



**Effets de l'accumulation de mutations sur la valeur adaptative et
les fonctions mitochondriales de *Daphnia pulex* élevées en
milieux bénin et contaminé au cuivre**

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

© FRÉDÉRIQUE PAQUIN

Avril 2019

Composition du jury :

Pierre Blier, président du jury, Université du Québec à Rimouski

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

Hélène Lemieux, codirectrice de recherche, University of Alberta

Nicolas Pichaud, examinateur externe, Université de Moncton

Dépôt initial le 25 octobre 2018

Dépôt final le 1^{er} avril 2019

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 Baptiste. Ton regard curieux sur le monde, ton esprit scientifique et tes innombrables questions sont mes plus précieux encouragements.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier France Dufresne qui a su m'encadrer et me guider dans ce long parcours de maîtrise. Merci de m'avoir proposé ce projet qui me permettait d'aborder des questions environnementales et toxicologiques tout en ouvrant mes horizons à de formidables questions génétiques et évolutives. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné les moyens de m'approprier ce projet, tout en étant toujours là pour baliser mon travail. Merci pour les précieux échanges d'idées, tes encouragements et ta patience.

Merci à Hélène Lemieux qui, bien que physiquement éloignée, a su être présente et m'accompagner dans mon travail. Tes judicieux conseils m'ont permis de progresser rapidement et en toute confiance dans les délicates analyses de respiration mitochondriale. Ton amour des mitochondries est contagieux! Merci également à Pierre Blier pour les discussions toujours enrichissantes qui m'ont souvent permis de reprendre le fil de mes idées ou de trouver de nouvelles pistes à explorer. Merci à Félix, Enrique, Bernard et Véronique d'avoir généreusement partagé avec moi vos protocoles, conseils et autres petits trucs qui m'ont aidé dans mes expériences et mes analyses.

Je veux aussi remercier Melania Cristescu qui m'a permis d'utiliser des daphnies de ses lignées d'accumulation de mutations. Mon travail n'aurait été possible sans l'accès à ce formidable design expérimental. Merci aussi aux étudiants de son laboratoire qui m'ont formé pour l'entretien des daphnies et m'ont partagé leurs résultats.

Merci au Conseil National de Recherche du Canada (CRSNG), au Fonds de Recherche Nature et Technologies du Québec (FRQNT) et à la Fondation de l'UQAR qui ont rendu ce projet possible grâce à leur soutien financier.

Et un dernier merci tout spécial à Guillaume pour son soutien moral. Ta présence dans ma vie me rend simplement plus heureuse.

RESUME

La majorité des mutations spontanées ont des effets délétères et les impacts négatifs de l'accumulation de mutations sur la valeur adaptative sont bien documentés. Toutefois il y a peu d'information sur l'effet des stress environnementaux sur les taux de mutations ainsi que sur l'expression phénotypique de ces mutations. De plus, les effets des mutations spontanées ont surtout été mesurés sur des traits complexes liés à la valeur adaptative. Les effets des mutations sur les traits physiologiques plus spécifiques restent peu connus. Une meilleure connaissance de ces impacts pourrait améliorer notre compréhension de la relation génotype-phénotype. Les impacts des mutations sur les mitochondries méritent un intérêt particulier en raison des rôles cruciaux de ces organites dans de nombreuses fonctions cellulaires et de la plus grande sensibilité de leur ADN (ADNmt) aux mutations. La présente étude avait comme objectifs de 1) mesurer les effets de l'accumulation de mutations sur les traits liés à la valeur adaptative et sur les fonctions mitochondriales, 2) tester les impacts de l'exposition au cuivre durant le processus d'accumulation de mutations sur ces effets phénotypiques des mutations, 3) déterminer si un stress thermique exacerbe l'effet des mutations sur les traits mesurés. Pour ce faire, j'ai mesuré et comparé les effets de l'accumulation de mutations (MA) sur les traits d'histoire de vie et les fonctions mitochondriales chez des *Daphnia pulex* issues de lignées MA élevées en milieux bénin ou contaminé au cuivre. Les traits phénotypiques ont été mesurés à températures optimale et stressante. Nos résultats montrent que l'exposition au cuivre durant le processus d'accumulation de mutations conduit à une augmentation des impacts négatifs sur les traits d'histoire de vie des daphnies et que ces effets sont exacerbés en conditions thermiques stressantes. Les taux de respiration mitochondriale des deux traitements de lignée MA étaient réduits de manière similaire d'environ 10% par rapport au contrôle. Notre étude est la première à démontrer de manière empirique la sensibilité des mitochondries à l'accumulation de mutations délétères. Mes résultats suggèrent par ailleurs que les impacts mutationnels sur les mitochondries pourraient être atténués par l'activation de mécanismes compensatoires comme la modulation du nombre de copies d'ADNmt par cellule, mais que ces processus compensatoires pourraient être réduits en conditions stressantes.

Mots clés : accumulation de mutations, traits d'histoire de vie, mitochondries, cuivre, stress environnemental, daphnies, ADN mitochondrial

ABSTRACT

Most spontaneous mutations are known to be deleterious and the negative consequences of mutation accumulation on fitness are well documented. Yet few information is available on the extent to which environmental stressors increase mutation rate and impact the phenotypic expression of mutations. In addition, the effects of spontaneous mutations have mainly been measured on complex traits related to fitness and little is known about their impacts on specific physiological traits. A better understanding of these impacts could help bridge the gap between genotype and phenotype. The impacts on mitochondria are of particular concern given their crucial roles in many cellular functions and the known susceptibility of their DNA (mtDNA) to mutations. The objectives of this study were to 1) to measure the effects of spontaneous mutations on fitness traits and mitochondrial functions, 2) test the extent to which exposure to an environmental contaminant such as copper affects the phenotype of organisms through mutation accumulation, 3) to quantify the changes in the phenotypic effects of mutations upon exposure to thermal stress. To answer these questions, the effects of mutations accumulation (MA) on both life history and mitochondrial traits in *Daphnia pulex* MA lines raised under benign or copper-contaminated conditions were measured and compared. Phenotypic traits were assayed under optimal and stressful thermal conditions. Our results showed that copper exposure during the mutation accumulation experiment increased the deleterious impacts of mutations on life history traits and that high temperature exacerbated most of the negative fitness impacts. Mitochondrial respiration rates of both MA lines treatments were similarly reduced by ~10% compared to controls. Our study is the first to empirically show the alleged sensitivity of mitochondria to mutational load. My results also suggest that activation of compensatory mechanisms such as modulation of mtDNA content could mitigate the mitochondrial mutational impacts. However, these compensatory processes could be reduced under stressful conditions.

Keywords: mutation accumulation, life history traits, mitochondria, copper, environmental stress, daphnia, mitochondrial DNA

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ.....	vi
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xvi
LISTE DES SYMBOLES	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 Effets des mutations spontanées sur la valeur adaptative de <i>Daphnia pulex</i> élevées en milieux bénin et contaminé au cuivre	26
1.1 INTRODUCTION	26
1.2 MATERIEL ET METHODES	30
1.2.1 Expérience d'accumulation de mutations et contrôle avec compétition.....	30
1.2.2 Expérience sur les traits d'histoire de vie	31
1.2.3 Analyse des données.....	33
1.3 RESULTATS	36
1.3.1 Impacts du traitement d'accumulation de mutations en milieu bénin sur les traits d'histoire de vie et la valeur adaptative	36
1.3.2 Impacts du traitement d'accumulation de mutations en présence de cuivre sur les traits d'histoire de vie et la valeur adaptative	39

1.3.3	Impacts des traitements d'accumulation de mutation sur la plasticité thermique	41
1.4	DISCUSSION	46
1.4.1	Effets phénotypiques des mutations accumulées en milieu bénin	46
1.4.2	Effets phénotypiques des mutations accumulées en présence de cuivre	49
1.4.3	Effets du stress thermique sur l'expression phénotypique des mutations	51
1.4.4	Conclusions	55
CHAPITRE 2 Effets des mutations spontanées sur les fonctions mitochondriales de <i>Daphnia pulex</i> élevées en milieux bénin et contaminé au cuivre.....		
2.1	INTRODUCTION.....	57
2.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	62
2.2.1	Animaux.....	62
2.2.2	Mesure de la respiration mitochondriale.....	63
2.2.3	Quantification des protéines.....	65
2.2.4	Activité de la citrate synthase	65
2.2.5	Mesure du ratio ADN _{mt} /ADN _n	66
2.2.6	Analyse des données	68
2.3	RÉSULTATS.....	69
2.3.1	Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur l'OXPPOS	69
2.3.2	Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur le contenu mitochondrial	75
2.3.3	Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur le ratio ADN _{mt} /ADN _n	75
2.3.4	Impacts des traitements d'accumulation de mutation sur la plasticité du ratio ADN _{mt} /ADN _n	78
2.4	DISCUSSION.....	80
2.4.1	Taux de respiration mitochondriale plus faible au sein des traitements d'accumulation de mutations.....	80

2.4.2	L'exposition au cuivre n'affecte pas le taux de respiration mitochondriale des daphnies ayant accumulé des mutations	83
2.4.3	La distribution des effets mutationnels et/ou des mécanismes de compensation pourraient expliquer la faible variabilité génétique	84
2.4.4	La réponse compensatoire mitochondriale aux mutations délétères pourrait être limitée face à un niveau de stress trop élevé	85
2.4.5	Conclusion	87
CONCLUSION GÉNÉRALE		88
ANNEXE I		97
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Moyennes \pm écarts types, variances génétiques (inter-lignées, V_L), coefficients de variation génétique (CV_L) et variances environnementales (intra-lignées, V_e) des traits d'histoire de vie des daphnies issues de trois différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu) à 18°C et 27°C.....	39
Tableau 2 : Corrélations génétiques entre les deux environnements thermiques (18°C et 27°C). Les résultats sont présentés comme le coefficient de corrélation de Spearman entre les moyennes des lignées ou isolats pour chaque traitement évolutif. Les corrélations significatives sont en gris dans le tableau.	42
Tableau 3 : Valeurs de p des analyses de plasticité thermique des traits d'histoire de vie des lignées à l'intérieur de chacun des traitements évolutifs. Une interaction significative ($p < 0,05$) indique des différences entre les réponses plastiques des lignées d'un traitement. Les résultats du F-test (valeurs de p) indiquent si les variances inter-lignées entre les deux températures sont significativement différentes ($p < 0,05$) ou non pour chaque variable de chaque traitement évolutif.	46
Tableau 4 : Valeurs moyennes des mesures de couplage de l'OXPPOS ($R_{CR_{CI}}$ et FCR du stade N-LEAK) et de l'effet du cytochrome <i>c</i> chez les daphnies entières perméabilisée (\pm erreur type).....	70
Tableau 5 : Moyennes \pm écarts types, variances génétiques (V_L), variances environnementales (V_e) et coefficients de variation génétique (CV_L) des variables mitochondriales chez les daphnies issues des différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et Ma Cu).	73
Tableau 6 : Moyennes \pm écarts types, variances génétiques (V_L), coefficients de variation génétique (CV_L) et variances environnementales (V_e) des ratios ADNmt/ADNn des daphnies issues de trois différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu).	77
Tableau 7 : Valeurs de p des analyses de variance effectuées pour tester la plasticité thermique du ratio ADNmt/ADNn des lignées à l'intérieur de chacun des traitements	

évolutifs. Une interaction G x E significative ($p < 0,05$) indique des différences entre les réponses plastiques des lignées d'un traitement. Les résultats du F-test (valeurs de p) indiquent si les variances inter-lignées entre les deux températures sont significativement différentes ($p < 0,05$). 79

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Expérience d'accumulation de mutations chez les *D. pulex* se reproduisant de façon asexuée. Les descendants d'un ancêtre commun ont été utilisés pour fonder 50 lignées MA Ctrl et 50 lignées MA Cu. Les nouvelles mutations spontanées (représentées par les traits colorés) se sont accumulées de façon indépendante dans chaque lignée pendant environ 124 générations. Les descendants de dix lignées de chacun des traitements ainsi que dix individus issus du contrôle non-MA ont ensuite été échantillonnés pour évaluer les traits phénotypiques. Avant de procéder aux tests phénotypiques, ces descendants ont été acclimatés pendant deux générations aux conditions du nouveau laboratoire. La majorité des traits phénotypiques ont été testés en conditions thermiques optimales (18°C) et stressante (27°C), à l'exception de la respiration mitochondriale qui a uniquement été testée à 27°C (voir Chapitre 2). Figure adaptée de Halligan et Keightley 2009.....32
- Figure 2 : Traits d'histoire de vie des daphnies issues des différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu; moyennes \pm erreurs types). Les traits d'histoire de vie ont été mesurés en conditions thermiques optimale (A) et stressante (B). Pour chaque combinaison de traits et de conditions thermiques, les groupes significativement différents entre eux sont identifiés par des lettres différentes (Tukey HSD).37
- Figure 3 : Traits d'histoire de vie (moyenne \pm erreur type) pour chacune des lignées MA de daphnies élevées à 18°C (A, C, E) et 27°C (B, D, F). Les lignées C14 à C38 ont accumulé des mutations en milieu bénin (MA Ctrl) et les lignées C251 à C300 ont accumulé des mutations en milieu enrichi de cuivre (MA Cu). Les lignes pointillées bleues représentent la moyenne \pm l'erreur type des isolats contrôles non-MA. Une plus grande taille moyenne de portée, une première reproduction plus hâtive et une valeur adaptative plus grande que la moyenne des contrôles sont considérées comme des changements ayant des impacts «bénéfiques» pour les daphnies alors que l'inverse est considéré comme des changements dont les impacts sont «négatifs». Les lignées dont la moyenne diffère significativement de la moyenne des isolats contrôles non-MA sont marquées d'un * (test de Dunnett, $p < 0,05$).38

Figure 4 : Plasticité thermique de l'âge moyen à la première portée des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes (n = 8) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture.	43
Figure 5 : Plasticité thermique de la taille moyenne de portée (portée 2 à 5) des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes (n = 8) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture.	44
Figure 6 : Plasticité thermique de la valeur adaptative des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes (n = 8) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture.	45
Figure 7 : Moyennes ± erreurs types des taux de respiration mitochondriale mesurés sur des daphnies entières perméabilisées issues des trois différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu). Les taux de respirations ont été mesurés à 27°C. Pour chaque stade de respiration, les groupes significativement différents entre eux sont identifiés par des lettres différentes (Tukey HSD).	72
Figure 8 : Moyennes ± erreurs types de l'activité de la citrate synthase (CS) et du taux de respiration du complexe IV (CIV) mesurés à 27°C sur des daphnies issues des trois différents traitements évolutifs.	74
Figure 9 : Quantité relative d'ADNmt par copie d'ADNn chez des daphnies issues des trois traitements évolutifs. L'ADN a été dosé chez des daphnies élevées en conditions thermiques standard (A) et stressante (B). Le ratio ADNmt/ADNn est exprimé sous la forme du $2^{\Delta Ct}$ et les résultats sont présentés comme la moyenne ± erreur type. Pour chaque température, les groupes significativement différents entre eux (Tukey HSD) sont identifiés par des lettres différentes.	76
Figure 10 : Ratios ADNmt/ADNn pour chacune des lignées MA de daphnies élevées à 18°C (A) et 27°C (B). Les lignées C14 à C38 ont accumulé des mutations en milieu bénin (MA Ctrl) et les lignées C251 à C300 ont accumulé des mutations en milieu enrichi de cuivre (MA Cu). Les lignes pointillées bleues représentent la moyenne ± l'erreur type des isolats contrôles non-MA. Les lignées dont la moyenne diffère significativement de la moyenne des isolats contrôles non-MA sont marquées d'un * (test de Dunnett, p < 0,05).	77

Figure 11 : Plasticité thermique du ratio ADNmt/ADNn des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes (n = 8) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture. 79

LISTE DES ABREVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADNmt	ADN mitochondrial
ADNn	ADN nucléaire
AZD	Bruit chimique résiduel après inhibition du complexe IV avec d'azide de sodium
CI	Complexe I du STE
CII	Complexe II du STE
CIII	Complexe III du STE
CIV	Complexe IV du STE
CS	Citrate synthase
C_T	Cycle seuil de détection du signal d'amplification d'une PCR quantitative
Cu	Cuivre
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FCF_C	Facteur de contrôle du flux respiratoire par le cytochrome c
FCR	Ratios de flux d'oxygène
G x E	Interaction entre génotype et environnement
IU	Unités enzymatiques internationales
Lignée MA	Lignée d'accumulation de mutations

N-LEAK	Respiration mitochondriale en stade de repos, sans phosphorylation
N-OXPPOS	Respiration mitochondriale de la voie NADH sans cytochrome <i>c</i>
N-OXPPOS_c	Respiration mitochondriale de la voie NADH avec cytochrome <i>c</i>
NS-OXPPOS_c	Respiration mitochondriale des voies NADH et succinate
OXPPOS	Phosphorylation oxydative
RCR_{CI}	Ratio de contrôle respiratoire en présence des substrats qui fournissent en électrons le CI
ROX	Consommation résiduelle d'oxygène après inhibition du complexe III
S-OXPPOS_c	Respiration mitochondriale de la voie succinate après inhibition du complexe I
STE	Système de transport des électrons
TMPD	Tetramethylphenylenediamine

LISTE DES SYMBOLES

l_x	Probabilité de survie au jour x
m_x	Fertilité au jour x
n	Taille d'échantillon
N	Taille de population
N_e	Taille effective de population
s	Coefficient de sélection
μ	Taux de mutations nucléotidiques
U	Taux de mutations génomiques délétères
V_L	Variance inter-lignées (ou génétique)
V_e	Variance intra-lignée (ou environnementale)

INTRODUCTION GENERALE

Mutations spontanées et évolution

Les mutations représentent une force évolutive importante puisqu'elles sont la source ultime de variation génétique. Tout changement évolutif tire son origine de l'apparition d'un allèle muté, suivie d'un changement dans la fréquence de cet allèle sous l'effet des autres forces évolutives telles que la sélection naturelle et la dérive génétique (Lynch 2007; Li 1997). Dans une population, la présence d'un pool de mutations permettant de faire face à de nouvelles conditions environnementales et l'apparition de nouvelles mutations bénéfiques engendrent des avantages évolutifs. Il est toutefois reconnu que la grande majorité des mutations spontanées non neutres ont des effets délétères sur la valeur adaptative (Baer *et al.* 2007; Halligan & Keightley 2009). L'accumulation de mutations délétères dans le génome des organismes pourrait conséquemment avoir des effets négatifs sur la santé et la survie des populations (Burger et Lynch 1997; Charlesworth 2012). Le rôle des mutations est une question importante en biologie, mais leur étude est compliquée, notamment parce qu'il s'agit d'évènements rares, transitoires et interagissant avec divers processus évolutifs. Ainsi, malgré plusieurs décennies de travaux théoriques et empiriques sur le sujet, de nombreux aspects relatifs à la nature et aux conséquences des mutations restent encore peu connus et vivement discutés.

Importance de l'accumulation de mutations légèrement délétères comme force évolutive

Toute nouvelle mutation apparaît d'abord en une seule copie dans une population. La majorité d'entre elles disparaîtront rapidement sous l'effet de la sélection ou encore par hasard. Pourtant certaines mutations arrivent à se maintenir un certain temps et à se transmettre, parfois jusqu'à leur fixation dans la population. Le devenir d'une nouvelle

mutation dépend essentiellement de son coefficient de sélection (s), soit son impact sur la valeur adaptative de l'organisme. Les mutations bénéfiques sont soumises à la sélection positive et ont une probabilité plus grande d'être fixées dans une population alors que les mutations délétères sont davantage éliminées par sélection négative ou purifiante (Lynch 2007; Li 1997). Toutefois les mutations sont également soumises à la dérive génétique, c'est-à-dire au changement des fréquences alléliques d'une génération à l'autre dû uniquement aux forces stochastiques telles que l'échantillonnage aléatoire des allèles lors de la reproduction (Li 1997). Le débat à savoir si la grande variabilité génétique observée dans les populations naturelles est principalement maintenue par sélection ou par la dérive remonte aux années 1940 et n'est pas encore entièrement résolu (Charlesworth et Charlesworth 2017). Cette question est pourtant primordiale afin de comprendre la nature de la variation génétique présente dans les populations et les conséquences des mutations sur l'évolution.

La découverte de la grande variabilité génétique présente dans les populations a amené une remise en doute de la capacité de la sélection à expliquer à elle seule cette variation. Avec la théorie neutre de l'évolution (Kimura 1968; King et Jukes 1969) élaborée dans les années 1960, il a été proposé pour la première fois que la dérive génétique et le taux de mutation seraient des forces évolutives importantes. Cette théorie suggère que si l'effet sélectif d'une mutation est négligeable, l'impact de la sélection sur cet allèle sera minime et son évolution sera uniquement déterminée par les forces stochastiques. En assumant que la majorité des allèles mutés confèrent un avantage ou un désavantage sélectif nul ou négligeable, la variabilité moléculaire serait largement déterminée par la fixation par dérive de mutations neutres et le taux d'évolution serait corollaire du taux de mutation (Charlesworth et Charlesworth 2017; Li 1997).

Les limites de la théorie neutre à expliquer certaines réalités moléculaires –comme la présence d'une variabilité génétique plus limitée que celle prédite dans les larges populations– a par la suite conduit à sa modification (Ridley 2004). Une variante importante, la théorie presque neutre de l'évolution, a ainsi introduit l'existence d'une classe

supplémentaire de mutations qui joueraient un rôle notable dans l'évolution: les mutations légèrement délétères. Contrairement aux mutations neutres, ces mutations seraient soumises à la fois à la sélection et à la dérive. Ces mutations presque neutres seraient toutefois souvent invisibles à la sélection et s'accumuleraient alors dans les génomes par dérive comme si elles étaient neutres bien qu'elles ne le soient pas réellement (Ohta 1992). La théorie presque neutre s'est largement popularisée à partir des années 1980. Cette théorie est encore aujourd'hui généralement considérée comme l'hypothèse nulle de l'évolution moléculaire (Charlesworth et Charlesworth 2017) malgré l'émergence de certaines critiques (Gillespie 2000). La théorie presque neutre de l'évolution a notamment permis de reconnaître l'existence des mutations légèrement délétères et le rôle important qu'elles pourraient jouer dans l'évolution en se ségrégant et se fixant sous l'effet du hasard. L'accumulation de ce type de mutations est aujourd'hui reconnue par de nombreux auteurs comme un processus évolutif important influençant notamment le niveau de variance génétique pour les traits liés à la valeur adaptative (Simmons et Crow 1977), la magnitude de la dépression consanguine (Charlesworth et Charlesworth 1999) et les risques d'extinctions de certaines populations (Lynch et al. 1993; Lynch, Conery, et Burger 1995a).

L'importance potentielle des mutations légèrement délétères sur l'évolution des populations a d'abord été révélée par les expériences fondatrices de Mukai et Ohnishi (Mukai 1964; Ohnishi 1977). Ces expériences sur des lignées de *Drosophila melanogaster* contraintes à accumuler des mutations, ont démontré qu'en l'absence de sélection, la viabilité moyenne des lignées de mouches diminuait après seulement une douzaine de générations. Ces expériences ont également révélé une hausse de la variance génétique, un phénomène qui s'explique par le fait que les différentes lignées accumulent chacune des mutations de façon indépendante. Depuis, ces résultats ont été corroborés par de nombreuses expériences similaires sur les drosophiles (ex: Houle et al. 1992; Kondrashov et Houle 1994) ainsi que sur quelques autres espèces, principalement des daphnies (ex: Latta *et al.* 2013; Latta *et al.* 2015; Lynch *et al.* 1998), des nématodes (ex: Vassilieva *et al.* 2000; Baer *et al.* 2005) et des espèces végétales (ex: Schultz *et al.* 1999; Schoen *et al.* 1998). Il a été démontré que l'accumulation de mutations entraînait des diminutions de

traits liés à la valeur adaptative (Halligan et Keightley 2009), mais aussi de traits phénotypiques complexes comme la compétitivité (Schaack *et al.* 2013) et la performance (Huey *et al.* 2003). L'ensemble de ces expériences appuie l'hypothèse que la majorité des mutations ont des effets neutres ou délétères. Ces travaux ont démontré que des mutations délétères dont les effets individuels sont très faibles peuvent avoir un effet cumulé négatif sur la santé et la valeur adaptative. La réduction de la valeur adaptative moyenne par accumulation de mutations légèrement délétères a été nommée la charge mutationnelle.

