levasseur, 1999. Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnol. Oceanogr.* **44(3)**: 586-596.
- Otto, S. P. et J. Whitton, 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **34(1)**: 401-437.
- Paquin, C. E. et J. Adams, 1983. Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations. *Nature* **302**:495-500.
- Peddie, C. M., C. R. Wolf, L. I. McLellan, A. R. Collins, et D. T. Bowen, 1997. Oxidative DNA damage in CD34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumour necrosis factor- α concentration. *Brit J Haematol* **99(3)**: 625-631.
- Pereira, J. L. et F. Gonçalves, 2008. *Daphnia* fitness over a food gradient: is body size the single trait predicting exploitative ability? *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* **44(3)**: 169-179.
- Pfeifer, G. P., Y.-H. You et A. Besaratinia, 2005. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.* **571**: 19-31.
- Ramsey, J., et D. W. Schemske, 1998. Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**: 467-501.
- Ratté, T., 2011. Effet de la polyploïdie sur les capacités métaboliques de clines subarctiques du complexe *Daphnia pulex*. Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Rimouski, Rimouski, 66p.

- Rautio, M. et A. Korhola, 2002. UV-induced pigmentation in subarctic *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 295-299.
- Rees, D. J., F. Dufresne, H. Glémet et C. Belzile, 2007. Amphipod genome sizes: first estimates for Arctic species. *Genome* **50**: 151-158.
- Renzing, J., S. Hansen et D. P. Lane, 1996. Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *Journal of cell science* **109(5)**: 1105-1112.
- Rheinsmith, E. L., R. Hinegardner et K. Bachmann, 1974. Nuclear DNA amounts in Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* **48B**: 343-348.
- Rhode, S. C., M. Pawlowski et R. Tollrian, 2001. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature* **412(6842)**: 69-72.
- Ribeiro, F., N. C. G. Ferreira, A. Ferreira, A. M. V. M. Soares, et S. Loureiro, 2011. Is ultraviolet radiation a synergistic stressor in combined exposures? The case study of *Daphnia magna* exposure to UV and carbendazim. *Aquat. Toxicol.* **102**: 114–122.
- Richards, C. L., K. J. F. Verhoeven et O. Bossdorf, 2012. Evolutionary Significance of Epigenetic Variation. Dans J. **Wendel**, J. **Greilhuber**, J. **Dolezel** et I. J. **Leitch** (éds) *Plant Genome Diversity*, Volume 1, 1^{ère} éd, Springer, Berlin, p. 83-101.
- Rose, K. C., C. E. Williamson, J. M. Fischer, S. J. Connelly, M. Olson, A. J. Tucker et D. A. Noe, 2012. The role of ultraviolet radiation and fish in regulating the vertical distribution of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **57(6)**: 1867-1876.
- Schlichting, C. D. et M. A. Wund, 2014. Phenotypic Plasticity and Epigenetic Marking: an Assessment of Evidence for Genetic Accommodation. *Evolution* **68**: 656-672.
- Schumpert, C. A., J. L. Dudycha et R. C. Pate, 2015. Development of an efficient RNA interference method by feeding for the microcrustacean *Daphnia*. *BMC Biotechnol.* **15(1)**: 1-13.
- Schumpert, C. A., J. L. Dudycha et R. C. Patel, 2015. Development of an efficient RNA interference method by feeding for the microcrustacean *Daphnia*. *BMC Biotechnology* **15(1)**: 91-103.
- Scoville, A. G. et M. E. Pfrender, 2010. Phenotypic plasticity facilitates recurrent rapid adaptation to introduced predators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 4260-4263.