Taux de mutations spontanées et distribution des effets

Les impacts réels de l'accumulation de mutations sur la santé et la survie des populations naturelles dépendent par ailleurs des paramètres mutationnels comme le taux de mutation et la distribution des effets phénotypiques (Baer *et al.* 2005; Haag-Liautard *et al.* 2007). Par exemple, malgré leurs effets individuels importants, les mutations létales ou fortement délétères auraient des effets minimes sur la valeur adaptative des populations puisqu'elles sont plus facilement éliminées par sélection purifiante (Loewe et Hill 2010). Les premières interprétations des expériences fondatrices de Mukai et Ohnishi estimaient le taux de mutations génomiques délétères (U) des *D. melanogaster* entre 0,14 et 0,6 mutation/génome/génération et des effets mutationnels moyens réduisant la valeur adaptative d'environ 3% par génération (Mukai *et al.* 1972; Ohnishi 1977; Lynch *et al.* 1999). Plusieurs expériences ont par la suite corroboré la prévalence d'un U d'au moins 0,1 et possiblement aussi élevé que 1 (Lynch *et al.* 1999; Charlesworth et Charlesworth 2017) et d'effets phénotypiques moyens très faibles. Des effets délétères réduisant la valeur moyenne des traits phénotypiques (ex: valeur adaptative, longévité, fécondité, compétitivité, etc) de moins de 3% par génération ont par exemple été estimés chez des lignées de drosophiles (Simmons et Crow 1977; Shabalina, Yampolsky, et Kondrashov 1997; Houle *et al.* 1992), de daphnies (Lynch *et al.* 1998), de *T. arabidopsis* (Schultz, Lynch, et Willis 1999) et de *C. elegans* (Vassilieva, Hook, et Lynch 2000). De nouvelles analyses des expériences de Mukai et Onishi (Garcia-Dorado 1997; García-Dorado,

Monedero, et López-Fanjul 1998) ainsi que certaines études subséquentes (Fry *et al.* 1999; Vassilieva, Hook, et Lynch 2000) ont par ailleurs conclu que les effets délétères observés dans les lignées d'accumulation de mutations pourraient être essentiellement engendrés par un nombre plus restreint de mutations, chacune ayant des effets plus importants, au moins dans certaines conditions environnementales.

Suivant les estimations d'un U minimal de 0,1 et un effet phénotypique moyen réduisant la valeur adaptative de quelques pourcents ou moins, il a été prédit que l'accumulation de mutations aurait des effets négatifs sur certaines populations (Lynch *et al.* 1993; Lynch, Conery, et Burger 1995a). Par contre, si les estimations suggérant un U plus faible et des effets phénotypiques plus importants s'avéraient généralisées, les impacts populationnels pourraient être beaucoup plus limités puisque la sélection serait plus efficace à éliminer les mutations délétères. Les paramètres mutationnels seraient par ailleurs dépendants de nombreux facteurs comme l'espèce (et même la lignée au sein d'une espèce), l'environnement génomique et les conditions environnementales (Kondrashov et Houle 1994; Latta *et al.* 2013; Fry et Heinsohn 2002; Denver *et al.* 2012). Ces facteurs pourraient donc en partie expliquer la variabilité observée dans les estimations des paramètres mutationnels. Il apparaît conséquemment important de tenir compte de la variabilité des taux et effets mutationnels en fonction des conditions internes et environnementales pour estimer adéquatement les conséquences évolutives des mutations spontanées.

Sensibilité des populations naturelles à l'accumulation de mutations spontanées et risques d'extinction

Les impacts négatifs potentiels de l'accumulation de mutations sur la survie des populations ont principalement été explorés pour les espèces asexuées. En raison de leur mode de reproduction, ces espèces ne peuvent se débarrasser des mutations par recombinaison comme le font les espèces sexuées. La seule façon pour elles d'éliminer les mutations légèrement délétères est l'apparition d'une nouvelle mutation renversant la

précédente. En l'absence de telles mutations compensatoires, il a été prédit que les nouvelles mutations vont s'accumuler dans les populations asexuées de façon inexorable selon un processus connu sous le nom du cliquet de Müller (Felsenstein 1974). Selon cette théorie, l'accumulation irréversible de mutations chez les individus d'une population va entraîner la perte successive des classes d'individus ayant la plus grande valeur adaptative (ou le moins de mutations). Chaque extinction aléatoire de la classe la plus adaptée suite à l'apparition de nouvelles mutations délétères correspond à un tour du cliquet (Neiman et Taylor 2009; Lynch 2007).

Quelques études ont montré que les populations asexuées de daphnies, d'escargots, de phasmes et de plantes accumulaient effectivement des mutations délétères plus rapidement que leurs congénères sexuées (Paland et Lynch 2006; Henry, Schwander, et Crespi 2012; Hollister *et al.* 2014; Neiman *et al.* 2010). Il a été estimé en fonction d'analyses des acides aminés, que certaines mutations accumulées par les lignées asexuées pourraient être plus délétères que celles retrouvées dans les lignées sexuées (Henry, Schwander, et Crespi 2012). Les impacts de ces mutations n'ont pas été mesurés expérimentalement, mais ces données suggèrent qu'elles pourraient affecter négativement la valeur adaptative. Il a été montré chez des rotifères, que les espèces asexuées affichaient effectivement un taux plus élevé d'accumulation de mutations délétères comparativement aux espèces sexuées, mais que la sélection leur permettait également d'éliminer des mutations à long terme (Birky *et al.* 2005; Barraclough *et al.* 2007). Ces résultats tendent à appuyer la théorie selon laquelle que les lignées asexuées auraient effectivement une moins grande capacité à éliminer les mutations délétères par sélection purifiante que les lignées sexuées. Bien qu'à long terme ces mutations délétères pourraient finir par être éliminées chez certaines espèces asexuées, l'accumulation de mutations serait donc une force importante dans l'évolution de ces espèces.

La théorie presque neutre de l'évolution prédit que l'accumulation de mutations délétères pourrait aussi affecter la survie des populations sexuées de petites tailles (Lynch, Conery, et Burger 1995a; Lynch, Conery, et Burger 1995b). L'évolution d'une nouvelle

mutation dans une population dépend de son coefficient de sélection, mais également de la taille effective de population (N_e). Si le coefficient de sélection est plus grand que $\frac{1}{2}N_e$, la force évolutive dominante sera la sélection et les mutations délétères devraient être efficacement éliminées. C'est ce qui devrait se produire dans les populations de grande taille. Par contre, si les mutations ont un effet légèrement délétère (ou bénéfique) dont $s \ll \frac{1}{2}N_e$, c'est la dérive qui domine. Conséquemment, dans les populations de petites tailles, davantage de mutations se comportent comme si elles étaient neutres et peuvent être fixées de façon aléatoire (Cortopassi 2002; Lynch *et al.* 1999; Popadin *et al.* 2007; Lynch 2007). L'analyse des ratios de mutations non-synonymes (présumées légèrement délétères) sur synonymes (neutres) a effectivement montré que les populations de petites tailles accumulaient plus de mutations légèrement délétères (Woolfit et Bromham 2005; Howe et Denver 2008). La fixation accélérée de nouvelles mutations légèrement délétères dans les populations asexuées ou de petite taille les rendrait plus susceptibles à un effondrement mutationnel, soit une extinction pour des raisons essentiellement génétiques (Gabriel, Lynch, et Burger 1993; Lynch, Conery, et Burger 1995b). Un tel phénomène se produirait dans les cas où l'accumulation de mutations délétères réduirait la valeur adaptative au point où la moyenne des individus ne pourrait plus se reproduire et que la taille de population commencerait à décroître. La population entrerait alors dans un cercle vicieux où la réduction de sa taille favoriserait une hausse du taux d'accumulation de mutations et vice et versa (Lynch 2007).

Plusieurs auteurs ont également suggéré que l'exposition à des stress environnementaux pourrait générer une hausse du taux de mutations ce qui pourrait accélérer le processus d'effondrement mutationnel des populations (Lynch, Conery, et Burger 1995b; Bickham *et al.* 2000; Ribeiro et Lopes 2013). L'exposition à des conditions stressantes telles qu'une hausse de température (Matsuba *et al.* 2012), de salinité (Jiang *et al.* 2014) ou de contaminants (Chain *et al.* 2018) accélèrent le taux de mutations en conditions expérimentales. À cet égard, l'exposition à des contaminants chimiques pouvant directement interagir avec l'ADN et augmenter le taux de mutations pourrait s'avérer un stress particulièrement dommageable. Les nouvelles technologies ont permis dans les

dernières années de mieux connaître les taux de mutations spontanées de différentes espèces, mais on en sait toujours peu sur comment l'environnement des populations naturelles peut influencer ce taux.

Mitochondries et mutations

Les mitochondries sont des organites caractéristiques des eucaryotes qui assurent plusieurs fonctions cellulaires essentielles dont la production d'ATP par phosphorylation oxydative (OXPHOS). Le processus d'OXPHOS est assuré par le système de transport des électrons (STE) et l'ATP synthase. Le STE est constitué de quatre principaux complexes respiratoires (complexes I à IV), localisés dans la membrane mitochondriale interne, qui assurent le transfert d'électrons d'équivalents réduits (NADH et FADH₂), produits par le cycle de l'acide citrique, vers l'oxygène. Le transfert d'électrons permet aux complexes I, III et IV de pomper des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, créant un gradient électrochimique qui est subséquemment utilisé par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP. D'autres complexes auxiliaires fournissent également le STE en électrons (pour une revue de l'organisation des complexes mitochondriaux, voir Lenaz et Genova 2010). Grâce à cette voie métabolique, les mitochondries fournissent la majorité de l'énergie nécessaire aux cellules. Ces organites jouent aussi d'autres rôles importants notamment dans la signalisation cellulaire, la régulation de l'apoptose, l'homéostasie du Ca²⁺ et du fer, la biosynthèse de macromolécules et la réponse immunitaire innée (Tait et Green 2012; Shaughnessy *et al.* 2014; Papadopoulos et Miller 2012). De plus, le STE est une source importante de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Il est maintenant reconnu que les ERO jouent de nombreux rôles fonctionnels en agissant comme signal cellulaire dans le contrôle du métabolisme énergétique, mais aussi dans de nombreuses voies homéostatiques impliquées entre autres dans l'immunité, le maintien du pH intracellulaire, la réponse à l'hypoxie ou la différenciation cellulaire (Shadel et Horvath 2015). Ces molécules réactives peuvent également endommager les biomolécules lorsqu'elles sont présentes en trop grande concentration. Les ERO peuvent réagir avec

l'ADN, causant notamment des dommages de type *single-strand breaks* et des dommages aux bases nucléiques (Salazar et Van Houten 1997). L'ADN mitochondrial est souvent considéré comme particulièrement à risque de tels dommages en raison de sa proximité avec le STE et les ERO qu'il produit.

ADN Mitochondrial

Les mitochondries contiennent leur propre ADN (ADNmt) qui est le seul génome extra nucléaire dans les cellules animales. Cet ADN, qui est circulaire et mesure environ 16 000 paires de base, est présent en plusieurs copies dans chaque cellule. Chez la majorité des espèces animales, l'ADNmt contient une trentaine de gènes, tous nécessaires au bon fonctionnement des mitochondries (Ballard et Melvin 2010; Ladoukakis et Zouros 2017). Ces gènes occupent la presque totalité de l'ADNmt qui, contrairement à l'ADN nucléaire, est pratiquement dépourvu d'introns. La majorité des séquences d'ADNmt sont donc codantes, si ce n'est de la région contrôle appelée D-loop (displacement loop) qui contient la séquence d'origine de réplication de l'ADNmt (St. John et al. 2010; Taylor et Turnbull 2005). L'ADNmt contient les gènes des ARNr et ARNt mitochondriaux ainsi que treize gènes codant pour des protéines des complexes du STE (Taanman 1999; Crease 1999). Le reste des protéines du STE et tous les autres produits nécessaires aux activités mitochondriales sont encodés par le génome nucléaire (ADNn) puis transloqués vers les mitochondries (Castellana *et al.* 2011; Ballard & Pichaud 2014; Ballard & Melvin, 2010). Environ 80 gènes nucléaires codent pour le reste des sous-unités protéiques des quatre principaux complexes du STE et de l'ATP synthase (aussi appelée complexe V). Parmi ces complexes, seul le Complexe II est entièrement encodé par l'ADNn, les autres complexes sont constitués de protéines issues des deux génomes. Il a par ailleurs été estimé qu'environ 1 500 gènes nucléaires seraient impliqués dans la régulation des activités mitochondriales (Castellana, Vicario, et Saccone 2011). Il résulte de cette organisation particulière que l'assemblage des complexes mitochondriaux et le bon fonctionnement de ces organelles dépend de la coordination entre les activités de deux génomes (Hicks *et al.* 2012).

L'ADNmt se distingue aussi de l'ADNn par son mode de transmission asexuée et son haploïdie. L'ADNmt est habituellement transmis de façon uniparentale, par la mère. De plus, la transmission se fait généralement sans recombinaison entre les molécules d'ADNmt (Ladoukakis et Zouros 2017). Il a été démontré qu'un faible niveau de recombinaison pourrait se produire lors de la transmission de l'ADNmt chez les espèces sexuées et –de façon encore plus limitée– chez les espèces asexuées, mais ce processus resterait marginal dans les deux cas (Piganeau, Gardner, et Eyre-Walker 2004; Neiman et Taylor 2009). Ces caractéristiques du mode de transmission de l'ADNmt réduisent la taille de population de ce génome comparativement à l'ADNn, ce qui est accentué par un important goulot d'étranglement inter-générationnel (Rand 2011; Castellana, Vicario, et Saccone 2011; Lynch, Koskella, et Schaack 2006). Une réduction physique de la taille de population de l'ADNmt se produirait dans les cellules germinales primordiales où seules quelques copies d'ADNmt seraient ségréguées dans chaque cellule (Stewart *et al.* 2008; Jenuth *et al.* 1996). Ensuite, un goulot génétique se produirait alors que seules quelques-unes de ces molécules d'ADNmt transmises seraient effectivement répliquées pour former la population d'ADNmt des oocytes (Wai, Teoli, et Shoubridge 2008; Neiman et Taylor 2009). Une conséquence importante de ce mode de transmission est qu'il favorise l'homoplasmie. Ainsi, malgré le grand nombre de copies de molécules d'ADNmt dans chaque cellule, toutes les molécules sont généralement identiques et chaque gène n'est habituellement présent qu'en une seule version. La co-présence de différentes séquences d'ADNmt (par exemple suite à l'apparition de nouvelles mutations) est appelée hétéroplasmie. Cet état serait toutefois transitoire, le taux de fixation des allèles dans les mitochondries étant particulièrement rapide (Cortopassi 2002).

Taux de mutation élevé de l'ADNmt

Chez les métazoaires, le taux de mutations spontanées de l'ADNmt est de l'ordre de 5 à 50 fois plus élevé que dans le génome nucléaire selon les groupes taxonomiques (Xu *et al.* 2012; Lynch 2007). Une première cause régulièrement invoquée pour expliquer ce haut

taux est l'environnement mutagène de l'ADNmt. L'ADNmt est lié à la membrane interne des mitochondries où se trouvent les complexes du STE qui sont la principale source cellulaire d'ERO. Cette proximité favoriserait une plus grande fréquence de dommages oxydatifs à l'ADNmt. Malgré la présence de systèmes de défense antioxydante, le niveau d'oxydation des bases serait de trois à quinze fois plus élevé que dans l'ADNn (Richter 1995; Yakes et Van Houten 1997).

Des mécanismes de réparation de l'ADN plus limités dans ces organites que dans le noyau pourraient également contribuer à augmenter le taux de mutations. Alors que de nombreux mécanismes de réparation de l'ADN ont été identifiés dans le noyau des eucaryotes, certains de ces mécanismes semblent absents des mitochondries. Ce serait le cas de la réparation par excision de nucléotide et de la réparation par recombinaison (Larsen, Rasmussen, et Rasmussen 2005). Les mitochondries possèdent tout de même des mécanismes de réparation, notamment certaines voies de réparation par excision de base qui sont les principales voies de réparation des dommages oxydatifs. Malgré tout, certains types de dommages oxydatifs comme les 8-oxoA/G pourraient ne pas être réparés dans ces organelles et s'y accumuler (Larsen, Rasmussen, et Rasmussen 2005). De plus, Salazar et Van Houten (1997) ont montré qu'une exposition intense ou prolongée à des ERO (H_2O_2) cause des dommages irréparables, ce qui déclenche l'apoptose.

L'instabilité du génome mitochondrial pourrait également être accentuée par l'absence de protéines de types histones permettant de protéger l'ADN et par son mode de réplication particulier laissant un brin non apparié (Salazar et Van Houten 1997; Reyes *et al.* 1982; Brown *et al.* 2005). Il a été suggéré que ces caractéristiques de l'ADNmt le rendraient plus susceptible aux attaques par des agents chimiques ou physiques et, conséquemment, pourrait augmenter les lésions et accélérer son taux de mutations (Roubicek et Souza-pinto 2017; Castellana, Vicario, et Saccone 2011). Toutefois, le facteur de transcription mitochondrial TFAM pourrait protéger l'ADNmt en se liant au site promoteur et ainsi jouer un rôle équivalent aux histones (Larsen, Rasmussen, et Rasmussen 2005; St. John *et al.* 2010). L'aconitase jouerait un rôle similaire de protection de l'ADNmt

en se liant à celui-ci chez les levures (Chen, Wang, et Butow 2007) et, possiblement, chez d'autres organismes dont l'humain (Kim *et al.* 2014).

Sensibilité de l'ADNmt à l'accumulation de mutations

Le haut taux de mutation de l'ADNmt combiné à son mode de transmission rendrait ce génome particulièrement susceptible à l'accumulation de mutations. La transmission uniparentale de l'ADNmt et l'important goulot d'étranglement subi durant l'oogenèse se traduisent par une taille effective de population réduite. L'effet de la sélection sur l'ADNmt serait ainsi limité, favorisant l'accumulation de mutations par dérive génétique. De plus, la quasi-absence de recombinaison dans ce génome limite sa capacité à éliminer les mutations et a pour incidence que tous les gènes, bénéfiques ou délétères, sont liés entre eux. Ces caractéristiques favorisent l'accumulation de mutations délétères sous l'effet du cliquet de Müller ainsi que par hitch-hiking génétique (Christie et Beekman 2016; Lynch et Blanchard 1998; Cortopassi 2002). Selon ce dernier processus, la fixation par sélection positive d'un locus bénéfique favorise incidemment la fixation simultanée de mutations légèrement délétères puisque ces loci sont liés sur le génome (Gillespie 2000). Le génome mitochondrial est conséquemment considéré par plusieurs comme à risque de subir un effondrement mutationnel qui pourrait affecter la survie des populations (Lynch 2007; Baer, Miyamoto, et Denver 2007; Cortopassi 2002; Neiman et Taylor 2009).

Cette hypothèse ne fait toutefois pas l'unanimité et plusieurs croient que si le génome mitochondrial a su, jusqu'à ce jour, éviter l'effondrement mutationnel prédit par le cliquet de Müller, ce doit être parce que des mécanismes permettent l'élimination des mutations délétères (Rand 2001; Castellana, Vicario, et Saccone 2011; Melvin et Ballard 2017). Par exemple, des auteurs avancent que les rares cas de recombinaison de l'ADNmt pourraient suffire à sauver l'ADNmt d'un effondrement mutationnel (Ladoukakis et Zouros 2017). L'importance du goulot d'étranglement mitochondrial sur l'évolution moléculaire de l'ADNmt suscite également des débats importants (Rand 2001; Dowling 2014). Il a été

suggéré que le goulot d'étranglement pourrait protéger l'ADNmt de l'accumulation en générant de la variabilité entre les oocytes. Cette variabilité favoriserait la sélection intra-individuelle et permettrait d'éliminer les cellules germinales contenant des mutations délétères (Krakauer et Mira 1999; Rand 2001). La sélection pourrait également agir au niveau intra-cellulaire entre les mitochondries et les ADNmt (Hill, Chen, et Xu 2014). Le rôle actif de la sélection purifiante dans l'évolution de l'ADNmt est supporté empiriquement par des études ayant montré que les mutations les plus délétères peuvent être éliminées de ce génome (Fan *et al.* 2008; Stewart *et al.* 2008).

Il apparaît toutefois que la dérive serait la principale force qui assure la ségrégation des génomes mitochondriaux hétéroplasmiques au cours de l'oogenèse (Shoubridge et Wai 2007; Jenuth *et al.* 1996). La capacité de la sélection à éliminer les mutations délétères serait conséquemment fortement dépendante de la taille du goulot d'étranglement (Neiman et Taylor 2009). Plusieurs lignes d'évidence montrent d'ailleurs que l'élimination des mutations délétères par sélection purifiante n'est pas un mécanisme infaillible. Le rôle non négligeable de l'accumulation de mutations dans l'évolution moléculaire des mitochondries est notamment supporté par le taux d'accumulation de mutations délétères plus élevé dans les ARNt mitochondriaux que nucléaires (Lynch 1996). Il a aussi été montré que des mutations mitochondriales avec des effets phénotypiques importants peuvent échapper à cette sélection purifiante (Fan *et al.* 2008; Shoubridge et Wai 2007). Les nombreux cas de pathologies humaines dues à des mutations de gène mitochondriaux supportent d'ailleurs cette incapacité de la sélection purifiante à éliminer toutes les mutations non-synonymes (Taylor et Turnbull 2005). La persistance de mutations délétères dans les génomes mitochondriaux est également observée chez des populations animales, bien que les effets phénotypiques de ces mutations n'aient pas été testés (Popadin *et al.* 2007; Howe et Denver 2008; Henry, Schwander, et Crespi 2012). L'efficacité de la sélection purifiante serait variable selon les régions de l'ADNmt, les régions associées aux ARNt et ARNr étant plus susceptibles à accumuler des mutations (Stewart *et al.* 2008). Pourtant ces mutations ne sont pas neutres et peuvent causer des dysfonctions et pathologies. Les mutations des gènes des ARNt représentent d'ailleurs plus de 50% des mutations pathogènes chez l'humain

(Schon, DiMauro, et Hirano 2012). Ainsi, même si les mutations les plus importantes semblent pouvoir être efficacement éliminées ou compensées par d'autres mutations, la plus grande incidence de mutations délétères dans le génome mitochondrial pourrait être associée à des impacts négatifs sur la valeur adaptative moyenne des populations.

L'évolution du génome mitochondrial serait donc à la fois influencée par un haut taux d'accumulation de mutations délétères par dérive et par la sélection purifiante. Il a aussi été suggéré que de la sélection positive pourrait favoriser la fixation de certaines mutations dans le génome mitochondrial (James, Piganeau, et Eyre-Walker 2016). Toutefois, l'importance relative de ces différents processus sur l'évolution mitochondriale reste une question non résolue. Si plusieurs lignes d'évidences indiquent que ce génome serait soumis aux conséquences négatives du cliquet de Müller, la vitesse à laquelle il «clique» pourrait être plus ou moins ralentie par la sélection. Les conséquences potentielles de l'accumulation de mutations sur la santé et la survie des populations sont encore plus difficiles à démontrer et davantage controversées.

Effets des mutations sur les mitochondries

En raison des nombreux rôles essentiels des mitochondries dans le fonctionnement des cellules eucaryotes, des mutations sur des gènes impliqués dans leurs voies métaboliques pourraient avoir des effets importants sur la santé et la valeur adaptative des organismes. Comme les fonctions mitochondriales dépendent à la fois de l'ADNmt et de l'ADNn, des mutations dans ces deux génomes peuvent les affecter, que ce soit des mutations sur des gènes codant pour des protéines du STE ou d'autres gènes indirectement impliqués dans les fonctions mitochondriales. Par exemple, des mutations affectant les fonctions mitochondriales ont été identifiées sur des gènes impliqués dans la production et l'assemblage de ces protéines, dans la dynamique mitochondriale, dans le transport entre les mitochondries et le cytoplasme et dans la synthèse des membranes lipidiques (Wallace 1999; Schon, DiMauro, et Hirano 2012; Greaves *et al.* 2012). Des mutations qui ont en

elles-mêmes peu de conséquences fonctionnelles peuvent par ailleurs affecter les fonctions mitochondriales en interférant dans la coordination mito-nucléaire (Schon, DiMauro, et Hirano 2012; Ellison et Burton 2006; Levin *et al.* 2014). Aussi, pratiquement toutes les séquences de l'ADNmt étant codantes ou alors impliquées dans sa réplication, les mutations qui s'y déposent ont plus de risques d'avoir des conséquences fonctionnelles.

Les effets de mutations spécifiques sur les mitochondries ont surtout été étudiés en lien avec des pathologies humaines (Wallace 1999; Schon, DiMauro, et Hirano 2012; Greaves *et al.* 2012; Verkaart *et al.* 2007; Dowling 2014; Taylor et Turnbull 2005). Des études en laboratoire sur des organismes modèles ont également permis de tester les effets de mutations sur des gènes liés au STE (Hicks *et al.* 2012; Dingley *et al.* 2010; Leung *et al.* 2013; Kujoth *et al.* 2005; Bess *et al.* 2012). Ces mutations se traduisaient notamment par des diminutions des quantités de mitochondries, des activités des complexes du STE, du potentiel membranaire, de la consommation d'oxygène et de la production en ATP. Dans plusieurs études les mutations des gènes liés aux mitochondries étaient aussi associées à des hausse du niveau d'ERO (Dingley *et al.* 2010; Joyner-Matos *et al.* 2013; Verkaart *et al.* 2007; Estes *et al.* 2011). Dans une autre étude la balance d'ERO ne semblait pas affectée, mais les mutations étaient associées à une augmentation du taux d'apoptose (Kujoth *et al.* 2005).

En causant des dysfonctions mitochondriales, les mutations peuvent avoir des effets pléiotropes importants. Chez l'humain, les liens de causalité entre certaines mutations spécifiques affectant les fonctions mitochondriales et des pathologies telles que le syndrome de Leigh, de l'acidose lactique ou de la neuropathie optique de Leber sont largement documentés (résumé dans Greaves *et al.* 2012). Les dysfonctions mitochondriales ont également été associées au développement de maladies dégénératives, au vieillissement et à des impacts négatifs sur des traits liés à la valeur adaptative comme la longévité et la fertilité (Ballard et Melvin 2010; Linnane *et al.* 1998; Wallace 2011). Les conséquences phénotypiques des mutations mitochondriales naturelles se déposant dans les populations sauvages sont plus difficiles à démontrer et peu d'informations sont disponibles

sur les effets de l'accumulation de mutations spontanées sur le phénotype mitochondrial dans ces populations. L'existence de variants d'ADNmt se traduisant par des différences métaboliques, mais aussi des effets au niveau des traits phénotypiques plus complexes est toutefois de plus en plus reconnue. Des mutations spécifiques ont par exemple été associées au développement de surdité (Moreno-Loshuertos *et al.* 2006), à des réductions de la valeur adaptative (Howe et Denver 2008; Estes *et al.* 2011) ou à des variations dans la longévité (Clancy 2008). Certaines mutations délétères pourraient donc se maintenir dans des populations naturelles et affecter les performances des organismes. De plus, certaines lignes d'évidences suggèrent que les populations naturelles pourraient aussi être négativement affectées par l'accumulation de mutations mitochondriales ayant des effets individuels trop légers pour être détectés mais ayant collectivement des effets négatifs. Une étude sur des lignées de nématodes *C. elegans* ayant accumulé des mutations (lignées MA) a associé les mutations mitochondriales les plus susceptibles d'être délétères à un taux de croissance intrinsèque plus faible (Denver *et al.* 2000). Il a aussi été montré que l'accumulation de mutations spontanées entraînait chez cette même espèce une hausse de stress oxydant mitochondrial (Joyner-Matos *et al.* 2013).

Contaminants et mutations

Plusieurs contaminants chimiques environnementaux d'origine naturelle (ex: métaux provenant de la croûte terrestre) ou anthropique (ex: rejets industriels, eaux usées, activités agricoles, etc.) sont reconnus pour avoir des effets génotoxiques. Ces contaminants réagissent avec les molécules d'ADN et peuvent causer des dommages pouvant éventuellement se traduire par des mutations causant des dysfonctions cellulaires, des tumeurs ou des effets tératogènes (Depledge 1998; Roubicek et Souza-pinto 2017). La prévalence de dommages à l'ADN dans les populations naturelles causés par l'exposition à des concentrations ambiantes de contaminants a été abondamment documentée, principalement dans les cellules somatiques (Roubicek et Souza-pinto 2017). Les effets

mutagènes des contaminants sur les cellules germinales restent pour leur part peu documentés.

Contrairement aux mutations somatiques, les mutations des cellules germinales peuvent se transmettre aux descendants et ainsi perdurer dans le temps au-delà de la période d'exposition et même entre les générations. Il a conséquemment été avancé que l'exposition à des polluants génotoxiques environnementaux pourrait avoir des impacts à long terme sur les populations naturelles en modifiant leur évolution moléculaire (Baer, Miyamoto, et Denver 2007; Bickham *et al.* 2000; Lynch, Conery, et Burger 1995a; Ribeiro et Lopes 2013). La valeur adaptative des individus risquerait d'être affectée à la baisse suivant une hausse de l'accumulation de mutation légèrement délétères (Baer, Miyamoto, et Denver 2007; Ribeiro et Lopes 2013). Dans le contexte environnemental actuel où les activités anthropiques génèrent constamment diverses formes de pollution environnementale, ce facteur est appelé à jouer un rôle non négligeable pour l'évolution des populations naturelles. Les petites populations où les effets de la dérive favorisent le développement d'une charge mutationnelle seraient particulièrement à risque.

Plusieurs études sur des modèles expérimentaux ont montré que des contaminants chimiques pouvaient causer des dommages à l'ADN des cellules germinales et augmenter le taux de mutations héréditaires (Vilariño-güell, Smith, et Dubrova 2003; Somers *et al.* 2002; Olsen *et al.* 2010). Il a été montré expérimentalement que les daphnies exposées à des métaux lourds avaient un taux d'accumulation de mutations de type délétions et duplication de longues séquences d'ADN plus élevé que les daphnies élevées en milieu contrôle (Chain *et al.* 2018). Des études ont aussi montré que le taux de mutation dans les cellules germinales (mesuré dans des séquences de répétitions en tandem) était corrélé positivement au niveau d'exposition à des contaminants comme les HAPs et les métaux lourds chez des populations naturelles de plantes (Rogstad, Keane, et Collier 2003) et d'oiseaux (Yauk *et al.* 2000; King *et al.* 2014). D'autres études n'ont toutefois pas décelé de telles corrélations chez des populations exposées à des contaminants métalliques (Berckmoes *et al.* 2005). Ces écarts pourraient s'expliquer par des différences dans les voies d'exposition aux

contaminants entre les études ou par des facteurs internes aux espèces. L'impact des contaminants génotoxiques sur l'évolution moléculaire des espèces naturelles pourrait en effet être modulés par le niveau d'exposition (Yauk *et al.* 2000), mais aussi par leur capacité à neutraliser les mutagènes ou à réparer les dommages (Baer, Miyamoto, et Denver 2007).

Ces résultats montrent que les contaminants environnementaux peuvent effectivement augmenter le taux d'accumulation de mutations des organismes et appuient l'importance de tenir compte de ce facteur dans l'évolution moléculaire des populations. Toutefois de nombreux facteurs doivent encore être davantage documentées afin de mieux comprendre les implications biologiques et écologiques de ces résultats. Notamment, il apparaît important de mieux identifier les mécanismes par lesquels les contaminants peuvent induire une hausse du taux de mutations (Somers et Cooper 2009). Des études ont avancé que les effets génotoxiques de certains contaminants pourraient ne pas être induits par des interactions directes avec l'ADN de ces cellules germinales, mais avoir plutôt des causes indirectes. L'induction de mutations pourrait par exemple être médiée par des processus comme une hausse du stress oxydant ou des mécanismes épigénétiques (Singer et Yauk 2010; Yauk *et al.* 2008). Finalement, des travaux sont également nécessaires afin d'identifier et mesurer les impacts phénotypiques des hausses observées des taux de mutation. La majorité des données actuelles qui montrent une hausse du taux de mutation suivant l'exposition à des contaminants se sont concentrées sur des marqueurs considérés neutres. L'implication de hausse de taux de mutations sur le phénotype et la valeur adaptative des organismes et des populations reste encore à être démontrée.

Sensibilité de l'ADNmt aux contaminants environnementaux

Plusieurs caractéristiques des mitochondries les rendent sensibles à certains types de contaminants environnementaux. Par exemple, les membranes lipidiques des mitochondries vont favoriser l'accumulation de composés lipophiles. Les métaux chargés vont également pouvoir entrer et s'accumuler dans ces organites en raison de la présence des canaux à

calcium dans les membrane mitochondriales et de la charge négative et du pH alcalin de la matrice mitochondriale (Meyer *et al.* 2013). Plusieurs des facteurs énumérés plus hauts qui rendent ce génome plus vulnérable à l'accumulation de mutations (ex: absence d'histones, mode de réplication) favorisent également sa susceptibilité aux substances génotoxiques environnementales. Une fois dans les mitochondries, plusieurs contaminants peuvent générer une hausse du niveau d'ERO soit en inhibant le STE ou en acceptant des électrons et les transférant à l'oxygène pour former des radicaux hydroxyles (Blajszczak et Bonini 2017; Turrens 2003). L'absence du mécanisme de réparation par excision de base dans les mitochondries accentuerait leur sensibilité aux effets génotoxiques des contaminants environnementaux puisque ce mécanisme est la principale voie de réparation de nombreux dommages dont ceux induits par les rayons UVC, les mycotoxines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Bess *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2013). Les mécanismes de réorganisation des mitochondries (fusion et fission) et de mitophagie (autophagie sélective des mitochondries) pourraient tout de même fournir une certaine protection contre les dommages irréparables, au moins dans les cellules somatiques (Bess *et al.* 2012; Kujoth *et al.* 2005).

Le génome mitochondrial accumulerait significativement plus de dommages que le génome nucléaire suivant une exposition à de nombreux génotoxiques, qu'ils soient d'origine interne (ex: ERO) ou externe (Roubicek et Souza-pinto 2017; Atienzar *et al.* 2001; Ledoux, Wilson, et Beecham 1992; Meyer *et al.* 2013). Le HAP benzo(a)pyrene, les UVC, le paraquat et d'autres agents oxydants sont quelques exemples de contaminants environnementaux qui affecteraient davantage l'ADNmt (Ledoux, Wilson, et Beecham 1992; Bess *et al.* 2012; Leung *et al.* 2013; Salazar et Van Houten 1997). Il est généralement assumé que de tels dommages persistants peuvent générer des mutations dans l'ADNmt bien que ce processus reste peu documenté (Wei *et al.* 1998; Meyer *et al.* 2013). Les dommages persistants à l'ADNmt causés par des xénobiotiques peuvent avoir des effets physiologiques négatifs tels que l'inhibition du STE et la diminution de la production d'ATP (Furda *et al.* 2012; Leung *et al.* 2013).

Dans un contexte naturel où les populations sont exposées à des contaminants environnementaux, l'ADNmt pourrait subir un taux d'accumulation de mutations héréditaires accéléré, à l'instar de ce qui est observé pour le génome nucléaire. Peu d'études se sont toutefois penchées sur les effets des contaminants sur le taux de mutations de l'ADNmt dans des populations naturelles. Deux études réalisées dans la région de Sumgayit en Azerbaïdjan –une région historiquement abondamment contaminée par les rejets industriels et agricoles– ont révélé un nombre accru de nouveaux haplotypes hétéroplasmiques mitochondriaux chez les grenouilles *Rana ridibunda* et les poissons *Gambusia holbrooki* vivant dans les sites pollués (Matson *et al.* 2006; Rinner *et al.* 2011). Ces études suggèrent que les contaminants chimiques peuvent avoir un impact négatif sur le taux de mutations héréditaires du génome mitochondrial et donc sur l'évolution de celui-ci.

Cuivre

Le cuivre est essentiel aux systèmes vivants, notamment pour ses rôles dans le métabolisme énergétique, la défense antioxydante et le développement. Ce métal fonctionne comme un cofacteur associé à plusieurs enzymes clés, les principales étant la superoxyde dismutase (défense antioxydante), les metallothionéines (séquestration de l'excès de cuivre et défense antioxydante) et la cytochrome c oxydase (STE) (Linder et Hazegh-Azam 1996). Toutefois, une exposition à des concentrations importantes de ce métal –comme cela se produit dans certaines régions accueillant des activités minière ou de raffinage– peut avoir des conséquences physiologiques et génétiques négatives (Pearson, Gunn, et Keller 2002). De nombreuses études montrent que le cuivre induit de la toxicité (Gaetke et Chow 2003) et de la génotoxicité (Lloyd et Phillips 1999; Atienzar *et al.* 2001). Il a notamment été montré que l'exposition chronique au cuivre diminuait le taux de survie des *Daphnia pulex* (Winner et Farrell 1976).

Le cuivre peut induire divers dommages à l'ADN comme des bris de liens simples et doubles, des modifications de bases ou des adduits (Lloyd et Phillips 1999; Atienzar *et*

al. 2001; Doğanlar, Doğanlar, et Tabakçioğlu 2014). L'induction de dommages à l'ADN suivant l'exposition à différentes concentrations de cuivre a notamment été montrée chez *Daphnia magna* (Atienzar *et al.* 2001). Ces dommages seraient principalement causés de façon indirecte suite à une hausse du niveau d'ERO (Tkeshelashvilis *et al.* 1991). Le cuivre, comme les autres métaux de transition, catalyse les réductions du type Fenton du peroxyde d'hydrogène en radicaux hydroxyles, une des ERO les plus réactives (Ercal, Gurer-Orhan, et Aykin-Burns 2001; Gaetke et Chow 2003). Le cuivre causerait aussi des dommages en défaisant la double hélice lorsqu'il se lie directement avec l'ADN (Eichhorn et Shin 1968).

Les mitochondries seraient une des cibles principales du cuivre qui a tendance à s'y accumuler (Mehta, Templeton, et Brien 2006). L'exposition à ce métal induit une hausse de la production d'ERO dans ces organites et des dommages aux membranes (Hosseini *et al.* 2014; Barata *et al.* 2006; Krumschnabel *et al.* 2005). Ces effets négatifs du cuivre sur les mitochondries peuvent induire une inhibition de la respiration mitochondriale et ce même à des concentrations relativement faibles pouvant être retrouvées dans l'environnement (Garceau, Pichaud, et Couture 2010; Hosseini *et al.* 2014). La hausse localisée du stress oxydant risque également d'endommager l'ADNmt et d'augmenter son taux de mutations. Il a d'ailleurs été montré que l'exposition à des métaux lourds dont le cuivre augmenterait le taux de dommages du gène mitochondrial ND2 (Doğanlar, Doğanlar, et Tabakçioğlu 2014).

Daphnies

La présente étude se fera sur des daphnies du groupe pulex qui représentent un modèle intéressant des points de vue environnemental et expérimental. Ces cladocères sont des organismes clés des écosystèmes d'eau douce déjà largement utilisés comme modèles en génétique et en écotoxicologie et dont on connaît bien l'histoire de vie et le génome (Shaw *et al.* 2008; Orsini *et al.* 2011; Crease 1999). La facilité avec laquelle elles sont élevées en laboratoire et leur court temps de génération facilitent les expériences de lignées AM (Xu *et al.* 2012; Lynch *et al.* 1998). Leur mode de reproduction par parthénogenèse

permet d'étudier plus facilement les effets des mutations sur le phénotype en limitant les variations du reste de l'environnement génétique. De plus, il a été montré que les *D. pulex* présentaient un des taux de mutations de l'ADNmt connu les plus élevés chez les eukaryotes ce qui en fait également un modèle intéressant pour l'étude des effets mutationnels sur le phénotype mitochondrial (Xu *et al.* 2012).

Lignées d'accumulation de mutations

La majorité des connaissances disponibles sur les mutations spontanées et leurs effets phénotypiques provient d'expériences de lignées d'accumulation de mutations (lignées MA) (Halligan et Keightley 2009). Cette approche expérimentale consiste à élever de nombreuses lignées indépendantes d'individus descendant d'un même ancêtre (ou couple ancestral) en ne conservant qu'un individu (espèces asexuées) ou un couple d'individus (espèces sexuées) à chaque génération, imposant à chaque fois un fort goulot d'étranglement. En réduisant ainsi la taille de population au maximum, la sélection naturelle est rendue quasi inopérante et l'évolution moléculaire est essentiellement gouvernée par la dérive génétique (Lynch 1985). La grande majorité des mutations se comportent comme étant effectivement neutres et s'accumulent dans les lignées, à l'exception des mutations causant la stérilité ou la mort. L'analyse des données permet ensuite d'estimer le taux de changement dans la moyenne et dans la variabilité des traits phénotypiques causés par les nouvelles mutations. Il est aussi possible d'inférer le taux de mutation soit en fonction des changements phénotypiques observés ou, plus directement, par séquençage des génomes (Haag-Liautard *et al.* 2007).

Cette technique s'avère aussi intéressante pour étudier les mécanismes d'accumulation de mutations dans le génome mitochondrial. En effet, en laissant les mutations s'accumuler de façon naturelle tout en permettant l'action des mécanismes potentiels de sélection de l'ADNmt au niveau cytoplasmique et cellulaire, nous croyons que les lignées MA

pourraient fournir un bon outil pour évaluer le rôle des mutations dans l'évolution des mitochondries.

Problématique

Les connaissances actuelles des effets phénotypiques des mutations spontanées se limitent essentiellement aux effets sur des traits liés à la valeur adaptative mesurés sur des lignées AM élevées en conditions standard de laboratoire. Par contre, on connaît peu les effets des mutations sur les traits physiologiques qui pourraient fournir un lien mécanistique entre génotype et phénotype. Les impacts des mutations sur les fonctions mitochondriales méritent une attention particulière en raison des rôles vitaux de ces organites et de leur plus grande susceptibilité à accumuler des mutations dans leur génome. Des populations considérées moins à risques d'accumuler des mutations (ex: sexuées de large taille effective) pourraient également être vulnérables à subir un déclin mutationnel suite à l'accumulation de mutations dans les parties non-recombinantes de leur ADN, comme leur génome mitochondrial (Lynch 1996, 2007).

Une bonne compréhension des effets phénotypiques des mutations spontanées et de leurs conséquences potentielles sur l'évolution des populations naturelles doit également tenir compte des conditions environnementales dans lesquelles les mutations sont induites et s'expriment. L'exposition à des stress environnementaux pourrait accélérer l'accumulation de mutations délétères et avoir un impact négatif sur la valeur adaptative des populations naturelles. Des conditions stressantes pourraient aussi révéler des effets négatifs de mutations (Elena et Visser 2003; Szafranec, Borts, et Korona 2001). Dans le contexte environnemental actuel de changements globaux, les effets des changements thermiques et de l'exposition accrue à des contaminants d'origine anthropiques sont particulièrement préoccupants.

Objectifs et hypothèses

La présente étude comporte trois objectifs principaux. Le premier est d'évaluer les effets de l'accumulation de mutations spontanées sur des traits liés la valeur adaptative et sur les fonctions mitochondriales. Le second objectif vise à tester l'impact de l'exposition à un contaminant environnemental génotoxique (le cuivre) durant un processus d'accumulation de mutations sur la distribution des effets mutationnels. Afin de tenir compte de la variabilité des effets mutationnels en fonction des paramètres environnementaux, le dernier objectif est de tester l'effet d'une exposition à un stress thermique sur l'expression phénotypique des mutations accumulées. Afin de répondre à ces objectifs, j'ai 1) mesuré et comparé les traits d'histoire de vie de lignées d'accumulation de mutations de *D. pulex* élevées en milieu bénin et en milieu enrichi en cuivre; 2) mesuré et comparé des traits liés au phénotype mitochondrial de ces mêmes lignées MA de *D. pulex* élevées ou non en présence de cuivre. Pour répondre au dernier objectif, 3) la majorité de ces mesures phénotypiques ont été faites à la fois à température optimale et stressante.

Hypothèse 1. L'accumulation de mutations spontanées se traduit généralement par des effets légèrement délétères sur les traits d'histoire de vie. Les daphnies des lignées MA auront une valeur adaptative moyenne plus faible que les daphnies contrôles.

Hypothèse 2. L'ADNmt est sensible à l'accumulation de mutations et des effets néfastes des mutations sur les fonctions mitochondriales ont été démontrés. Les daphnies des lignées MA auront conséquemment davantage de dysfonctions mitochondriales par rapport aux daphnies contrôles. Par contre, une absence de différences de phénotypes mitochondriaux entre les daphnies de lignées MA et contrôles pourrait s'expliquer par l'action de la sélection purifiante résultant en l'élimination efficace des mutations délétères dans l'ADNmt.

Hypothèse 3. Plusieurs effets génotoxiques du cuivre ont été documentés et il a été montré que l'exposition à ce métal peut accélérer le taux d'accumulation de certains types de mutations chez les *D. pulex* (Chain *et al.* 2018). Les daphnies des lignées MA élevées en

présence de cuivre auront une plus faible valeur adaptative moyenne et davantage de dysfonctions mitochondriales par rapport à celles élevées en milieu bénin.

Hypothèse 4. Les effets des mutations étant généralement exacerbés dans un environnement stressant, les effets phénotypiques des mutations spontanées seront exacerbés lorsque mesurés en conditions thermiques stressantes.

CHAPITRE 1

EFFETS DES MUTATIONS SPONTANÉES SUR LA VALEUR ADAPTATIVE DE *DAPHNIA PULEX* ÉLEVÉES EN MILIEUX BÉNIN ET CONTAMINÉ AU CUIVRE

1.1 INTRODUCTION

Les polluants libérés dans l'environnement par les activités humaines ont des effets à différents niveaux d'organisation biologique. Les effets toxiques des contaminants sur les fonctions cellulaires, la physiologie et le comportement des organismes ont été largement explorés (Wolfe, Schwarzbach, et Sulaiman 1998; Mineau 2005; Scott et Sloman 2004). Plus récemment, les impacts génétiques des polluants ont été examinés chez les populations naturelles (Bickham *et al.* 2000; Brady *et al.* 2017). Ces effets plus subtils des contaminants environnementaux sur le bagage génétique des populations peuvent avoir des effets à long terme sur leur potentiel évolutif. L'effet génétique le mieux documenté des contaminants est l'érosion génétique des populations suivant un goulot d'étranglement et/ou une sélection directionnelle générés par les effets toxiques des polluants (Van Straalen et Timmermans 2002; Matson *et al.* 2006; Coors *et al.* 2009; Ribeiro *et al.* 2012). Cette perte de diversité pourrait notamment favoriser la dépression consanguine ou encore limiter la réponse adaptative des populations à de futurs stress environnementaux (Brady *et al.* 2017). Une autre conséquence génétique potentielle des contaminants environnementaux serait une hausse du taux de mutations causée soit par une interaction directe des contaminant avec l'ADN (généotoxiques) (Bickham 2011) ou, indirectement, via une hausse du stress physiologique (Matsuba *et al.* 2012; Goho et Bell 2000).

Il a été montré que l'accumulation des mutations légèrement délétères sous l'effet de la dérive cause une diminution de la valeur adaptative moyenne (Halligan et Keightley

2009). Une hausse du taux de mutation induite par des contaminants pourrait conséquemment constituer une menace réelle pour les populations naturelles en exacerbant leur charge mutationnelle. Les effets des contaminants sur la charge mutationnelle pourraient s'amplifier suite à une réduction de la taille de population favorisant la dérive et la fixation aléatoire des nouvelles mutations. La synergie entre ces effets pourrait accélérer l'extinction de certaines populations par effondrement mutationnel (Bickham *et al.* 2000). Bien que plusieurs auteurs aient souligné l'importance théorique de ces effets des polluants, peu d'études empiriques se sont attardées à en mesurer les effets (Lynch, Conery, et Burger 1995a; Bickham *et al.* 2000; Ribeiro et Lopes 2013). Quelques études pionnières ont montré que l'exposition à des stress chimiques pouvait effectivement entraîner une hausse du taux de mutations héréditaires chez des modèles expérimentaux (Yauk *et al.* 2008; Chain *et al.* 2018; Jiang *et al.* 2014) et des populations naturelles d'oiseaux et de plantes (Yauk *et al.* 2000; Rogstad, Keane, et Collier 2003; King *et al.* 2014). D'autres études ont aussi suggéré, sans pouvoir le confirmer, qu'une hausse du taux de mutations pourrait expliquer en partie les patrons observés dans les changements de structure génétique de populations exposées à des contaminants environnementaux (Matson *et al.* 2006; Štambuk *et al.* 2013; Giska *et al.* 2015). Toutefois, les impacts de ces hausses de taux de mutations sur la valeur adaptative n'ont pas été directement testés dans ces études. Une bonne connaissance de la distribution des effets des mutations induites en présence de contaminants sur la valeur adaptative est pourtant essentielle pour bien comprendre leurs implications sur l'évolution à long terme des populations.

Dans mon étude, un modèle expérimental de lignées d'accumulation de mutations (lignées MA) a été utilisé afin de tester l'impact des mutations sur les traits phénotypiques en présence et en absence de cuivre. Dans ce type d'expérience, un seul descendant ou couple de descendants d'une couvée est conservé à chaque génération ce qui permet de propager une lignée d'organismes en réduisant la taille de population au maximum et d'ainsi limiter l'action de la sélection. La majorité des mutations peuvent alors s'accumuler sous l'effet de la dérive et il est ensuite possible de mesurer directement les taux de mutations et les effets de ces mutations sur les phénotypes et sur la valeur adaptative. Le contexte

expérimental offre également la possibilité de facilement manipuler les conditions environnementales dans lesquelles les mutations sont acquises et exprimées. Ici, les effets de l'accumulation de mutations hérissables sur les traits d'histoire de vie de lignées de *Daphnia pulex* élevées en milieu bénin et en milieu contaminé avec du cuivre ont été testés.