- Spanier, K. I., F. Leese, C. Mayer, J. K. Colbourne, D. Gilbert, M. E. Pfrender, et R. Tollrian, 2010. Predator-induced defences in *Daphnia pulex*: Selection and evaluation of internal reference genes for gene expression studies with real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, **11(1)**: 50-60.
- Spitze, K., 1992. Predator-mediated plasticity of prey life history and morphology: Chaoborus americanus predation on *Daphnia pulex*. *Am. Nat.* **139(2)**: 229-247.
- Stebbins G. L., 1950. Variation and Evolution in Plants. *Science* **112 (2921)**: 764-766.
- Stebbins G. L., 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants, University Park Press, London, 220p.
- Stebbins, G. L., 1980. Polyploidy in plants: Unsolved problems and prospects. Dans W. H. Lewis, (éd) Polyploidy: Biological Relevance, 1^{ère} éd, Springer, New York, p. 495-520.
- Sucré, E., F. Vidussi, B. Mostajir, G. Charmantier et C. Lorin-Nebel, 2012. Impact of ultraviolet-B radiation on planktonic fish larvae: Alteration of the osmoregulatory function. *Aquat. Toxicol.* **109**: 194-201.
- Tang, S., 2013. Toxicity of cadmium quantum dots compared to cadmium and zinc ions in zebrafish (*Danio rerio*) and water flea (*Daphnia pulex*). Thèse de doctorat. *Texas Tech University*, Lubbock, 150p.
- te Beest, M., J. J. Le Roux, D. M. Richardson, A. K. Brysting, J. Suda, M. Kubešová et P. Pyšek, 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann. Bot.-London* **109**: 19-45.
- Tollrian, R. et C. Heibl, 2004. Phenotypic plasticity in pigmentation in *Daphnia* induced by UV radiation and fish kairomones. *Funct. Ecol.* **18(4)**: 497-502.
- Vergilino, R., C. Belzile et F. Dufresne, 2009. Genome size evolution and polyploidy in the *Daphnia pulex* complex (Cladocera: Daphniidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **97**: 68-79.
- Vonk, J. E., S. E. Tank, W. B. Bowden, I. Laurion, W. F. Vincent, P. Alekseychik, M. Amyot, M. F. Billet, J. Canário, R. M. Cory, B. N. Deshpande, M. Helbig, M. Jammet, J. Karlsson, J. Larouche, G. MacMillan, M. Rautio, K. M. Walter Anthony, et K. P. Wickland, 2015. Reviews and syntheses: Effects of permafrost thaw on Arctic aquatic ecosystems. *Biogeosciences* **12**: 7129-7167

- Weider, L. J., A. Hobæk, P. D. Hebert et T. J. Crease, 1999. Holarctic phylogeography of an asexual species complex—II. Allozymic variation and clonal structure in Arctic *Daphnia*. *Mol. Ecol.* **8(1)**: 1-13.
- Weider, L. J., D. Frisch et P. D. N. Hebert, 2010. Long-term changes in metapopulation genetic structure: a quarter-century retrospective study on low-Arctic rock pool *Daphnia*. *Proc. R. Soc. B* **277**: 139-146.
- Weider, L. J., M. J. Beaton et P. D. N. Hebert, 1987. Clonal diversity in high-arctic populations of *Daphnia pulex*, a polyploid apomictic complex. *Evolution* **41**: 1335-1346.
- West-Eberhard, M. J., 2003. Developmental plasticity and evolution, 1^{ere} éd., Oxford University Press, Oxford, 816p.
- West-Eberhard, M., 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Natl. Acad. Sci.* **102**: 6543-6549.
- Williamson, C. E., P. J. Neale, G. Grad, H. J. De Lance et B. R. Hargreaves, 2001. Beneficial and detrimental effects of UV on aquatic organisms: Implications of spectral variation. *Ecol. Appl.* **11(6)**: 1843-1857.
- Yampolsky, L. Y., T. karpM. M. Schaer et D. Ebert, 2014. Adaptive phenotypic plasticity and local adaptation for temperature tolerance in freshwater zooplankton. *Proc. Biol. Sci.* **281**: 20132744.
- Zellmer, I. D., 1995. UVB tolerance of alpine and arctic *Daphnia*. *Hydrobiologia* **307**: 153-159.
- Zepp, R. G., D. J. Erickson III, N. D. Paul, et B. Sulzberger, 2011. Effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**: 261-279.