Le cuivre est un contaminant métallique qui, en concentration élevée dans l'environnement, représente une menace pour la santé des populations naturelles. C'est le cas des régions comme Rouyn-Noranda ou Sudbury au Canada où de nombreux métaux lourds ont été libérés par les activités anthropiques d'exploitation minière ou de transformation industrielle des métaux (Pearson, Gunn, et Keller 2002; Rajotte et Couture 2002). Dans les écosystèmes aquatiques de ces régions, des impacts négatifs de l'exposition à ces contaminants ont été observés sur le métabolisme, la condition générale et la structure génétique des populations de poissons (Rajotte et Couture 2002; Bourret *et al.* 2008). Comme pour de nombreux métaux lourds, les mécanismes de toxicité du cuivre incluent des dommages directs à l'ADN ainsi que la libération d'espèces réactives de l'oxygène pouvant causer des dommages à diverses biomolécules (Atienzar *et al.* 2001; Barata *et al.* 2005; Garceau, Pichaud, et Couture 2010). L'exposition chronique à ce contaminant pourrait donc affecter l'évolution des populations en augmentant leur taux de mutation. Des travaux précédents sur les mêmes lignées MA de daphnies que celles utilisées ici ont montré que l'exposition au cuivre se traduisait par un taux plus élevé de larges délétions dans les génomes des lignées MA Cu par rapport aux MA Ctrl (Chain *et al.* 2018). Ces travaux montrent que l'exposition à ce métal a un impact sur le taux d'au moins certains types de mutations spontanées, mais les effets phénotypiques de ces mutations n'ont pas été directement évalués.

Dans le cadre de cette étude, les traits phénotypiques des lignées MA élevées en milieu bénin (MA Ctrl) et en présence de cuivre (MA Cu) ont été mesurés. Ces valeurs ont été comparées à celles mesurées chez des daphnies isolées d'un groupe contrôle de grande taille n'ayant pas accumulé de mutations (N entre 100 et 250) (Flynn *et al.* 2017). Contrairement aux lignées MA où l'évolution est dominée par la dérive, dans ce groupe

contrôle (non-MA) c'est la sélection qui domine et qui assure l'élimination de la proportion importante des mutations qui ont des effets délétères. La comparaison de ces trois traitements a permis 1) d'identifier les impacts phénotypiques spécifiquement imputables aux nouvelles mutations dans les lignées MA et 2) de comparer les signatures phénotypiques des mutations spontanées générées en milieu optimal et en présence d'un stress induit par un contaminant métallique. La grande majorité des mutations non neutres ayant des effets délétères, il est attendu que les daphnies des deux traitements d'accumulation de mutations présentent une réduction de leur valeur adaptative moyenne par rapport au groupe contrôle non-MA où ces mutations sont moins facilement fixées en l'absence de goulot d'étranglement et plus efficacement éliminées par sélection purifiante. De plus, selon l'hypothèse que les contaminants génotoxiques comme le cuivre peuvent accélérer le taux de mutation et/ou modifier la signature mutationnelle en interagissant directement avec l'ADN ou en augmentant le niveau de stress physiologique, il est attendu que les lignées élevées en présence de cuivre présentent une plus importante réduction de leur valeur adaptative par rapport au contrôle avec sélection que les lignées élevées en milieu bénin.

Par ailleurs, une évaluation adéquate des effets phénotypiques des mutations devrait tenir compte de la variabilité de leur expression en fonction des conditions environnementales. Il a effectivement été montré que les conditions environnementales modulent la distribution de ces effets (Latta *et al.* 2015) et, en particulier, que les conditions stressantes pourraient exacerber les impacts des mutations (Shabalina, Yampolsky, et Kondrashov 1997; Vassilieva, Hook, et Lynch 2000; Matsuba *et al.* 2012). Les conditions environnementales naturelles étant plus variables et stressantes que celles du laboratoire, l'évaluation des impacts évolutifs des mutations nécessite une bonne compréhension de la dépendance environnementale des effets mutationnels. Il a été précédemment avancé que les expériences de lignées d'accumulation de mutations ne permettaient pas de mesurer efficacement les mutations dont les effets sont très petits (Baer *et al.* 2006; Denver *et al.* 2004; Eyre-Walker et Keightley 2007). Tester les impacts de l'accumulation de mutations dans des conditions plus stressantes pourrait permettre de révéler les effets de ces mutations

et de palier au biais de ce design expérimental. Afin de tenir compte de la dépendance environnementale des mutations, les effets phénotypiques cumulés des mutations ont été mesurés à une température optimale (18°C) ainsi qu'à une température plus élevée et stressante (27°C). Un autre objectif de cette étude est donc de tester les effets des nouvelles mutations sur la réponse plastique des daphnies face à un stress thermique. Il est attendu que les effets des mutations sur les traits soient plus importants à 27°C qu'à 18°C. Ceci devrait se traduire par une réduction moyenne des traits phénotypiques plus importante à 27°C qu'à 18°C ainsi que par une hausse de la variation inter-lignées des daphnies des lignées MA par rapport aux daphnies du contrôle non-MA.

1.2 MATERIEL ET METHODES

1.2.1 Expérience d'accumulation de mutations et contrôle avec compétition

Des daphnies issues de lignées d'accumulation de mutations élevées en milieu bénin ou en milieu enrichi de cuivre (Cu) et d'un élevage contrôle avec compétition (non-MA) ont été fournies par le laboratoire de Melania Cristescu de l'Université McGill et élevées tel que décrit par Flynn *et al.* (2017) (Figure 1). Les daphnies issues de l'expérience provenaient d'un clone de *D. pulex* asexué diploïde récolté dans l'étang Canard à Windsor, en Ontario (Lat. 42°12", Long. 82°98"). Pour chacun des groupes d'accumulation de mutations, 50 descendants de ce clone ont été isolés pour fonder 50 lignées. Chaque individu était élevé séparément dans un tube contenant 20 ml d'eau d'étang synthétique FLAMES (Celis-Salgado *et al.* 2008) non enrichie pour les MA Ctrl et enrichie d'une concentration sublétales de Cu de 40 µg L⁻¹ (Winner et Farrell 1976) pour les MA Cu. Cette concentration est équivalente, voire inférieure, à ce qui est retrouvé en milieu naturel contaminé (Lopes, Baird, et Ribeiro 2004; Pearson, Gunn, et Keller 2002; Yan *et al.* 2016). À chaque génération, un seul descendant était conservé aléatoirement pour poursuivre la lignée. La taille de la population effective de chaque lignée était ainsi maintenue à N=1, réduisant au

maximum l'effet de la sélection et permettant à toutes les mutations de s'accumuler dans les lignées, exceptions faites des mutations létales ou causant la stérilité. Parallèlement, un groupe contrôle a été établi en utilisant des descendants du même ancêtre commun. Les daphnies de ce groupe ont été élevées ensembles dans un aquarium contenant 15 L d'eau d'étang synthétique FLAMES. La taille de population de ce groupe était évaluée à 100-250 individus (Flynn et al. 2017). Les daphnies ainsi élevées étaient soumises aux effets de la compétition et de la sélection. Les lignées MA et le groupe contrôle non-MA étaient élevés dans les mêmes conditions standards, soit une température de 18°C, une photopériode avec un cycle de 12h jour/12h nuit et un régime d'alimentation contenant trois espèces d'algues (*Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.* et *Pseudokirchneriella sp.*).

1.2.2 Expérience sur les traits d'histoire de vie

Des daphnies issues de dix lignées MA Ctrl choisies aléatoirement (après en moyenne 123 générations), de dix lignées MA Cu choisies aléatoirement (après en moyenne 124 générations) ainsi que dix daphnies isolées du groupe contrôle non-MA ont été reçues de l'Université McGill au stade de juvéniles. Ces daphnies ont été immédiatement transférées dans des chambres expérimentales dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 40 mL d'eau synthétique FLAMES non enrichie. Elles ont été élevées dans les conditions standard auxquelles elles étaient déjà acclimatées pendant deux générations (Figure 1). Les daphnies du groupe contrôle non-MA ont aussi été élevées individuellement, en ne gardant qu'un seul descendant choisi aléatoirement entre les générations, afin de constituer dix pseudo-lignées contrôles appelées isolats. Seize nouveau-nés (moins de 24h) issus de la 2^e-5^e portée de la deuxième génération de chaque lignée MA ou isolat non-MA ont été isolés pour mesurer les traits d'histoire de vie à deux conditions thermiques différentes. Pour chaque lignée ou isolat, deux daphnies ont également été conservées pendant quelques jours à chacune des températures expérimentales comme réserves de secours. Au besoin, ces daphnies de réserve ont été utilisés pour remplacer les daphnies mortes (~5% des daphnies isolées) dans les quelques jours suivants leur transfert.

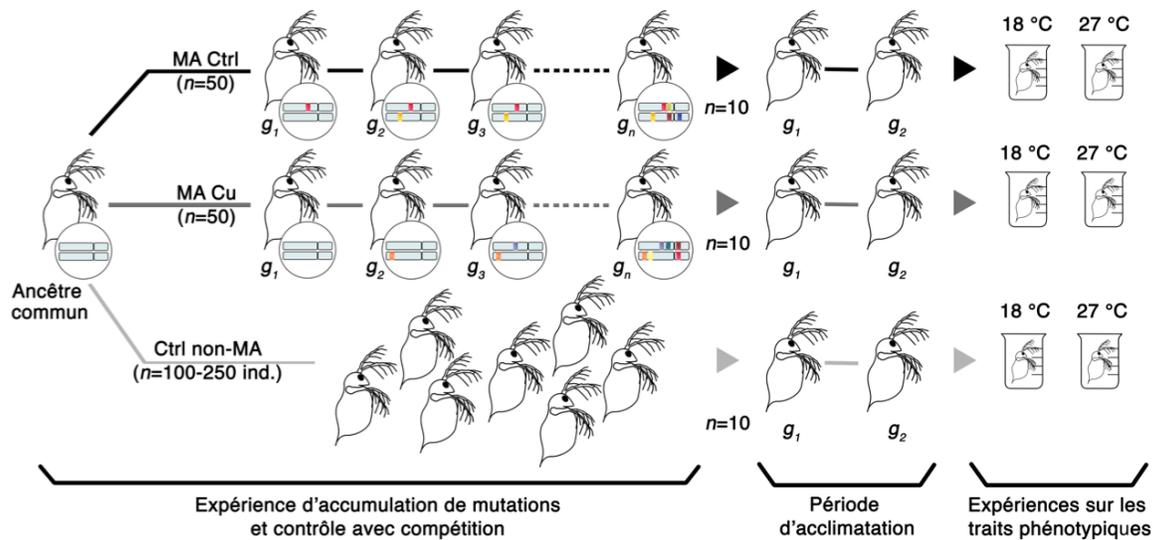


Figure 1 : Expérience d'accumulation de mutations chez les *D. pulex* se reproduisant de façon asexuée. Les descendants d'un ancêtre commun ont été utilisés pour fonder 50 lignées MA Ctrl et 50 lignées MA Cu. Les nouvelles mutations spontanées (représentées par les traits colorés) se sont accumulées de façon indépendante dans chaque lignée pendant environ 124 générations. Les descendants de dix lignées de chacun des traitements ainsi que dix individus issus du contrôle non-MA ont ensuite été échantillonnés pour évaluer les traits phénotypiques. Avant de procéder aux tests phénotypiques, ces descendants ont été acclimatés pendant deux générations aux conditions du nouveau laboratoire. La majorité des traits phénotypiques ont été testés en conditions thermiques optimales (18°C) et stressante (27°C), à l'exception de la respiration mitochondriale qui a uniquement été testée à 27°C (voir Chapitre 2). Figure adaptée de Halligan et Keightley 2009.

Pour l'expérience sur les traits d'histoire de vie, la moitié des nouveau-nés a été élevée à leur température d'acclimatation (18°C; n=8) et l'autre moitié à température élevée (27°C; n=8). La température élevée a été déterminée lors d'expériences préliminaires comme une température stressante, mais non létale pour ce clone de daphnies. Aux deux conditions thermiques, les daphnies étaient élevées de façon isolée dans des tubes Falcon de 50 ml contenant 40 ml d'eau synthétique FLAMES. Elles étaient soumises au même cycle de photopériode que précédemment et nourries avec le même mélange d'algues. Elles étaient

nourries tous les deux jours avec 800 μl d'un mélange à $\sim 1 \times 10^7$ cellules $\cdot \text{ml}^{-1}$. Les tubes étaient inspectés toutes les 24 h afin de surveiller l'apparition de nouveau-nés. La date de naissance des daphnies, les dates de libération des nouveau-nés pour les portées un à cinq, ainsi que le nombre de juvéniles vivants pour chacune de ces portées ont été enregistrés. Dans les cas où une daphnie mourait avant la cinquième portée, la date de décès était notée. Les juvéniles étaient retirés des tubes dans les 24 h suivant leur naissance.

1.2.3 Analyse des données

Les variables suivantes ont été retenues comme mesures des traits d'histoire de vie: âge à la libération de la première portée (âge 1^{ère} portée) et nombre moyen de juvéniles vivants par portée pour les portées deux à cinq (taille moyenne de portée). Pour la taille moyenne de portée, la première portée n'a pas été prise en compte puisque cette portée est généralement de taille plus faible et plus variable (Glazier 1992). Le taux de croissance intrinsèque de population (r) de chaque individu a également été calculé et utilisé comme estimation de la valeur adaptative des daphnies (Teschner 1995). Le r individuel a été calculé à partir des âges à la libération des juvéniles et des tailles des portées un à cinq en utilisant l'équation de Euler-Lotka:

$$\sum e^{-rx} l_x m_x = 1$$

où x est l'âge (en jours), l_x est la probabilité de survie au jour x et m_x la fertilité au jour x . Afin d'inclure les individus qui n'avaient produit aucun juvénile vivant avant leur décès, la valeur adaptative est présentée comme le taux de croissance fini de population (e^r) plutôt que r puisque les individus ne se reproduisant pas ont un r de $-\infty$. Les individus ne s'étant pas reproduits sont considérés comme ayant une valeur adaptative de $e^r=0$.

Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur les traits d'histoire de vie

L'effet du traitement évolutif (non-MA, MA Ctrl et MA Cu) sur les traits d'histoire de vie dans les deux environnements thermiques (18°C et 27°C) a été évalué par un modèle linéaire mixte en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance restreinte (REML) à l'aide du package nlme (Pinheiro et al. 2014) dans le logiciel R (version 3.3.2). Pour chacune des variables, le modèle $y = \text{Traitement} + \text{Lignée} (\text{Traitement}) + \varepsilon$ a été analysé indépendamment pour chacune des températures expérimentales. Le traitement est considéré comme un facteur fixe et la lignée comme un facteur aléatoire. Les conditions d'utilisation ont été validées graphiquement. Des comparaisons multiples (Tukey HSD) ont ensuite été effectuées pour déterminer quels traitements étaient significativement différents les uns des autres. Afin de tester si la moyenne des traits d'histoire de vie de chacune des vingt lignées MA (dix MA Ctrl et dix MA Cu) différait de la moyenne de l'ensemble des contrôles non-MA, des tests de Dunnett ont été réalisés pour chacune des combinaisons de variables phénotypiques et températures expérimentales. Pour chacun des traits sélectionnés, un test de Dunnett a aussi été effectué pour déterminer quelles lignées MA Cu étaient significativement différentes de la moyenne des lignées MA Ctrl.

Pour chaque variable, les variances intra- et inter-lignées de chaque combinaison de traitement évolutif (non MA, MA Ctrl, MA Cu) et de température expérimentale (18°C et 27°C) ont été extraites à partir d'un modèle linéaire généralisé mixte considérant les lignées comme facteur aléatoire, soit $y = \text{Lignée} + \varepsilon$. La variance intra-lignées (V_e) ainsi extraite représente la variance environnementale alors que la variance inter-lignée (V_L) représente la variance génétique au sein d'un traitement donné, à une température donnée. Les variances des groupes MA et non-MA ont été comparées à l'aide de tests de F. Un coefficient de variation génétique (CV_L) a été généré en normalisant la racine carrée de la V_L par la moyenne obtenue pour l'ensemble des lignées du traitement (Houle 1992).

Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur la plasticité des traits d'histoire de vie

Afin d'explorer la variabilité dans la plasticité phénotypique entre les lignées et isolats et entre les traitements évolutifs, des ANOVA et des modèles linéaires mixtes ont été utilisés pour estimer les valeurs de p des interactions génotype \times environnement ($G \times E$). Pour tester si les traitements d'accumulation de mutations engendraient des différences dans la réponse des lignées aux variations thermiques, la significativité des interactions $G \times E$ a été estimée pour des modèles linéaires mixtes avec le traitement (non-MA, MA Ctrl, MA Cu), la température (18°C et 27°C) et leur interaction comme facteurs fixes et la lignée nichée dans le traitement comme facteur aléatoire: $y = \text{Traitement} + \text{Température} + \text{Traitement} \times \text{Température} + \text{Lignée}(\text{Traitement}) + \varepsilon$. Pour évaluer la variabilité de la plasticité des lignées à l'intérieur de chacun des traitements, des ANOVA à deux facteurs fixes ont ensuite été utilisées: $y = \text{Lignée} + \text{Température} + \text{Lignée} \times \text{Température} + \varepsilon$. Une interaction significative indiquait que les normes de réactions des lignées différaient entre elles, entraînant soit un changement dans l'ordination des moyennes des lignées ou dans la variance inter-lignées entre les deux environnements thermiques (Windig, De Kovel, et De Jong 2004; Latta et al. 2015). Afin de confirmer la présence de variabilité dans les réponses plastiques des différentes lignées, les normes de réaction ont été inspectées visuellement. De plus, afin de préciser quels types de variations de plasticité étaient présents entre les lignées, l'inspection visuelle des normes de réaction a été combinée à la comparaison des variances inter-lignées entre les deux températures effectuées à l'aide de tests de F pour chaque traitement. La corrélation génétique entre les deux environnements thermiques a été évaluée en utilisant les moyennes phénotypiques des lignées pour calculer un coefficient de corrélation de Spearman (Astles, Moore, et Preziosi 2006).

1.3 RESULTATS

1.3.1 Impacts du traitement d'accumulation de mutations en milieu bénin sur les traits d'histoire de vie et la valeur adaptative

Les moyennes des traits d'histoire de vie des lignées d'accumulation de mutations élevées en milieu bénin différaient très peu des lignées contrôles (Figure 2). À 18°C, l'âge à la première portée, le nombre moyen de juvéniles par portée et l'indice de valeur adaptative des MA Ctrl n'étaient pas différents de ceux des non-MA (Tukey, $p = 0,681$; $p = 1,000$; $p = 0,801$). À 27°C, les lignées MA Ctrl ne différaient toujours pas significativement des non-MA pour ces trois variables ($p = 0,941$; $p = 0,130$; $p = 0,999$). Par contre, le nombre moyen de juvéniles par portée tendait à être plus petit chez les MA Ctrl par rapport aux non-MA (~24%, correspondant à environ 3,5 juvéniles de moins par portée).

La lignée C14 du groupe MA Ctrl se distinguait particulièrement des autres lignées suite à l'accumulation de mutations (Figure 3). Cette lignée produisait significativement moins de descendants que la moyenne des isolats non-MA à 18°C (Dunnett's tests, $p < 0,001$). A 27°C, elle produisait moins de juvéniles, avait un âge plus tardif à la maturité et présentait un fitness moins élevé (respectivement $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,003$). La lignée C35 avait une taille moyenne de portée plus grande que la moyenne des non-MA à 18°C ($p = 0,039$; Figure 3).

Les variances génétiques des traits d'histoire de vie différaient entre ces traitements (Tableau 1). À 18°C, contrairement à ce qui est généralement observé, la variance inter-lignées était légèrement plus faible pour les daphnies ayant accumulé des mutations que les non-MA pour l'âge à la première portée ($p = 0,029$) et la valeur adaptative ($p = 0,012$). Toutefois, le groupe MA Ctrl avait une variance génétique significativement plus élevée que le groupe non-MA pour la taille moyenne de portée à 18°C ($p = 0,017$) ainsi que pour l'âge à première portée et la valeur adaptative à 27°C (respectivement $p = 0,001$ et $p =$

0,003). Ces différences de variances traduisent principalement la présence d'une ou plusieurs lignées MA Ctrl se distinguant de la moyenne du traitement (C14 et C35).

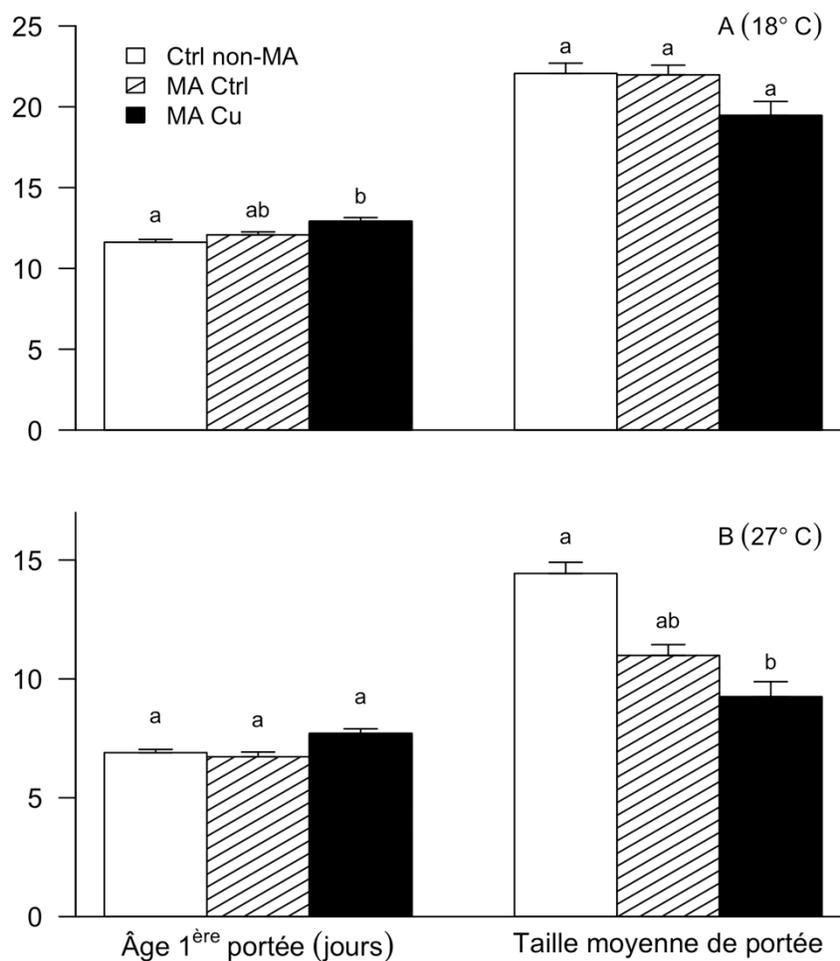


Figure 2 : Traits d'histoire de vie des daphnies issues des différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu; moyennes \pm erreurs types). Les traits d'histoire de vie ont été mesurés en conditions thermiques optimale (A) et stressante (B). Pour chaque combinaison de traits et de conditions thermiques, les groupes significativement différents entre eux sont identifiés par des lettres différentes (Tukey HSD).

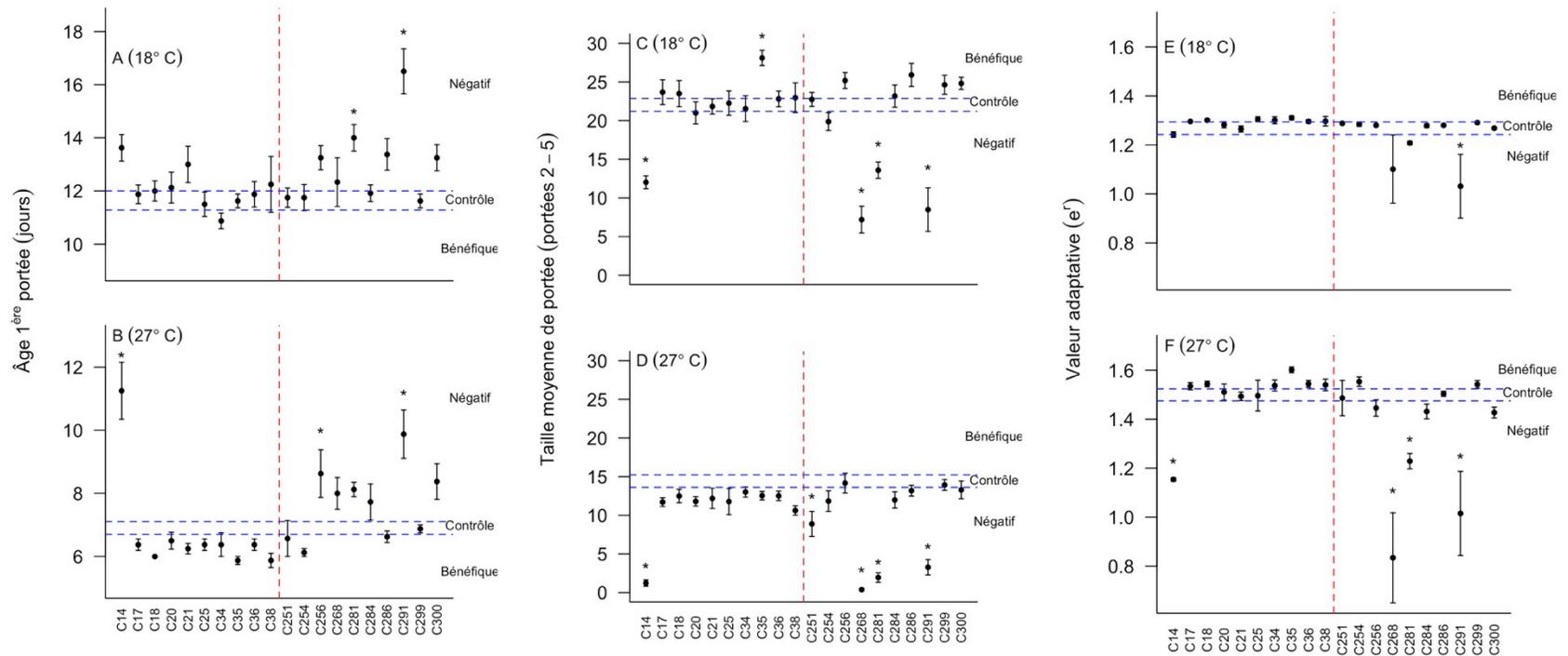


Figure 3 : Traits d'histoire de vie (moyenne \pm erreur type) pour chacune des lignées MA de daphnies élevées à 18°C (A, C, E) et 27°C (B, D, F). Les lignées C14 à C38 ont accumulé des mutations en milieu bénin (MA Ctrl) et les lignées C251 à C300 ont accumulé des mutations en milieu enrichi de cuivre (MA Cu). Les lignes pointillées bleues représentent la moyenne \pm l'erreur type des isolats contrôles non-MA. Une plus grande taille moyenne de portée, une première reproduction plus hâtive et une valeur adaptative plus grande que la moyenne des contrôles sont considérées comme des changements ayant des impacts «bénéfiques» pour les daphnies alors que l'inverse est considéré comme des changements dont les impacts sont «négatifs». Les lignées dont la moyenne diffère significativement de la moyenne des isolats contrôles non-MA sont marquées d'un * (test de Dunnett, $p < 0,05$).

Tableau 1 : Moyennes \pm écarts types, variances génétiques (inter-lignées, V_L), coefficients de variation génétique (CV_L) et variances environnementales (intra-lignées, V_e) des traits d'histoire de vie des daphnies issues de trois différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu) à 18°C et 27°C.

	Temp.	Traitement	Moyenne \pm SE	V_L	CV_L (%)	V_e
Âge à première portée (jours)	18°C	non-MA	11,62 \pm 0,17	1,13*	9,14	1,26
		MA Ctrl	12,08 \pm 0,18	0,29 ^a	4,48 (i)	2,41 ^a
		MA Cu	12,92 \pm 0,23	1,91* ^b	10,70	2,62 ^a
	27°C	non-MA	6,90 \pm 0,13	0,264*	7,44	1,18
		MA Ctrl	6,73 \pm 0,20	2,457* ^a	23,31 (i)	0,98
		MA Cu	7,71 \pm 0,19	1,045* ^a	13,26 (i)	2,13 ^a
Taille moyenne portée (portées 2 à 5)	18°C	non-MA	22,06 \pm 0,64	3,12	8,01	29,91
		MA Ctrl	21,97 \pm 0,60	14,08* ^a	17,08 (i)	16,06 ^a
		MA Cu	19,46 \pm 0,87	48,79* ^{ab}	35,90 (i)	20,26 ^a
	27°C	non-MA	14,44 \pm 0,47	4,78*	15,14	13,29
		MA Ctrl	10,99 \pm 0,46	11,40*	30,73	6,14 ^a
		MA Cu	9,25 \pm 0,64	27,76* ^a	56,98 (i)	8,95
Valeur adaptative (e^r)	18°C	non-MA	1,27 \pm 0,02	<0,01	3,14	0,04
		MA Ctrl	1,29 \pm 0,00	<0,001* ^a	1,37 (i)	<0,01 ^a
		MA Cu	1,23 \pm 0,02	<0,01* ^b	5,53	0,04
	27°C	non-MA	1,50 \pm 0,02	<0,01	2,91	0,03
		MA Ctrl	1,50 \pm 0,02	0,02* ^a	8,08 (i)	<0,01 ^a
		MA Cu	1,34 \pm 0,04	0,05* ^{ab}	16,90 (i)	0,07 ^a

*Indique une variance inter-lignées significative (ANOVA, $p < 0,05$).

^a Indique une différence significative de ce traitement MA par rapport au traitement non-MA (F-test, $p < 0,05$) et la flèche souligne le sens de cette différence.

^b Indique une différence significative du traitement MA Cu par rapport au traitement MA Ctrl (F-test, $p < 0,05$).

1.3.2 Impacts du traitement d'accumulation de mutations en présence de cuivre sur les traits d'histoire de vie et la valeur adaptative

À 18°C, les MA Cu avaient un âge à la première reproduction plus tardif que les non-MA avec une hausse de ~11% de l'âge à première portée (Tukey, $p = 0,044$; Figure 2A). Un délai significatif dans l'âge de reproduction des lignées MA Cu était aussi maintenu dans les quatre portées subséquentes (données non présentées). À 27°C, la taille moyenne des

portées des MA Cu était significativement inférieure à celle des contrôle non-MA avec des portées en moyenne 36% plus petites ($p = 0,011$, Figure 2B). La valeur adaptative des lignées MA Cu ne différait pas significativement des non-MA, mais démontrait une légère tendance à être plus faible lorsque mesurée à 27°C (~11%, $p = 0,093$; Figure 2B).

Trois des dix lignées MA Cu (C268, C281 et C291) différaient de la moyenne des non-MA pour plusieurs traits d'histoire de vie (Figure 3). Ces lignées étaient moins performantes que la moyenne des non-MA, avec notamment une taille moyenne de portée plus faible à 18 et 27°C (Dunnett's tests, $p < 0,001$) et, dans certains cas, un délai dans l'âge à la première portée. Ces impacts négatifs se sont traduits par des valeurs adaptatives plus faibles pour la lignée C291 à 18°C ($p < 0,001$) et pour ces trois lignées à 27°C (respectivement $p < 0,001$; $p = 0,045$; $p < 0,001$). À 27°C, la lignée C251 avait également une taille moyenne de portée plus faible que la moyenne des non-MA ($p < 0,001$) alors que la lignée C256 présentait un âge à première portée plus élevé ($p = 0,050$). Par rapport aux moyennes des MA Ctrl, C291 était moins performante pour tous les traits d'histoire de vie, C268 et C281 avaient une taille moyenne de portée plus faible à 18 et 27°C et C268 avait une valeur adaptative plus faible à 27°C (Dunnett's tests, $p \leq 0,017$).

La variance inter-lignées du traitement MA Cu était généralement plus importante que celles des traitements non-MA et MA Ctrl (Tableau 1). À 18°C, la variance de ce groupe était plus importante que celle des MA Ctrl pour les trois traits analysés et plus élevée que les non-MA pour la taille moyenne de portée. A 27°C, les lignées MA Cu présentaient une V_L plus élevée que les isolats non-MA pour l'âge à première portée et la taille moyenne de portée et une V_L plus élevée que les non-MA et les MA Ctrl pour leur valeur adaptative. Malgré les différences de V_L entre les groupes MA (Cu et Ctrl) et non-MA, il est à noter que la composante inter-lignées de la variance était significative pour tous les traitements, y compris les daphnies non-MA, pour l'âge à la première portée et la taille moyenne de portée (ANOVA, $p < 0,05$).

1.3.3 Impacts des traitements d'accumulation de mutation sur la plasticité thermique

Les modèles linéaires mixtes analysés pour tester la variabilité de plasticité entre les groupes expérimentaux indiquaient que l'environnement thermique avait un effet significatif ($p < 0,001$) alors que le traitement n'avait pas d'effet significatif pour aucune des variables analysées ($p = 0,166$ pour taille moyenne de portée; $p = 0,065$ pour âge à première portée et $p = 0,091$ pour valeur adaptative). Lorsque les traits phénotypiques étaient mesurés à température élevée, les daphnies de tous les traitements évolutifs avaient en moyenne un âge de reproduction plus précoce, une taille moyenne de portée plus petite et un indice de valeur adaptative plus élevé que celles testées aux conditions régulières d'élevage à 18°C. Des corrélations génétiques fortes et significatives entre les moyennes des lignées MA Cu aux deux températures ont été mesurées pour les trois traits (Tableau 2). Au sein du traitement MA Ctrl, une corrélation significative entre environnements était détectée entre les lignées pour la valeur adaptative uniquement. Les isolats non-MA n'affichaient pas de corrélation génétique significative entre les environnements. Cette absence de corrélation coïncide avec l'observation visuelle d'une plus grande occurrence de changements de rangs des génotypes entre les environnements pour ce groupe que pour les traitements MA.

L'interaction $G \times E$ entre l'environnement thermique et le traitement évolutif n'était pas significative pour l'âge à première portée ($p = 0,104$). En effet, les pentes descendantes sont similaires dans les trois groupes pour cette variable (Figure 4). Les traitements évolutifs avaient par contre un impact sur la réponse plastique de la taille moyenne de portée et la valeur adaptative des daphnies face à un stress thermique (interactions $G \times E$ significatives, $p < 0,001$; $p = 0,007$; Figure 5 Figure 6). Pour la taille moyenne de portée, la différence significative d'interaction $G \times E$ entre les traitements évolutifs se traduit par des normes de réactions plus marquées pour les traitements MA que le contrôle non-MA, indiquant une réponse plus négative de cette variable au stress thermique pour les génotypes ayant accumulé des mutations (Figure 5). Dans le cas de la valeur adaptative, les

réponses plastiques des lignées MA sont plus variables que celles des contrôle non-MA, particulièrement au sein du traitement MA Cu (Figure 6). Pour cette variable, les deux traitements MA ont d'ailleurs une interaction entre les lignées et la température significative contrairement au traitement non-MA (Tableau 3). Dans les lignées MA Ctrl, la lignée C14 se distingue avec une pente descendante indiquant une perte de valeur adaptative marquée en réponse à la température élevée par rapport aux autres lignées. Dans le traitement MA Cu, huit des dix lignées ont des pentes ascendantes, mais l'inclinaison de ces pentes est plus variable, indiquant aussi une réponse plastique plus variable entre les génotypes. De plus, deux des lignées (C291 et C268) sont davantage affectées négativement par le stress thermique et ont des pentes descendantes.

Tableau 2 : Corrélations génétiques entre les deux environnements thermiques (18°C et 27°C). Les résultats sont présentés comme le coefficient de corrélation de Spearman entre les moyennes des lignées ou isolats pour chaque traitement évolutif. Les corrélations significatives sont en gris dans le tableau.

	Âge à première portée	Taille moyenne de portée (portées 2 à 5)	Valeur adaptative (e ^l)
Ctrl non-MA	0,207 (p = 0,567)	0,442 (p = 0,204)	0,527 (p = 0,123)
MA Ctrl	0,113 (p = 0,755)	0,212 (p = 0,560)	0,661 (p = 0,044)
MA Cu	0,689 (p = 0,028)	0,891 (p = 0,001)	0,927 (p < 0,001)

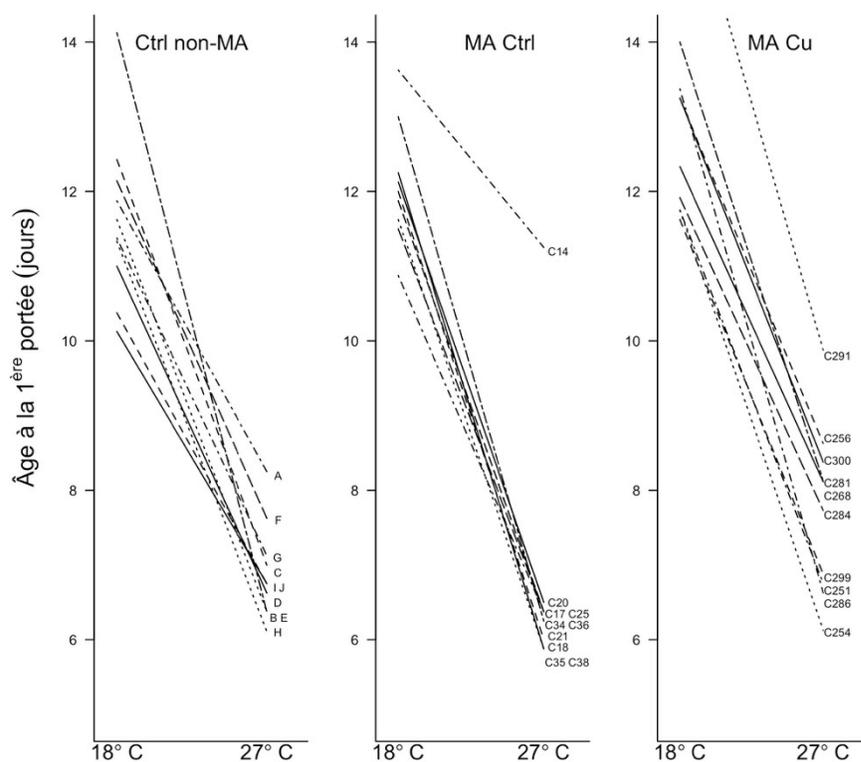


Figure 4 : Plasticité thermique de l'âge moyen à la première portée des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes ($n = 8$) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture.

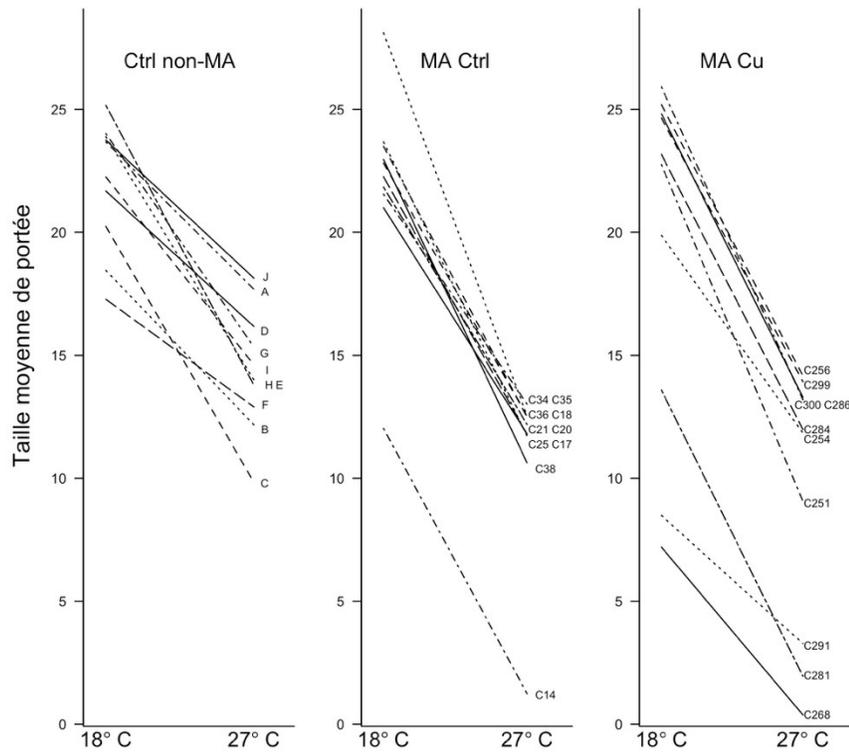


Figure 5 : Plasticité thermique de la taille moyenne de portée (portée 2 à 5) des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes ($n = 8$) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture.

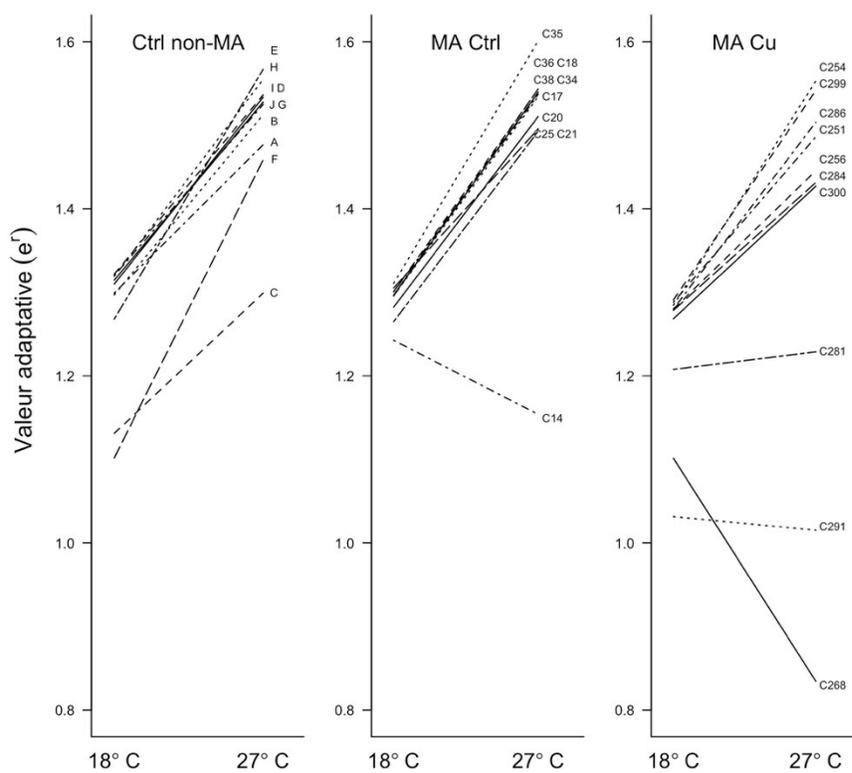


Figure 6 : Plasticité thermique de la valeur adaptative des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes ($n = 8$) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture.

Tableau 3 : Valeurs de p des analyses de plasticité thermique des traits d'histoire de vie des lignées à l'intérieur de chacun des traitements évolutifs. Une interaction significative ($p < 0,05$) indique des différences entre les réponses plastiques des lignées d'un traitement. Les résultats du F-test (valeurs de p) indiquent si les variances inter-lignées entre les deux températures sont significativement différentes ($p < 0,05$) ou non pour chaque variable de chaque traitement évolutif.

	Traitement	ANOVA			F-TEST
		Temp.	Lignée	G x E	V_L (18 - 27 °C)
Âge à première portée	Ctrl non-MA	<0,001	<0,001	<0,001	0,021
	MA Ctrl	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
	MA Cu	<0,001	<0,001	0,158	0,191
Taille moyenne portée (portées 2 à 5)	Ctrl non-MA	<0,001	<0,001	0,361	0,268
	MA Ctrl	<0,001	<0,001	0,183	0,379
	MA Cu	<0,001	<0,001	0,028	0,207
Valeur adaptative (e')	Ctrl non-MA	<0,001	0,014	0,958	0,393
	MA Ctrl	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	MA Cu	<0,001	<0,001	0,027	<0,001

1.4 DISCUSSION

1.4.1 Effets phénotypiques des mutations accumulées en milieu bénin

Une hausse de la variance phénotypique est généralement attendue dans les expériences d'accumulation de mutations parce que de nouvelles mutations peuvent se déposer de façon indépendante dans les différentes lignées (Latta et al. 2015). Les variances des lignées MA Ctrl étaient généralement significatives, mais une hausse de la V_L par rapport au groupe contrôle n'était observée que pour certaines combinaisons de traits et d'environnements. La nature du contrôle utilisé explique la difficulté à détecter la hausse de

variance mutationnelle au sein des lignées MA. Les daphnies utilisées comme contrôle non-MA étaient issues d'un traitement laissant agir la sélection plutôt que de clones d'un ancêtre commun comme c'est souvent le cas dans les expériences d'accumulation de mutations. Dans un tel contrôle avec sélection, les mutations délétères peuvent être éliminées, alors que les rares mutations bénéfiques ou les mutations neutres dans les conditions d'élevage peuvent être conservées. Des analyses génomiques réalisées précédemment sur les lignées MA et les daphnies contrôles utilisées ici avaient effectivement montré des évidences de sélection purifiante dans le groupe non-MA (Flynn *et al.* 2017). Ces mêmes analyses avaient aussi révélé une diversité génétique significative au sein de la population contrôle non-MA. Selon Flynn *et al.* (2017), cette diversité génétique aurait été maintenue au sein du contrôle non-MA par sélection équilibrante. Ce patron génétique concorde avec le fait que les traits phénotypiques du groupe non-MA présentaient une plus grande variabilité que ce qui est généralement attendu, du moins dans les cas où des contrôles ayant conservé le génotype ancestral sont utilisés (par exemple dans Baer *et al.* 2005). La capacité limitée à mesurer une hausse de la variance mutationnelle par rapport au contrôle ne signifie donc pas qu'il n'y a pas eu hausse de la variabilité génétique des lignées par rapport au génotype ancestral. La présence de lignées (par exemple C14 et C35) se distinguant significativement de la moyenne du contrôle non-MA malgré la grande variabilité de ce-dernier appuie la présence d'une hausse de la variance mutationnelle générée dans les lignées.

Contrairement à ce qui était attendu, l'accumulation de mutations ne s'est pas traduite par une réduction significative de la valeur moyenne des traits phénotypiques étudiés chez les MA Ctrl par rapport au contrôle non-MA, ni en conditions optimales, ni en conditions stressantes. La difficulté à détecter des effets des mutations spontanées n'est pas exceptionnelle et plusieurs études de lignées MA n'ont pas observé de baisse de valeur adaptative suite à l'accumulation de mutations (Shaw, Byers, et Darmo 2000; Krasovec *et al.* 2016). Deux raisons principales ont été invoquées par ces études pour expliquer l'incapacité des données à révéler un effet mutationnel sur les moyennes des lignées. Premièrement, cela pourrait être dû à un taux de mutations très faible (Krasovec *et al.* 2016). Cette hypothèse n'est pas fortement supportée par le taux de mutations nucléotidique

(μ) des lignées de daphnies utilisées pour cette étude qui a été estimé par séquençage à $2,3 \times 10^{-9}$ /génération (Flynn *et al.* 2017). Des taux de mutations de cet ordre de grandeur ont déjà été associés à des déclin de la valeur adaptative moyenne chez des lignées d'accumulation de mutations de *Caenorhabditis elegans* (Denver *et al.* 2009; Baer *et al.* 2006) et *Drosophila melanogaster* (Keightley *et al.* 2009; Schridder *et al.* 2013; Fry *et al.* 1999). Deuxièmement, une absence d'effets phénotypiques par rapport au contrôle non-MA pourrait aussi s'observer si les mutations accumulées sont sans effet (neutres) sur les traits mesurés ou encore ont des effets trop faibles pour être décelés (Shaw, Byers, et Darms 2000). Pour les traits étudiés, la quasi absence de lignées MA se distinguant significativement de l'éventail des phénotypes observés au sein du groupe contrôle soumis à la sélection (exceptions faites de C35 et C14) suggère que la majorité des effets cumulés des mutations spontanées étaient effectivement soit neutres ou suffisamment faibles pour être invisibles à la sélection purifiante, au moins en conditions bénignes. Certaines évidences tendent toutefois à réfuter l'hypothèse des mutations neutres. Une diminution non statistiquement significative mais biologiquement non négligeable de la taille moyenne de portée des daphnies MA Ctrl était observée à 27°C (~3,5 juvéniles par portée). Ceci suggère que les lignées MA Ctrl ont accumulé des mutations ayant des effets très légèrement délétères au moins pour cette variable. Le déclin mutationnel pour ce trait est d'ailleurs du même ordre de grandeur (autour de 0,1 - 0,2% par génération) que ce qui a été rapporté pour d'autres espèces soumises à des traitements d'accumulation de mutations (par exemple Vassilieva *et al.* 2000; Fry *et al.* 1999). De plus, une des dix lignées étudiées (C14) présentait un déclin phénotypique important et significatif au niveau de tous les traits mesurés, au moins à 27°C. Les résultats de la présente étude sont donc semblables à ceux d'un grand nombre d'études sur des lignées MA qui ont montré que la majorité des mutations non neutres avaient des effets légèrement délétères (Lynch *et al.* 1998; Vassilieva, Hook, et Lynch 2000; Baer *et al.* 2006; Shabalina, Yampolsky, et Kondrashov 1997; Fry *et al.* 1999; Schultz, Lynch, et Willis 1999). La variabilité importante entre les isolats du traitement contrôle pourrait expliquer le manque de résolution des analyses

statistiques à déceler un effet mutationnel par rapport à la majorité des études d'accumulation de mutations qui utilisent des contrôles ancestraux peu variables.

1.4.2 Effets phénotypiques des mutations accumulées en présence de cuivre

Tel qu'attendu, les lignées ayant accumulé des mutations en présence de Cu montraient davantage d'impacts phénotypiques négatifs par rapport au groupe contrôle que les lignées MA élevées en milieu bénin. Ce déclin des traits phénotypiques était significatif pour l'âge à première portée à 18°C et pour la taille moyenne de portée à 27°C. De plus, cinq des dix lignées MA Cu montraient un phénotype plus faible que la moyenne du groupe contrôle pour au moins une combinaison de trait et d'environnement et trois de ces lignées avaient des phénotypes fortement diminués pour tous les traits mesurés. C'est environ le triple de ce qui était observé dans les lignées MA Ctrl. Ces changements indiquent que l'exposition à des concentrations environnementales de cuivre peut accentuer l'ampleur des effets phénotypiques des mutations spontanées se fixant dans les populations.

Les impacts négatifs observés sur le phénotype des lignées MA Cu pourraient avoir été générés parce que le cuivre cause –directement ou indirectement– une hausse globale du taux de mutations nucléotidique venant gonfler la charge mutationnelle. Il se pourrait également que le cuivre favorise l'apparition de certains types de mutations avec des effets délétères individuels plus importants. Les résultats de la présente étude ne permettent pas d'établir une corrélation entre les effets phénotypiques et le taux ou le type de mutations. Toutefois, le parallèle entre nos résultats phénotypiques et les données génomiques recueillies précédemment sur les mêmes lignées par Chain *et al.* (2018) suggère que la hausse du taux d'un type spécifique de mutations, les CNVs (*copy-number variations*, c'est-à-dire des duplications, délétions ou insertions de larges séquences d'ADN), pourrait expliquer en partie les différences phénotypiques observées entre les MA Ctrl et les MA Cu par rapport au contrôle non-MA. Les travaux de Chain *et al.* (2018) ont en effet montré que les lignées Cu avaient des contenus de CNVs plus élevés que les isolats non-MA et plus de

larges délétions que les lignées MA Ctrl. Cette différence est essentiellement ce qui distinguait les patrons d'accumulation de mutations des deux traitements MA puisque leurs taux de mutations pour les SNMs (mutations d'un seul nucléotide) et INDELs (insertions ou délétions de courtes séquences d'ADN) n'étaient pas significativement différents. Trois des quatre lignées sur lesquelles des CNVs ont été détectés par Chain *et al.* (2018) ressortent également dans notre étude comme ayant un phénotype plus faible que la moyenne des contrôles pour au moins un trait analysé (C251, C281, C291). De façon notable, la lignée C291 est à la fois la lignée qui montre le plus souvent une différence phénotypique et la seule pour laquelle des délétions homozygotes au niveau de gènes ont été identifiées. Parmi les lignées qui se démarquent par une baisse de valeur adaptative on retrouve également la lignée Cu C268 qui ne figurait pas dans l'échantillon de Chain *et al.* (2018) et la lignée Ctrl C14 qui, elle, n'avait pas de CNVs après environ 100 générations. Il ne peut toutefois pas être exclu que cette lignée ait pu subir une ou des délétions ou duplications de larges séquences au cours de la vingtaine de générations séparant ce moment et les tests phénotypiques. Les CNVs ont déjà été identifiées comme des mutations d'intérêt dans l'étude des effets mutagènes des contaminants environnementaux en raison de leurs contributions reconnues à de nombreuses pathologies humaines et de la propension de plusieurs polluants à causer des lésions à l'ADN pouvant mener à leur formation (Singer et Yauk 2010). La relation entre les CNVs et le déclin des traits d'histoire de vie des lignées MA exposées au cuivre mériterait d'être investigué davantage.

Alors que plusieurs évidences pointent vers un rôle potentiel des CNVs dans les effets phénotypiques observés, celui des mutations de type SNMs ou INDELs est moins clair. Les daphnies issues des lignées MA Cu et MA Ctrl avaient généralement accumulé plus des mutations de type SNMs ou INDELs que les daphnies isolées du contrôle non-MA (Flynn *et al.* 2017; Chain *et al.* 2018). Toutefois, l'absence de différence significative entre les groupes non-MA et MA Ctrl suggère que l'accumulation de ces mutations dans les lignées MA Ctrl n'a effectivement généré que peu ou pas d'effets phénotypiques. Ce type de mutations pourrait donc n'avoir qu'un impact limité sur les traits phénotypiques des daphnies étudiées. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Kraemer *et al.* (2017)

qui observaient une corrélation entre le nombre total de mutations et les effets phénotypiques, mais aucune corrélation entre les mutations de type SNMs ou INDELs et ces effets.

Nos résultats et ceux de Chain *et al.* (2018) appuient l'hypothèse selon laquelle l'exposition à des contaminants environnementaux tels que le cuivre peut affecter négativement la valeur adaptative des populations en augmentant le taux de mutations délétères (Baer *et al.* 2006; Ribeiro et Lopes 2013). Toutefois, les effets phénotypiques enregistrés dans les lignées MA Cu pourraient être essentiellement imputables à quelques mutations de plus larges effets. La hausse des effets mutationnels observée lorsque l'environnement est enrichi de cuivre pourrait donc être largement expliquée par un changement dans le type de mutations induites favorisant certaines mutations plus délétères et non uniquement par une hausse générale du taux de mutations nucléotidiques. La distinction entre ces patrons de mutations est importante puisqu'ils ont des conséquences évolutives possiblement très différentes. Par exemple, si seules quelques mutations expliquent la majorité de la variation phénotypique observée entre les lignées MA Cu, la sélection purifiante contre ces mutations sera facilitée (Vassilieva, Hook, et Lynch 2000; Eyre-Walker et Keightley 2007; Schrider *et al.* 2013). De plus, si les principaux effets mutationnels héréditaires des polluants environnementaux sont principalement causés par des changements dans les patrons de mutations et non dans le taux global de mutations nucléotidiques, cela remet en question la pertinence de certaines approches se basant sur des mutations dans des régions non-codantes (ex: minisatellites) comme estimateurs des impacts de l'exposition à des contaminants environnementaux sur la valeur adaptative des populations naturelles (par exemple Yauk *et al.* 2000).

1.4.3 Effets du stress thermique sur l'expression phénotypique des mutations

Afin d'estimer les effets phénotypiques des mutations spontanées de façon plus complète et de tenir compte de la variabilité environnementale de ces effets, les traits

d'histoire de vie ont été mesurés à la fois en conditions thermiques optimale et stressante. La présence d'interactions significatives entre le traitement évolutif et l'environnement thermique pour la taille de portée et de valeur adaptative indique que certains effets mutationnels dépendaient de l'environnement thermique. Tel que prédit, pour ces deux traits, le principal effet de l'exposition à un stress était l'exacerbation des effets délétères cumulés des mutations spontanées. De nombreux travaux sur des lignées d'accumulation de mutations ont également montré une telle tendance des environnements stressants à exacerber les effets phénotypiques des mutations délétères (Kondrashov et Houle 1994; Shabalina, Yampolsky, et Kondrashov 1997; Vassilieva, Hook, et Lynch 2000; Szafraniec, Borts, et Korona 2001) et même à révéler des effets mutationnels invisibles en conditions standards (Krasovec *et al.* 2016). Dans notre étude, la hausse thermique a permis de détecter davantage d'effets phénotypiques délétères des nouvelles mutations sur la taille moyenne de portée, autant chez les lignées MA Ctrl que MA Cu. Dans les deux traitements, l'exposition au stress thermique se traduisait de façon similaire par une augmentation du taux de déclin mutationnel d'environ 24%. Dans le cas de l'indice composite de valeur adaptative (e^r), les conditions environnementales stressantes amplifiaient davantage les effets mutationnels délétères observés chez certaines lignées MA Ctrl et MA Cu. Ceci se traduisait par une hausse significative de la variance génétique à 27°C ce qui est attendu dans les conditions environnementales permettant de révéler davantage d'effets mutationnels (Krasovec *et al.* 2016).

Alternativement, pour l'âge à première portée, l'impact de la hausse de température était proportionnel pour tous les traitements (interaction GxE non significative). De manière générale le stress thermique n'engendrait donc pas d'augmentation des effets mutationnels négatifs observés pour cette variable dans le traitement MA Cu, ni ne permettait de révéler des mutations cryptiques agissant sur ce trait dans le traitement MA Ctrl. Notons toutefois l'exception apparente de la lignée C14 dont le retard léger pour l'âge à maturité à 18°C était fortement amplifié à 27°C. L'absence de différences entre les réponses plastiques des traitements MA et non-MA pour cette variable va dans le sens des études antérieures qui n'avaient pas détecté d'évidences d'une influence négative du stress

environnemental sur l'effet cumulatif des nouvelles mutations (Fry & Heinsohn 2002; Baer *et al.* 2006; Kraemer *et al.* 2017). Aussi, si nos résultats montrent que les effets des mutations délétères sont effectivement généralement amplifiés en conditions stressantes, ils appuient également les conclusions d'études plus récentes qui montrent que la dépendance environnementale de l'expression phénotypique des mutations est plus complexe que ce qui était précédemment considéré. Ces études montrent que l'accumulation de mutations entraîne des réponses plastiques variables d'un environnement à l'autre (Elena et Visser 2003) et d'un trait phénotypique à l'autre, notamment en fonction de l'architecture génomique de ces traits (Latta *et al.* 2015).

Ces résultats soulignent l'importance de tester les effets mutationnels dans plusieurs conditions environnementales pour obtenir un portrait plus complet des impacts des traitements d'accumulation de mutations. Ces résultats sont également intéressants en ce qu'ils révèlent sur les effets des mutations spontanées sur la plasticité des traits d'histoire de vie. Dans un premier temps ils confirment les résultats d'une étude antérieure en montrant que les mutations spontanées peuvent affecter la plasticité thermique des daphnies (Latta *et al.* 2015). De plus, en regard aux différences observables entre les normes de réactions des deux traitements MA pour la valeur adaptative (e^f), il apparaît que les nouvelles mutations affecteraient davantage la réponse plastique dans les lignées MA Cu que MA Ctrl. Ces impacts des mutations induites en présence de cuivre pourraient avoir des implications biologiques et évolutives non négligeables puisque la plasticité de la valeur adaptative est particulièrement importante pour déterminer comment les populations pourront s'adapter à des changements environnementaux.

L'amplification des effets mutationnels à haute température rapportée ici pourrait être expliquée par une modification de l'effet moyen des mutations délétères et/ou parce que des mutations cryptiques sont révélées uniquement dans certaines conditions (Vassilieva, Hook, et Lynch 2000; Kraemer *et al.* 2017). Pour le traitement MA Ctrl, la faible corrélation génétique non significative entre les environnements thermiques pour la taille moyenne de portée ne permet pas de conclure que les mêmes mutations expliquent la distribution des

phénotypes dans les deux environnements. De plus, l'absence de hausse de variation inter-lignée à 27°C pour cette variable suggère que le léger déclin mutationnel observé à cette température serait davantage imputable à la révélation d'un grand nombre de mutations de petits effets. Dans le cas des lignées MA Cu par contre, la forte corrélation génétique entre les environnements thermiques pour tous les traits étudiés suggère qu'une proportion significative des mutations accumulées dans les lignées s'exprime dans les deux environnements testés. La hausse thermique exacerberait donc surtout les effets moyens des mutations plutôt que de révéler des mutations cryptiques. Selon la théorie de la charge mutationnelle, de telles mutations d'effets inconditionnellement délétères dont l'amplitude dépend du contexte environnemental pourraient s'accumuler plus promptement dans les populations sous l'effet de la dérive génétique (Lynch, Conery, et Burger 1995a). À long terme, si ce type de mutations représente une proportion importante des nouvelles mutations, leur accumulation pourrait avoir des impacts négatifs sur la valeur adaptative ou la capacité d'adaptation des populations. Les impacts plus négatifs des mutations accumulées en présence de cuivre sur la plasticité thermique de la valeur adaptative suggèrent que l'exposition à des concentrations environnementales de ce métal lourd pourrait favoriser ce type de conséquences évolutives en limitant la capacité évolutive des populations face à certains changements environnementaux.

Certaines caractéristiques des réponses plastiques des lignées MA Cu pourraient par ailleurs faciliter l'action de la sélection purifiante et venir atténuer leurs conséquences évolutives à long terme. Premièrement, l'exposition aux conditions stressantes engendrait une plus grande expression de variation inter-lignées au niveau de la valeur adaptative (e^r) au sein du traitement MA Cu (Figure 6). Cette caractéristique pourrait atténuer les impacts négatifs du cuivre sur l'accumulation de mutations en accélérant le taux d'élimination des allèles délétères par sélection dans certaines conditions environnementales (Remold et Lenski 2001; Latta *et al.* 2015). Deuxièmement, l'action de la sélection purifiante pourrait être d'autant plus efficace contre les mutations induites en présence de Cu si le déclin phénotypique observé à 27°C est induit principalement par l'exacerbation des effets de quelques mutations de large effet, selon l'hypothèse du rôle des CNVs. La hausse

importante de la variation inter-lignée entre les deux températures et la corrélation entre les environnements sont compatibles avec cette hypothèse, au moins pour les lignées affichant les phénotypes les plus délétères et variables entre les environnements (Shabalina, Yampolsky, et Kondrashov 1997; Remold et Lenski 2001).

1.4.4 Conclusions

Les effets phénotypiques des mutations spontanées ont rarement été mesurés en tenant compte des impacts de l'exposition à des stress à la fois sur l'accumulation et l'expression des mutations (mais voir Matsuba *et al.* 2012). Notre étude est, à notre connaissance, la première à avoir mesuré directement les effets phénotypiques d'une hausse du taux de mutations induite par un contaminant environnemental. Nos résultats montrent que (1) les nouvelles mutations déposées dans les lignées MA Ctrl et MA Cu ont des effets phénotypiques cumulés plus ou moins délétères, (2) que certains de ces effets phénotypiques sont amplifiés en conditions thermiques plus stressantes et que (3) l'exposition au cuivre génère une plus importante charge mutationnelle chez les daphnies soumises à l'accumulation de mutations que ce qui est retrouvé en milieu bénin. Les impacts de l'exposition au cuivre sur les patrons de mutations se traduisent par des réductions des moyennes des traits d'histoire de vie, mais également par des changements dans la plasticité thermique des daphnies. Davantage de travaux sont nécessaires pour déterminer si l'augmentation du déclin phénotypique observée suite à l'exposition au cuivre est causée par les effets cumulés d'un grand nombre de mutations très légèrement délétères ou, comme plusieurs évidences le suggèrent, s'il est essentiellement imputable à quelques mutations de plus grand effet, telles que des CNVs affectant des régions codantes.

Nos résultats soulignent le besoin de tenir compte de la dépendance environnementale des effets mutationnels pour bien comprendre les implications des mutations spontanées sur l'évolution des populations naturelles. De plus, pour mieux comprendre les conséquences évolutives de l'exposition aux contaminants

environnementaux comme le cuivre, il apparait essentiel de mieux caractériser les relations entre les effets observés sur les traits liés à la valeur adaptative et les patrons de mutations caractéristiques induits en présence de ces contaminants.

CHAPITRE 2

EFFETS DES MUTATIONS SPONTANÉES SUR LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES DE *DAPHNIA PULEX* ÉLEVÉES EN MILIEUX BÉNIN ET CONTAMINÉ AU CUIVRE

2.1 INTRODUCTION

En tant que source ultime de variation génétique, les mutations spontanées représentent une force évolutive importante. Il est reconnu que les mutations légèrement délétères peuvent s'accumuler dans les populations et causer une diminution de la valeur adaptative moyenne des organismes (Halligan et Keightley 2009). Au niveau des populations, l'accumulation de mutations influencerait notamment le niveau de variation génétique disponible pour les traits liés à la valeur adaptative et pourrait exacerber l'amplitude de la dépression consanguine et augmenter les risques d'extinction des petites populations (Lynch, Conery, et Burger 1995a; Lynch *et al.* 1999; Houle 1998; Charlesworth et Charlesworth 1999). L'importance relative des mutations dans l'évolution des populations dépend de la fréquence à laquelle celles-ci se déposent dans les génomes, mais aussi de la distribution de leurs effets phénotypiques. Les effets des mutations spontanées ont surtout été mesurés sur des traits complexes liés à la valeur adaptative. Peu de données sont disponibles sur les mutations qui affectent les traits physiologiques et qui peuvent fournir un lien mécanistique entre génotype et phénotype.

En raison du rôle primordial des mitochondries, les mutations affectant les fonctions de ces organites pourraient avoir des conséquences particulièrement marquées sur la santé et la survie des populations (Lynch 2007; Dowling, Friberg, et Lindell 2008). Les mitochondries assurent plusieurs fonctions cellulaires essentielles, dont la production d'ATP par phosphorylation oxydative (OXPHOS). Le processus d'OXPHOS est assuré par les complexes respiratoires (complexes I à IV et complexes auxiliaires) du système de transport des électrons

(STE) et par l'ATP synthase (aussi appelée complexe V). Les complexes du STE sont aussi une source très importante d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui jouent des rôles cruciaux dans la signalisation cellulaire, mais qui peuvent aussi endommager les biomolécules lorsqu'elles sont trop abondantes (Turrens 2003; Sena et Chandel 2012; Lenaz 2012). Les effets de mutations spécifiques affectant les mitochondries ont souvent été associés à des impacts délétères sur des traits d'histoire de vie tels que la fertilité et la survie des organismes (Ballard *et al.* 2007; Howe et Denver 2008; Estes *et al.* 2011). De plus, il apparaît particulièrement important de bien comprendre l'impact des mutations spontanées sur ces organites puisque plusieurs lignes d'évidence théoriques et empiriques suggèrent que le processus d'accumulation de mutations serait particulièrement important dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Cortopassi 2002; Neiman et Taylor 2009; Howe et Denver 2008).

Les complexes mitochondriaux sont codés en partie par les gènes mitochondriaux et en partie par des gènes nucléaires. Des mutations autant dans l'ADNmt que dans l'ADN nucléaire (ADNn) peuvent donc affecter les fonctions mitochondriales et le bon fonctionnement de ces organites dépend de la coordination entre ces deux génomes qui ont des dynamiques évolutives très différentes. Par rapport à l'ADNn, l'ADNmt présente un taux de mutations élevé (Denver *et al.* 2000; Haag-Liautard *et al.* 2008; Xu *et al.* 2012). Cette plus grande susceptibilité aux mutations serait notamment expliquée par l'environnement plus mutagène de l'ADNmt qui se trouve ancré dans la membrane mitochondriale à proximité du STE. D'autres facteurs comme des mécanismes de réparation plus limités dans la mitochondrie que dans le noyau, l'absence de protéines protectrices de types histones ainsi qu'un système de réplication plus prompt aux erreurs ont également été invoqués (Rand 2001; Ballard et Melvin 2010; Lee et Wei 2005; Larsen *et al.* 2005; Reyes *et al.* 1982). De plus, l'ADNmt aurait une capacité limitée à éliminer les mutations héréditaires en raison de son mode de transmission uni-parental caractérisé par une quasi-absence de recombinaison et par la présence d'un important goulot d'étranglement qui diminuerait sa taille effective de population et, conséquemment, l'efficacité de la sélection contre les mutations légèrement délétères (Castellana *et al.* 2011; Rand 2001; Stewart *et al.* 2008). Suivant la synergie entre ces caractéristiques évolutives, il a été suggéré que l'ADNmt serait vulnérable à l'accumulation de mutations et aux effets négatifs du cliquet de Müller

(Lynch 2007; Cortopassi 2002; Neiman et Taylor 2009). Selon cette théorie, les populations de petites tailles ou asexuées seraient condamnées à un déclin mutationnel puisqu'elles ne peuvent reconstituer un génome avec moins de mutations. L'accumulation inexorable de mutations légèrement délétères dans ces populations affecterait leur valeur adaptative et pourrait ultimement causer leur extinction par effondrement mutationnel. Toutefois, plusieurs lignes d'évidences pointent vers des effets non négligeables de la sélection sur l'évolution du génome mitochondrial qui lui permettraient d'alléger le taux d'accumulation de mutations et expliquerait comment ce génome réussit à éviter l'effondrement mutationnel prédit. Plusieurs auteurs soutiennent que les mêmes caractéristiques des mitochondries qui favorisent l'action de la dérive en restreignant la taille de population effective pourraient plutôt favoriser la sélection purifiante à différents niveaux d'organisation, par exemple entre les lignées germinales ou entre les molécules d'ADNmt au sein d'une cellule (Rand 2001; Christie et Beekman 2016). Des études ont montré que les mutations avec des effets phénotypiques importants pouvaient effectivement être éliminées dans le processus de transmission de l'ADNmt (Fan *et al.* 2008; Stewart *et al.* 2008). La signature génétique de la sélection purifiante a également été observée au niveau de populations naturelles dont le nombre de mutations délétères était inférieur à ce qui était attendu en fonction des taux de mutations estimés en conditions expérimentales (Denver *et al.* 2000). Il a même été avancé que l'évolution de l'ADNmt pourrait être sujette à de la sélection positive récurrente permettant d'éliminer en bloc plusieurs mutations légèrement délétères selon le processus décrit par la théorie de la *genetic draft* (Bazin, Glémin, et Galtier 2006; Gillespie 2000). Malgré tout, des études montrent que des mutations mitochondriales ayant des effets phénotypiques importants peuvent échapper à ces processus de sélection (Fan *et al.* 2008; Shoubridge et Wai 2007; Wai, Teoli, et Shoubridge 2008; Neiman et Taylor 2009; Loewe 2006). Le rôle relatif de l'accumulation de mutations dans l'évolution de ces organites reste donc une question controversée biologique.

La résolution de cette question et la compréhension de ses conséquences sur la valeur adaptative des organismes nécessitent de bien connaître la distribution des effets de ces mutations. Les effets délétères de mutations spécifiques sur des gènes codants pour les mitochondries ont été largement démontrés en lien avec des pathologies humaines (Wallace

1999; Schon, DiMauro, et Hirano 2012; Greaves *et al.* 2012; Verkaart *et al.* 2007; Dowling 2014). Quelques études sur des organismes modèles mutés ont également permis de tester les effets proximaux de mutations de larges effets sur des gènes liés au STE (Hicks *et al.* 2012; Dingley *et al.* 2010; Leung *et al.* 2013; Kujoth *et al.* 2005). Les principaux effets répertoriés incluent des diminutions du potentiel membranaire, des activités des complexes du STE et de la concentration en ATP ainsi que des hausses de production d'ERO. Toutefois de telles mutations avec des coefficients de sélection importants ne sont pas susceptibles d'être maintenues dans des populations soumises à la sélection et les effets des mutations spontanées plus légères pouvant s'accumuler dans les populations naturelles restent largement méconnus. Il est traditionnellement assumé que la majorité de ces mutations ont des effets légèrement délétères (Rand 2001; Denver *et al.* 2000; Melvin et Ballard 2017). Ces effets sont par contre difficiles à quantifier de façon directe et ce n'est que récemment que plusieurs d'études ont réussi à mesurer les effets de la variation génétique naturelle des gènes liés au STE sur les fonctions mitochondriales (Moreno-Loshuertos *et al.* 2006; Pichaud *et al.* 2011; Correa *et al.* 2012; Ballard et Melvin 2011). Des effets délétères de mutations naturelles spécifiques de gènes liés au STE ont été observés sur la capacité catalytique des complexes mitochondriaux, la production d'ERO et la survie des organismes. Il ressort aussi de ces études que les effets phénotypiques des mutations mitochondriales sont variables et fortement dépendants des conditions environnementales, suggérant qu'au moins une partie des mutations s'accumulant dans les génomes mitochondriaux pourraient être au moins conditionnellement bénéfiques (Ballard et Pichaud 2014). Les effets phénotypiques des mutations affectant les gènes mitochondriaux ou nucléaires liés aux fonctions mitochondriales sont d'autant plus complexes à estimer qu'ils sont atténués par de nombreux processus (résumé dans Ballard et Melvin 2010). Une diminution de la capacité d'OXPPOS induite par des mutations pourrait ainsi être compensées entre autres par une hausse du nombre de mitochondries, de complexes du STE ou de copies d'ADNmt.

L'approche expérimentale des lignées d'accumulation de mutations (lignées MA) s'est montrée efficace pour estimer les effets phénotypiques spécifiques des mutations spontanées et ainsi contribuer à distinguer leurs impacts de ceux des autres forces évolutives (Keightley et

Halligan 2009). Le principe de ces expériences est de permettre à la grande majorité des mutations non délétères de se transmettre dans les génomes de lignées maintenues à des tailles de populations effectives réduites au maximum ($N_e \approx 1$ ou 2) afin d'éliminer pratiquement toute action de la sélection. En regard au rôle des mutations sur l'évolution mitochondriale, une étude sur des lignées MA a permis de montrer une correspondance entre l'accumulation de mutations dans l'ADNmt et des impacts sur des traits d'histoire de vie (Denver *et al.* 2000). De plus, l'accumulation de mutations se traduirait par une hausse du niveau d'ERO (Joyner-Matos *et al.* 2013). Par contre, à notre connaissance, les impacts des mutations spontanées héréditaires sur les fonctions mitochondriales n'ont encore jamais été directement testés. Afin de contribuer à mieux comprendre l'importance de l'accumulation de mutations dans l'évolution des mitochondries, mon étude propose de tester les effets des mutations spontanées sur les fonctions mitochondriales de *Daphnia pulex*. Pour ce faire, la capacité de respiration mitochondriale de lignées de daphnies ayant accumulé des mutations pendant plus de 120 générations a été comparée à celle de daphnies contrôles élevées en milieu compétitif. Afin de vérifier si les effets des mutations spontanées sur les fonctions mitochondriales génèrent une réponse compensatoire, la concentration relative en ADNmt a été mesurée.

Les lignées de daphnies utilisées dans cette étude proviennent de deux traitements d'accumulation de mutations: certaines ont été élevées en milieu bénin alors que d'autres ont été élevées en milieu enrichi de cuivre (40 $\mu\text{g/L}$). Un autre objectif de cette étude sera donc de comparer les effets de l'accumulation de mutation en milieu bénin et en milieu contaminé au cuivre (Cu). Le cuivre est un métal naturellement présent dans l'environnement, mais qui représente un enjeu écologique, particulièrement dans certaines régions où les activités humaines (ex: mines, raffinage, etc.) augmentent grandement sa libération dans l'environnement (Pearson, Gunn, et Keller 2002; Howe *et al.* 1998; Rajotte et Couture 2002). Cet élément essentiel est notamment reconnu pour causer de la génotoxicité lorsqu'il est en grande concentration, que ce soit en interagissant directement avec l'ADN ou, de façon indirecte, en augmentant la production d'ERO via la réaction de Fenton (Atienzar *et al.* 2001). Il a été précédemment suggéré que l'exposition à des contaminants chimiques comme le cuivre qui influencent le taux de mutations à la hausse pourraient accélérer le processus d'accumulation de

mutations légèrement délétères dans les populations et en exacerber les effets négatifs (Lynch, Conery, et Burger 1995a; Bickham *et al.* 2000; Ribeiro et Lopes 2013). Toutefois peu d'études ont testé ces conséquences théoriques de l'exposition à des concentrations environnementales de contaminants sur la charge mutationnelle et aucune n'a mesuré les effets phénotypiques associés aux impacts des contaminants sur les patrons de mutations (Singer et Yauk 2010). Il a été montré que les lignées MA élevées en présence de cuivre avaient un taux d'accumulation de mutations plus élevé dans le génome nucléaire, particulièrement pour certains types de mutations (Chain *et al.* 2018). De plus, les tests de traits d'histoire de vie effectués sur ces mêmes lignées dans le cadre du présent projet ont révélé des effets mutationnels négatifs plus importants lorsque les mutations étaient accumulées en présence de cuivre qu'en milieu bénin (voir chapitre 1). Les impacts du cuivre sur le taux d'accumulation de mutations dans le génome mitochondrial n'ont pas été directement mesurés, mais les mitochondries sont reconnues comme une des cibles principales du Cu^{2+} qui s'accumule facilement dans ces organites et y induit une hausse de la production d'ERO (Hosseini *et al.* 2014; Pourahmad et O'Brien 2000). Il est conséquemment attendu qu'en accélérant le taux de mutations et en modifiant le patron de mutation dans le génome nucléaire et possiblement dans le génome mitochondrial, la présence de cuivre dans l'environnement des lignées d'accumulation de mutations se traduise également par des effets plus importants sur les fonctions mitochondriales.

2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.2.1 Animaux

Nous avons étudié des lignées d'accumulation de mutations (lignées MA) de *Daphnia pulex* provenant d'un même ancêtre commun, mais dont certaines ont été élevées en milieu bénin (MA Ctrl, n=10) et d'autres en milieu enrichi de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ (MA Cu, n=10). Ces lignées ont été comparées à des daphnies provenant d'un élevage contrôle avec compétition (non-MA) établi à partir des descendants du même clone que les lignées MA. L'expérience d'accumulation

de mutations et le contrôle non-MA ont été réalisés par le laboratoire de Melania Cristescu de l'Université McGill, tel que décrit par Flynn *et al.* (2017). Pour les mesures des fonctions mitochondriales, des descendantes des daphnies utilisées pour l'expérience sur les traits d'histoire de vie à 18°C ont été utilisées (voir Chapitre 1). Pour chaque lignée ou isolat, des juvéniles (moins de 48h) provenant d'au moins trois daphnies mères différentes étaient transférées dans des pots d'un litre contenant 800 mL d'eau douce synthétique FLAMES, à raison d'environ 22 daphnies par pot (n=5). Au besoin, des juvéniles provenant de deux ou trois mères différentes étaient combinés dans un même pot. Ces daphnies étaient immédiatement transférées dans une chambre à 27°C où elles étaient élevées au même cycle jour/nuit que leurs mères (soit 12h/12h) et nourries trois fois par semaine avec le même mélange d'algues que ces dernières. Les bébés étaient retirés des cultures trois fois par semaine et l'eau des daphnies était changée une fois par semaine. Les élevages de daphnies pour les tests de respiration mitochondriale ont été effectués à 27°C puisque cette température stressante avait permis de révéler davantage d'effets phénotypiques des traitements d'accumulation de mutation sur les traits d'histoire de vie des daphnies (voir chapitre 1).

2.2.2 Mesure de la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale a été mesurée sur les daphnies matures (minimum 7 jours, maximum 14 jours) perméabilisées, selon le protocole de Kake-Guena *et al.* (2015). Pour chaque réplicat, dix daphnies étaient échantillonnées aléatoirement. Toutes les manipulations des daphnies ont été faites sur glace et dans du milieu BIOPS préalablement refroidi. Les daphnies étaient rincées avec du BIOPS contenant 2,77 mM CaK₂EGTA, 7,23 mM K₂EGTA, 20 mM imidazole, 20 mM taurine, 6,56 mM MgCl₂-6H₂O, 5,77 mM ATP, 15 mM phosphocreatine, 0,5 mM dithiothreitol et 50 mM K-MES (pH 7,1). Les œufs des daphnies étaient enlevés délicatement en envoyant un jet de FLAMES à l'intérieur de leur carapace à l'aide d'une pipette. Les daphnies étaient perméabilisées mécaniquement et chimiquement en les perforant à l'aide d'une aiguille montée puis en les transférant dans du nouveau BIOPS

additionné de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de saponine dans lequel elles étaient agitées pendant 30 minutes (Kuznetsov *et al.* 2004).

Les daphnies perméabilisées étaient immédiatement transférées dans une chambre à respiration (OROBOROS Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria) contenant 2 mL de milieu de respiration Mir05 (110 mM sucrose, 60 mM K-lactobionate, 0,5 mM EGTA, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA sans acides gras, 3 mM $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM K-HEPES, pH 7,1, osmolarité 330 mOsm; Gnaiger *et al.* 2000) additionné de 0,5 mM de pyruvate et 5 mM de malate. La respiration mitochondriale en stade de repos, sans phosphorylation (sans ADP, avec pyruvate et malate; N-LEAK), était d'abord mesurée. Ensuite, la respiration au stade OXPHOS, couplée à la phosphorylation de l'ADP, était enregistrée en ajoutant successivement les substrats et inhibiteurs suivants: 2,5 mM ADP (respiration de la voie NADH sans cytochrome *c*; N-OXPHOS), 10 μM cytochrome *c* (intégrité mitochondriale et respiration de la voie NADH avec cytochrome *c*; N-OXPHOSc), 10 mM succinate (respiration des voies NADH et succinate; NS-OXPHOSc), 0,5 mM rotenone (respiration de la voie succinate après inhibition du complexe I; S-OXPHOSc), 2,5 mM antimycine A (consommation résiduelle d'oxygène après inhibition du complexe III; ROX), 2 mM ascorbate et 0,5 mM tetraméthylphénylènediamine (TMPD) (activité du complexe IV; CIV) et 50 mM sodium azide (bruit chimique résiduel après inhibition du complexe IV; AZD). La respiration était mesurée à la température d'élevage des daphnies, soit 27°C , et les données étaient enregistrées et analysées avec le logiciel Datlab (OROBOROS Instruments).

Les données de respirométrie ont été corrigées pour le bruit instrumental et pour la consommation résiduelle d'oxygène (ROX). Le bruit instrumental – dû à la diffusion de l'oxygène et à la diminution d'oxygène en l'absence d'échantillon biologique – a été calculé en réduisant progressivement la concentration d'oxygène par ajout de dithionite tout en mesurant la consommation d'oxygène dans une chambre ne contenant que du Mir05 (Gnaiger *et al.* 1995; Fasching et Gnaiger 2016). Le taux de respiration du complexe IV (CIV) a pour sa part été corrigé pour le bruit chimique induit par l'auto-oxydation du TMPD en soustrayant la consommation résiduelle d'oxygène enregistrée après l'inhibition du complexe IV par l'ajout

d'azide de sodium (Gnaiger *et al.* 1998). Le taux de respiration des daphnies est exprimé en pmol d'oxygène consommé par seconde par mg de protéines ainsi qu'en ratios de flux d'oxygène (FCR), calculés en rapportant les taux de respiration sur la capacité maximale de l'OXPPOS (NS-OXPPOS_c). Le couplage des mitochondries a été évalué avec le ratio de contrôle respiratoire en présence des substrats qui fournissent en électrons le CI ($R_{CR_{CI}} = N-OXPPOS/N-LEAK$) (Chance et Williams 1955) et le FCR du stade N-LEAK (Gnaiger 2009). L'effet du cytochrome *c* sur la capacité de phosphorylation oxydative a été utilisé comme indice de l'intégrité des membranes mitochondriales des daphnies perméabilisées. Cet effet est exprimé par le facteur de contrôle du flux ($FCF_c = (N-OXPPOS_c - N-OXPPOS)/N-OXPPOS_c$) (Gnaiger 2014).

À la fin de l'expérience de respirométrie, le contenu de la chambre était prélevé et homogénéisé sur glace en procédant à huit passages de pilon dans un homogénéisateur manuel en verre fritté. L'homogénat était immédiatement aliquoté et congelé à -80°C pour les mesures ultérieures de contenu en protéines et d'activité de la citrate synthase.

2.2.3 Quantification des protéines

Le contenu en protéines a été déterminé selon la méthode de l'acide bicinchoninique (Smith *et al.* 1985) à l'aide d'un lecteur de plaques (EnVision® Multilabel Reader). Puisque les homogénats provenant des chambres de respiration contenaient de l'albumine bovine et du cytochrome *c*, le contenu en protéines du milieu Mir05 additionné de 10 mM de cytochrome *c* a été mesuré et soustrait de la mesure obtenue pour les homogénats (Pichaud *et al.* 2012). La concentration en protéines des homogénats a ensuite été utilisée pour normaliser le taux de respiration mitochondriale des différents complexes et l'activité de la citrate synthase.

2.2.4 Activité de la citrate synthase

Afin d'obtenir une estimation du contenu en mitochondries des échantillons, l'activité de

la citrate synthase (CS), une enzyme clé du cycle de l'acide citrique, a été mesurée en spectrophotométrie selon un protocole adapté de Thibault *et al.* (1997) (Larsen *et al.* 2012). Pour mesurer l'activité de la CS à l'aide d'un lecteur de plaque, 100 μ l d'homogénat de daphnies provenant des chambres de respiration étaient mélangés à 125 μ l de milieu réactionnel (tampon potassium phosphate 100 mM pH 8, 0,1 mM 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) et 0,113 mM acétyl coenzyme-A) et 0,15 mM d'oxaloacétate dans un volume final de 250 μ l par puits. L'activité était mesurée en triplicats à 27°C, en suivant la hausse d'absorbance à 412 nm suite à l'oxydation du DTNB ($\epsilon = 13,6 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) pendant 8 minutes. L'activité de la CS a été exprimée en unités enzymatiques internationales (IU; définies comme la quantité de CS nécessaire pour former une micromole de produit par minute) par mg de protéine.

2.2.5 Mesure du ratio ADNmt/ADNn

Le nombre relatif de copies d'ADN mitochondrial par copie d'ADN nucléaire (ratio ADNmt/ADNn) a été mesuré sur des descendants des daphnies utilisées pour l'expérience sur les traits d'histoire de vie (portées 5 et 6). Pour chaque lignée ou isolat, 24 nouveau-nés produits par deux à trois mères différentes issues de l'expérience à 18°C ont été isolés et transférés dans de nouveaux tubes Falcons à raison de deux daphnies par tube de 40 ml d'eau d'étang synthétique FLAMES. Six tubes ont été placés à 18°C et six autres à 27°C. Les daphnies ont été élevées dans les mêmes conditions que pour l'expérience sur les traits d'histoire de vie. Les tubes étaient inspectés toutes les 24 h. La première portée était jetée puis les daphnies étaient congelées lorsqu'elles avaient déposé les œufs de leur deuxième portée, avant que ceux-ci ne soient entièrement développés puis expulsés.

Les daphnies échantillonnées pour la mesure du ratio ADNmt/ADNn étaient d'abord rincées dans du FLAMES propre, leurs œufs étaient délicatement évacués en envoyant un jet de FLAMES à l'intérieur de leur carapace à l'aide d'une pipette puis elles étaient asséchées sur du papier filtre et immédiatement congelées à sec, individuellement, à -80°C, jusqu'au moment de l'extraction de l'ADN. L'ADN d'une seule des deux daphnies de chaque tube était extrait

(n=6), la seconde étant conservée en réserve et utilisée au besoin. L'ADN a été extrait selon la méthode du CTAB (Doyle et Doyle 1987) et conservé à -20°C jusqu'à l'amplification.

Le nombre relatif de copies d'ADNmt a été mesuré par PCR en temps réel. Pour chaque échantillon, le gène nucléaire Syntaxin 16 (*Stx16*) et le gène mitochondrial NADH déshydrogénase 5 (*Nd5-CAN*) ont été amplifiés simultanément en duplicats dans des puits séparés. Afin de valider le choix de ces gènes cible et référence, leur efficacité d'amplification a été testée en vérifiant comment la différence de cycle seuil de détection du signal d'amplification (C_T) des deux amplicons variait en fonction de la dilution de l'ADN par régression linéaire tel que décrit dans Livak et Schmittgen (2001). La pente de la régression étant près de zéro ($y=0.014\text{Log}(x) + 6.79$), les deux gènes ont des efficacités d'amplification similaires et peuvent être efficacement utilisés pour déterminer le ratio ADNmt/ADNn. Le mélange PCR était composé de 2 µl d'ADN (l'équivalent d'environ 50 ng d'ADN), 7,5 µl de SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline), 400 nM de chacune des amorces et d'eau nano de qualité PCR dans un volume final de 15 µl. Les réactions ont été faites avec un LightCycler 480 II (Roche) dans les conditions suivantes: 3 min à 95°C puis 40 cycles de 10 sec à 95°C, 10 sec à 60°C et 10 sec à 72°C. Les amorces utilisées étaient : *Stx16* amorces sens 5'-CACATTGGTCGTCCTTAGTCTTG-3' et anti-sens 5'-TGCTATACGTTACGCTTGTCCTTAC-3' (Spanier *et al.* 2010) et *Nd5-CAN* amorces sens 5'-TTAAGAGGTGGTCCGCATTC-3' et anti-sens 5'-TTTGTTGGTGTTCCTGCT-3'. Ces amorces ont été dessinées à partir de la séquence ND5 du clone de l'étang Canard.

Le nombre relatif de copies d'ADNmt par copie d'ADNn a été calculé selon l'équation $2^{\Delta C_t}$ où $\Delta C_T = (C_T \text{ Stx16} - C_T \text{ Nd5-CAN})$ (Qiu *et al.* 2013). Lorsque le coefficient de variation pour le C_T (CV_{C_t}) d'un des deux gènes était supérieur à 2 % le test était repris afin que seuls les échantillons dont les deux CV_{C_t} étaient inférieurs à 2 % soient conservés.

2.2.6 Analyse des données

Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur les traits mitochondriaux

Les effets du traitement (non-MA, MA Ctrl et MA Cu) sur les ratios ADNmt/ADNn, l'activité de la CS et les variables associées à la respiration mitochondriale ont été testés par modèle linéaire généralisé mixte en utilisant la méthode par le maximum de vraisemblance restreint (REML) à l'aide du logiciel R studio (version 1.0.136), package nlme (Pinheiro et al. 2014). Pour chacune des variables, le modèle $y = \text{Traitement} + \text{Lignée}(\text{Traitement}) + \varepsilon$ (avec le traitement comme effet fixe et la lignée comme facteur aléatoire) a été analysé par ANOVA puis des tests de comparaison multiple (Tukey HSD) ont été faits pour tester la différence entre les paires de traitements. Pour certaines variables de respiration mitochondriales, les moyennes des groupes MA Ctrl et MA Cu ne différaient pas significativement entre eux (p s'approchant de 1,000), ils ont été regroupés et comparés au traitement contrôle. Les conditions d'utilisation des analyses ont été validées graphiquement. Des tests de Dunnett ont ensuite été utilisés pour déterminer si les traits mitochondriaux de certaines lignées MA (Ctrl et Cu) différaient de ceux mesurés pour l'ensemble du groupe non-MA.

Pour chacune des variables, les composantes de la variance ont été extraites pour chaque traitement à partir du modèle linéaire généralisé mixte $y = \text{Lignée} + \varepsilon$ où la lignée est un facteur aléatoire. La variance intra-lignée (V_e) ainsi extraite représente la variance environnementale alors que la variance inter-lignée (V_L) représente la variance génétique. Les variances des groupes MA et non-MA ont été comparées à l'aide de tests de F. Un coefficient de variation génétique (CV_L) a été généré en normalisant la racine carrée de la V_L par la moyenne du traitement (Houle 1992).

Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur la plasticité du ratio ADNmt/ADNn

Afin de tester si les traitements d'accumulation de mutations engendrent des réponses plastiques différentes du ratio ADNmt/ADNn entre 18 et 27°C, l'effet de l'interaction génotype

× environnement ($G \times E$) a été testé grâce au modèle linéaire mixte suivant: $y = \text{Traitement} + \text{Température} + \text{Traitement} \times \text{Température} + \text{Lignée (Traitement)} + \varepsilon$ où les termes traitements et température ainsi que leur interaction sont des facteurs fixes alors que la lignée est un facteur aléatoire niché dans le traitement. Ensuite, pour évaluer la variabilité de la plasticité des lignées à l'intérieur de chacun des traitements, des ANOVA à deux facteurs fixes ont été utilisées: $y = \text{Lignée} + \text{Température} + \text{Lignée} \times \text{Température} + \varepsilon$. Des interactions significatives sont interprétées comme indiquant une différence entre les normes de réaction des traitements ou des lignées (Windig, De Kovel, et De Jong 2004; Latta *et al.* 2015). Afin de confirmer les différences de réponses plastiques et d'évaluer si les différences sont induites par un changement dans l'ordre des moyennes et/ou dans le niveau de variance inter-lignées, les normes de réaction ont été analysées visuellement et les variances inter-lignées à chacune des températures ont été comparées à l'aide de tests de F.

2.3 RÉSULTATS

2.3.1 Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur l'OXPPOS

Couplage de l'OXPPOS et effet du cytochrome c

Les RCR_{CI} ne différaient pas entre les traitements ($p = 0,172$; Tableau 4) ni entre les MA et non-MA ($p = 0,059$). Les FCR pour le stade N-LEAK ne montraient pas non plus de différences significatives de couplage entre les traitements ($p = 0,763$; Tableau 4) ni entre le traitement non-MA et les traitements MA regroupés ($p = 0,565$). Les moyennes des RCR_{CI} et des ratios FCR pour le stade N-LEAK étaient similaires à celles obtenues précédemment avec des daphnies perméabilisées (Kake-Guena *et al.* 2015; Kake-Guena *et al.* 2017), indiquant un couplage équivalent de la phosphorylation oxydative.

L'ajout de cytochrome *c* s'est traduit par une hausse du taux de respiration chez les daphnies des trois traitements. Cette hausse est exprimée sous la forme du FCF_c . Un ratio FCF_c de 0 est interprété comme reflétant une parfaite intégrité des membranes mitochondriales

externes, le cytochrome *c* ne pouvant les traverser. Un ratio de 1 indique que les membranes mitochondriales sont complètement endommagées. Le FCF_c des daphnies étudiées était relativement élevé avec une valeur moyenne de 0,25 à 0,28 selon le traitement évolutif (Tableau 4). Ces valeurs élevées indiquent certains dommages aux membranes externes des mitochondries, comparables à ceux observés dans d'autres expériences similaires chez les daphnies (Kake-Guena *et al.* 2015; Kake-Guena *et al.* 2017). Les valeurs de FCF_c n'étaient cependant pas significativement différentes entre les traitements ($p = 0,268$), ni entre le groupe non-MA par rapport aux traitements MA regroupés ($p = 0,123$). Afin d'éviter tout biais lié à une limitation de l'OXPPOS par la disponibilité en cytochrome *c*, les mesures de taux de respirations en présence de cytochrome *c* externe ont été utilisées pour comparer l'OXPPOS entre les lignées et traitements.

Tableau 4 : Valeurs moyennes des mesures de couplage de l'OXPPOS (RCR_{Cl} et FCR du stade N-LEAK) et de l'effet du cytochrome *c* chez les daphnies entières perméabilisée (\pm erreur type).

	Ctrl non-MA	MA Ctrl	MA Cu
Ratio de contrôle respiratoire (RCR _{Cl} ¹)	3,03 \pm 0,11	2,75 \pm 0,11	2,79 \pm 0,11
Ratio de flux d'oxygène (FCR) du stade N-LEAK ²	0,17 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
Effet du cytochrome <i>c</i> (FCF _c ³)	0,25 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01

¹ RCR_{Cl} = N-OXPPOS/N-LEAK; ² N-LEAK/NS-OXPPOS_c; ³ FCF_c = (N-OXPPOS_c - N-OXPPOS)/N-OXPPOS_c

Taux de respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale a été mesurée en deux des principaux stades de couplage, soit le stade de fuite de protons (LEAK) et le stade de phosphorylation oxydative (OXPPOS). Le stade LEAK mesure la respiration mitochondriale au repos, c'est-à-dire non couplée à la phosphorylation d'ADP en ATP. Ce stade a été mesuré comme le flux d'oxygène enregistré lorsque les mitochondries sont saturées en substrats réducteurs du complexe I, mais ne sont pas alimentées en ADP (N-LEAK). Dans ces conditions, l'ATP synthase ne peut fonctionner et le gradient de protons n'est pas dissipé par la phosphorylation oxydative. Le flux d'oxygène sert alors essentiellement à compenser pour la fuite de protons de l'espace inter-membranaire vers la

matrice, bien qu'il soit également influencé par d'autres composantes comme le «proton slip» et les échangeurs de cations (Brand *et al.* 1994; Gnaiger 2014). Pour les daphnies étudiées, le taux de respiration mitochondrial mesuré en N-LEAK ne différait pas entre les traitements (ANOVA, $p = 0,567$) (Figure 7).

Le stade OXPHOS a ensuite été atteint par l'ajout d'ADP aux mitochondries en présence de substrats réducteurs. Dans le stade OXPHOS, la consommation d'oxygène est principalement couplée à la production de l'ATP. Pour toutes les mesures réalisées, le traitement évolutif avait un effet significatif sur le taux d'OXPHOS indiquant qu'au moins un des groupes se différenciait (ANOVA, $p < 0,05$). Les traitements MA Ctrl et MA Cu ne différaient pas entre eux (Tukey, $p > 0,984$), mais présentaient un taux de respiration légèrement plus faible que le groupe contrôle non-MA, avec une diminution de ~9 à 13% du taux de respiration selon la voie mesurée (N, S ou NS) (Figure 7). Dans certains cas, le groupe MA Ctrl ou MA Cu pris séparément ne différait pas significativement du groupe non-MA (Tukey, $0,1 > p > 0,05$), mais la différence entre le groupe non-MA et les traitements MA regroupés était toujours significative (ANOVA, $p < 0,05$). La différence entre les traitements MA regroupés et non-MA était la plus significative pour le taux de respiration avec la voie NADH avant l'ajout de cytochrome *c* externe ($p = 0,002$). L'ajout de ce transporteur d'électron venait atténuer cette différence entre les taux de respiration des différents traitements pour la voie NADH ($p = 0,012$). Individuellement, aucune lignée MA ne présentait des taux de respiration significativement différents de la moyennes des isolats non-MA (tests de Dunnett, $p > 0,05$).

Ratios de flux d'oxygène

Les mesures de phosphorylation oxydative exprimées en ratios de flux d'oxygène (FCR) permettent d'estimer la capacité relative des différentes voies mitochondriales par rapport à la capacité maximale de respiration des mitochondries (NS-OXPHOS_c). Les FCR permettent donc de mettre en lumière certaines caractéristiques fonctionnelles du système de transport des électrons indépendantes du contenu en mitochondries des organismes. Pour les daphnies

étudiées, les FCR de la voie du NADH et la voie du succinate étaient pratiquement identiques entre les différents traitements évolutifs (respectivement $p = 0,818$ et $p = 0,896$; Tableau 5). La constance dans les contributions relatives de chacune de ces deux voies entre les traitements évolutifs est également reflétée par l'absence de différence dans les ratios N/S qui sont de 1,16 pour non-MA et MA Ctrl et de 1,15 pour MA Cu ($p = 0,954$). Les FCR pour le CIV montraient une tendance entre les traitements ($p = 0,073$): les groupes MA Ctrl et MA Cu présentant des ratios de 2,34 et 2,29 comparativement à un ratio de 2,14 pour le contrôle non-MA (Tableau 5). Cette différence reflète la plus faible capacité catalytique des complexes en amont du STE dans les deux traitements MA par rapport au contrôle.

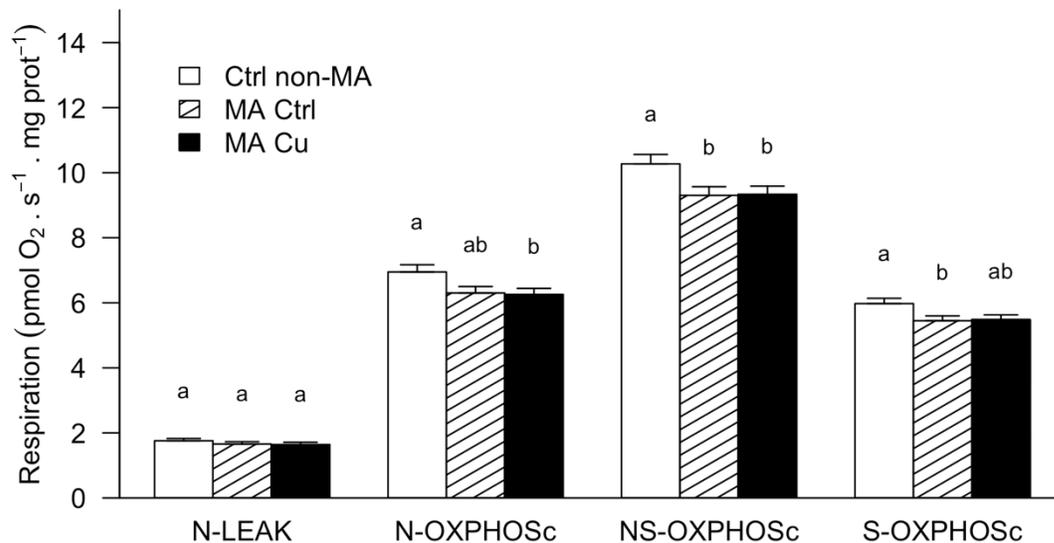


Figure 7 : Moyennes \pm erreurs types des taux de respiration mitochondriale mesurés sur des daphnies entières perméabilisées issues des trois différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu). Les taux de respirations ont été mesurés à 27°C. Pour chaque stade de respiration, les groupes significativement différents entre eux sont identifiés par des lettres différentes (Tukey HSD).

Tableau 5 : Moyennes \pm écarts types, variances génétiques (V_L), variances environnementales (V_e) et coefficients de variation génétique (CV_L) des variables mitochondriales chez les daphnies issues des différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et Ma Cu).

		Ctrl non-MA	MA Ctrl	MA Cu
N-OXPHOS_c ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	Moyenne \pm SE	6,95 \pm 0,22	6,30 \pm 0,20	6,25 \pm 0,19
	V_L	<0,001	<0,001	<0,001
	V_e	2,65	2,09	2,02
	CV_L (%)	<0,001	<0,001	<0,001
NS-OXPHOS_c ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	Moyenne \pm SE	10,27 \pm 0,29	9,30 \pm 0,27	9,34 \pm 0,25
	V_L	<0,001	<0,001	<0,001
	V_e	4,56	3,77	3,53
	CV_L (%)	<0,001	<0,001	<0,001
S-OXPHOS_c ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	Moyenne \pm SE	5,98 \pm 0,16	5,45 \pm 0,15	5,48 \pm 0,15
	V_L	<0,001	<0,001	<0,001
	V_e	1,42	1,21	1,20
	CV_L (%)	<0,001	<0,001	<0,001
CIV ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	Moyenne \pm SE	21,68 \pm 0,54	21,32 \pm 0,54	21,04 \pm 0,48
	V_L	<0,001	2,48 ^a	2,00 ^a
	V_e	15,84	12,95	11,27
	CV_L (%)	<0,001	7,38 (↗)	6,73 (↗)
FCR N-OXPHOS_c	Moyenne \pm SE	0,67 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	0,67 \pm 0,01
	V_L	<0,001	<0,001	<0,001
	V_e	<0,01	<0,01	<0,01
	CV_L (%)	2,67	2,49	2,18
FCR S-OXPHOS_c	Moyenne \pm SE	0,58 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01
	V_L	<0,001	<0,001 ^a	<0,001 ^{a*}
	V_e	<0,01	<0,01	<0,01
	CV_L (%)	2,40	<0,001 (↘)	4,43 (↗)
FCR CIV	Moyenne \pm SE	2,14 \pm 0,03	2,34 \pm 0,06	2,29 \pm 0,04
	V_L	<0,01	0,03 ^a	0,02 [*]
	V_e	0,05	0,15 ^a	0,08
	CV_L (%)	3,96	7,04 (↗)	5,54
CS ($\text{IU} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	Moyenne \pm SE	1,27 $\times 10^{-3} \pm 3,82 \times 10^{-5}$	1,26 $\times 10^{-3} \pm 2,98 \times 10^{-5}$	1,25 $\times 10^{-3} \pm 3,20 \times 10^{-5}$
	V_L	2,59 $\times 10^{-16}$	4,31 $\times 10^{-9}$ ^a	6,46 $\times 10^{-16}$
	V_e	7,86 $\times 10^{-8}$	4,32 $\times 10^{-8}$ ^a	5,72 $\times 10^{-8}$
	CV_L (%)	<0,01	5,22 (↗)	<0,01

*Indique une variance inter-lignées significative (ANOVA, $p < 0,05$).

^a Indique une différence significative de ce traitement MA par rapport au traitement non-MA (F-test, $p < 0,05$) et la flèche souligne le sens de cette différence.

Variance génétique

Contrairement à ce qui est généralement attendu dans les expériences d'accumulation de mutations, les variables de respiration mitochondriale analysées ne présentaient généralement pas une variance génétique accrue chez les groupes MA par rapport au contrôle non-MA (Tableau 5). Pour la majorité des variables analysées, la V_L était non significative pour tous les traitements (ANOVA, $p > 0,05$). De plus, la V_L des traitements MA Ctrl et MA Cu n'était que rarement significativement différente de celle du groupe contrôle non-MA.

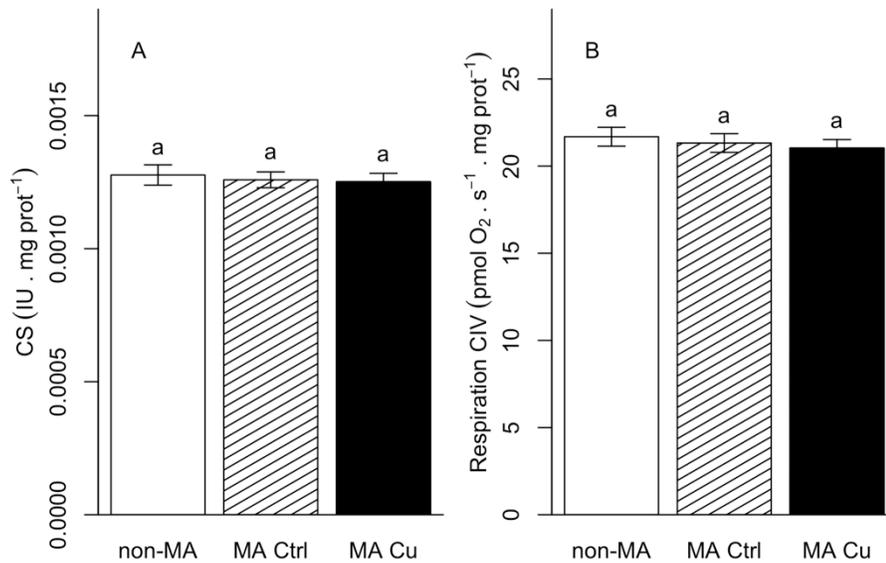


Figure 8 : Moyennes \pm erreurs types de l'activité de la citrate synthase (CS) et du taux de respiration du complexe IV (CIV) mesurés à 27°C sur des daphnies issues des trois différents traitements évolutifs.

2.3.2 Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur le contenu mitochondrial

L'accumulation de mutations n'a eu aucune influence significative sur le contenu en mitochondries des daphnies élevées à 27°C, tel que démontré par la mesure d'activité de citrate synthase par mg de protéines ($p = 0,857$). Ce résultat est appuyé par l'absence de différence significative entre les traitements pour le taux de respiration de la cytochrome c oxydase ($p = 0,701$; Figure 8), une mesure fortement corrélée au contenu mitochondrial (Larsen *et al.* 2012). Individuellement, aucune lignée MA ne présente une activité de CS ou un taux de respiration du CIV différant de la moyenne des isolats non-MA (tests de Dunnett, $p > 0,05$).

2.3.3 Impacts des traitements d'accumulation de mutations sur le ratio ADN_{mt}/ADN_n

À 18°C, les moyennes du ratio ADN_{mt}/ADN_n étaient plus élevées pour les groupes contraints à l'accumulation de mutations que pour le groupe contrôle (Figure 9). Les lignées MA Ctrl avaient un ratio moyen significativement plus élevé que les isolats non-MA (Tukey, $p < 0,001$), représentant une hausse d'environ 33% du nombre de copies d'ADN_{mt} par copie d'ADN_n. Le ratio ADN_{mt}/ADN_n moyen des lignées MA Cu n'était pas significativement différent de celui des isolats non-MA ($p = 0,068$), mais était environ 16% plus élevé que celui des isolats MA contrôles. L'importante variance inter-lignée au sein du traitement MA Cu, avec notamment la présence de deux lignées (C268 et C291) ayant un ratio ADN_{mt}/ADN_n sous la moyenne du groupe non-MA, peut expliquer l'absence de différence significative entre les ratios moyens d'ADN de ces deux traitements (Figure 10). En effet, les V_L des lignées d'accumulation de mutations étaient plus importantes que celle des isolats non-MA et ce particulièrement pour le traitement MA Cu (F-test, $p < 0,001$; Tableau 6).

À 27°C, aucune différence n'était observée entre les traitements au niveau du ratio moyen d'ADN_{mt}/ADN_n ($p = 0,259$; Figure 9). À cette température, le ratio ADN_{mt}/ADN_n moyen des isolats non-MA n'a pas significativement changé par rapport à celui observé à 27°C (Tableau 7). Par contre les ratios des traitements MA Ctrl et MA Cu ont diminué par rapport à ceux observés

à 27°C, rejoignant un niveau similaire à celui du traitement contrôle non-MA. A 27°C, la variance inter-lignée du groupe contrôle non-MA était plus élevée qu'à 18°C (F-test, $p = 0,046$) et était semblable à celle du groupe MA Ctrl ($p = 0,427$). La V_L du groupe MA Cu était plus élevée que celle des autres traitements ($p = 0,009$ par rapport à non-MA; $p = 0,013$ par rapport à MA Ctrl).

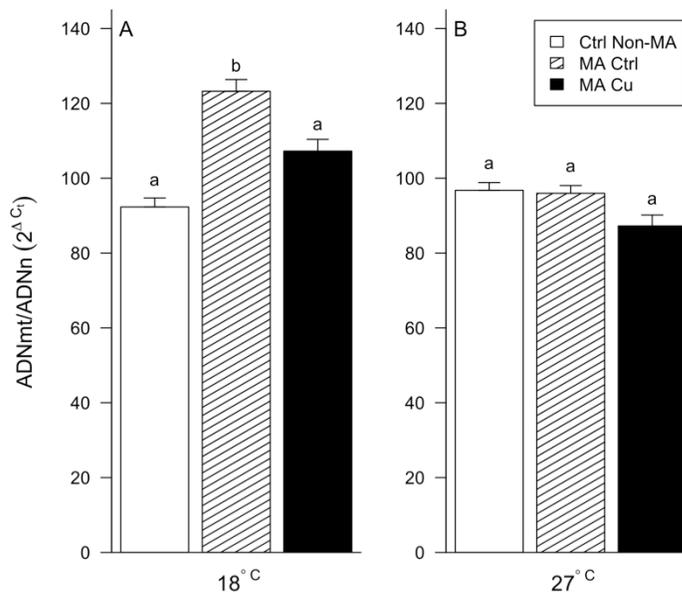


Figure 9 : Quantité relative d'ADNmT par copie d'ADNn chez des daphnies issues des trois traitements évolutifs. L'ADN a été dosé chez des daphnies élevées en conditions thermiques standard (A) et stressante (B). Le ratio ADNmT/ADNn est exprimé sous la forme du $2^{\Delta C_t}$ et les résultats sont présentés comme la moyenne \pm erreur type. Pour chaque température, les groupes significativement différents entre eux (Tukey HSD) sont identifiés par des lettres différentes.

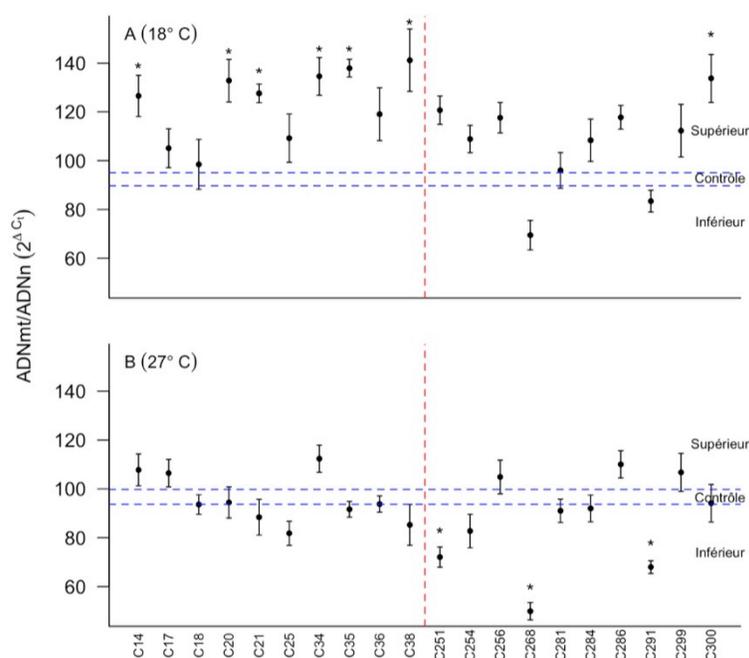


Figure 10 : Ratios ADNmt/ADNn pour chacune des lignées MA de daphnies élevées à 18°C (A) et 27°C (B). Les lignées C14 à C38 ont accumulé des mutations en milieu bénin (MA Ctrl) et les lignées C251 à C300 ont accumulé des mutations en milieu enrichi de cuivre (MA Cu). Les lignes pointillées bleues représentent la moyenne \pm l'erreur type des isolats contrôles non-MA. Les lignées dont la moyenne diffère significativement de la moyenne des isolats contrôles non-MA sont marquées d'un * (test de Dunnett, $p < 0,05$).

Tableau 6 : Moyennes \pm écarts types, variances génétiques (V_L), coefficients de variation génétique (CV_L) et variances environnementales (V_e) des ratios ADNmt/ADNn des daphnies issues de trois différents traitements évolutifs (non-MA, MA Ctrl et MA Cu).

	Temp.	Traitement	Moyenne \pm SE	V_L	CV_L (%)	V_e
ADNmt/ADNn (2^{AC_T})	18°C	Ctrl non-MA	92,31 \pm 2,40	18,44	4,65	328,21
		MA Ctrl	123,23 \pm 3,15	137,66* ^a	9,52 (i)	469,82
		MA Cu	107,20 \pm 3,17	305,28* ^a	16,30 (i)	317,39
	27°C	Ctrl non-MA	96,76 \pm 2,06	60,32*	8,03	194,77
		MA Ctrl	95,96 \pm 2,07	68,38*	8,62	187,51
		MA Cu	87,22 \pm 2,93	336,17* ^{ab}	21,02 (i)	195,20

*Indique une variance inter-lignées significative (ANOVA, $p < 0,05$).

^aIndique une différence significative de ce traitement MA par rapport au traitement non-MA (F-test, $p < 0,05$) et la flèche souligne le sens de cette différence.

^b Indique une différence significative du traitement MA Cu par rapport au traitement MA Ctrl (F-test, $p < 0,05$).

2.3.4 Impacts des traitements d'accumulation de mutation sur la plasticité du ratio ADN_{mt}/ADN_n

Le modèle linéaire mixte analysé pour mesurer l'impact des traitements sur la plasticité indiquait des effets significatifs de l'environnement thermique ($p < 0,001$) et du traitement évolutif ($p = 0,018$) ainsi qu'une interaction $G \times E$ significative ($p < 0,001$) pour le ratio ADN_{mt}/ADN_n . L'inspection visuelle des normes de réactions montre une disparité entre les trois traitements, le groupe contrôle non-MA se distinguant particulièrement des traitements MA (Figure 11). Les moyennes du traitement non-MA ne différaient pas entre 18 et 27°C (ANOVA, $p = 0,137$) alors que les moyennes des traitements MA Ctrl et Cu étaient significativement plus faibles à 27°C qu'à 18°C ($p < 0,001$).

Au sein du traitement non-MA, la température et les lignées n'avaient pas d'effet significatif, mais une interaction $G \times E$ significative était présente (Tableau 7), indiquant des réponses plastiques variables entre les lignées se traduisant par des changements dans l'ordre de celles-ci entre les températures sans que la moyenne des ratios d'ADN ne soit affectée. C'est effectivement ce que montrent les normes de réaction avec sept lignées ayant des pentes ascendantes d'inclinaisons très variables et trois lignées ayant des pentes descendantes.

Les deux traitements MA montraient des réponses plastiques très différentes du contrôle non-MA, mais similaires entre elles. Pour ces traitements, les effets de la température, des lignées ainsi que leurs interactions étaient significatifs (Tableau 7). De façon générale, les normes de réaction montrent une pente négative entre 18 et 27°C, à l'exception de la lignée C17 qui est légèrement positive (Figure 11). Le stress thermique affecte donc pratiquement toujours le ratio ADN_{mt}/ADN_n à la baisse pour les daphnies ayant été soumises à l'accumulation de mutations alors que les isolats du groupe contrôle répondaient davantage par une légère hausse de leur ratio d' ADN_{mt} .

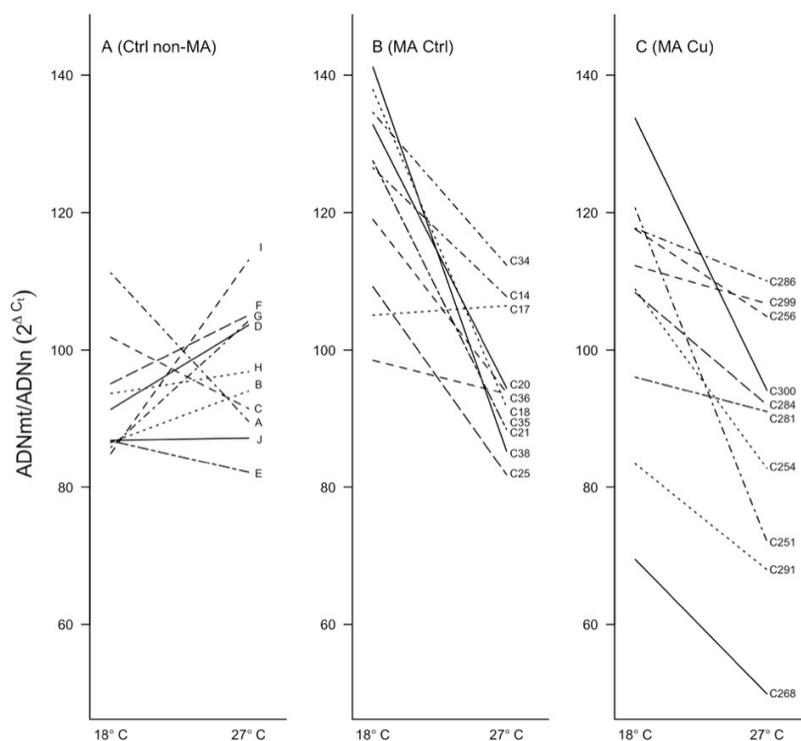


Figure 11 : Plasticité thermique du ratio ADNmt/ADNn des isolats non-MA et des lignées MA. Les moyennes ($n = 8$) de chaque isolat ou lignée à 18°C et 27°C sont présentées et reliées entre elles par des lignes distinctes. Les barres d'erreurs ont été retirées afin de faciliter la lecture.

Tableau 7 : Valeurs de p des analyses de variance effectuées pour tester la plasticité thermique du ratio ADNmt/ADNn des lignées à l'intérieur de chacun des traitements évolutifs. Une interaction $G \times E$ significative ($p < 0,05$) indique des différences entre les réponses plastiques des lignées d'un traitement. Les résultats du F-test (valeurs de p) indiquent si les variances inter-lignées entre les deux températures sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Tablea	Traitement	ANOVA			F-TEST
		Temp.	Lignée	$G \times E$	$V_L (18 - 27^\circ C)$
Ratio ADNmt/ADNn (2^{ACt})	Ctrl non-MA	0,137	0,194	0,019	0,046
	MA Ctrl	<0,001	0,005	0,006	0,156
	MA Cu	<0,001	<0,001	0,014	0,444

2.4 DISCUSSION

2.4.1 Taux de respiration mitochondriale plus faible au sein des traitements d'accumulation de mutations

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer si l'accumulation de mutations héréditaires affectait les performances mitochondriales de *D. pulex*. Pour ce faire nous avons mesuré *in situ* la capacité respiratoire des mitochondries des daphnies en fournissant les substrats des voies du NADH (pyruvate et malate) et du succinate pour alimenter le STE. La principale différence entre les traitements évolutifs était un taux de respiration mitochondriale moyen réduit d'environ 10% chez les lignées MA par rapport aux isolats du contrôle compétitif. Cette différence était observée autant lorsque le STE était alimenté par la voie du NADH que par la voie du succinate, mais le taux de respiration du complexe IV ne présentait pas de différence significative entre les traitements. Ces résultats suggèrent que les mutations accumulées affectent principalement les fonctions des complexes en amont du complexe IV. Le taux de respiration basale non couplée à la phosphorylation (LEAK), qui reflète essentiellement la fuite de protons à travers la membrane interne, n'était pas non plus significativement différent entre les traitements, appuyant l'hypothèse que la différence se situait au niveau des fonctions des complexes respiratoires.

La plus faible capacité de l'OXPPOS observée chez les groupes ayant subi de l'accumulation de mutations devrait se traduire directement sur la capacité énergétique des organismes. Il a été précédemment montré que, chez les daphnies, la respiration mitochondriale est contrôlée par le système de transport des électrons et non par le système de phosphorylation (Lemieux et Warren 2012). En diminuant la capacité de production d'ATP, l'accumulation de mutations pourrait donc engendrer une limitation de l'activité aérobie au moins dans les conditions de stress thermique testées ici. Des différences de cet ordre entre les capacités catalytiques des complexes mitochondriaux (variants de quelques pourcents à 30% selon les conditions thermiques) de mitotypes intraspécifiques ont d'ailleurs déjà été associées à des

différences au niveau des traits d'histoire de vie chez les drosophiles (Ballard *et al.* 2007; Pichaud *et al.* 2012; Correa *et al.* 2012).

Deux principaux phénomènes peuvent expliquer les différences observées entre les traitements, soit 1) la diminution de la capacité catalytique dans les lignées MA par rapport à la condition ancestrale causée par l'accumulation de mutations délétères et/ou 2) l'amélioration de la capacité catalytique mitochondriale des isolats non-MA suivant une sélection positive. La première hypothèse est généralement considérée comme étant la plus parcimonieuse pour les expériences de lignées MA. Cette interprétation est appuyée par les nombreux exemples montrant que, de façon générale, l'accumulation de mutations se traduit par une diminution de la valeur moyenne des traits phénotypiques complexes (Halligan & Keightley 2009; Schaack *et al.* 2013; Huey *et al.* 2003). Toutefois, le design expérimental utilisé ne nous permet pas d'éliminer complètement l'hypothèse que les daphnies du contrôle non-MA aient subi une sélection positive. Des exemples d'adaptation rapide aux conditions de laboratoire sont connus chez des invertébrés (Hoffmann et Ross 2018). Les analyses moléculaires réalisées précédemment sur les lignées MA n'ont pas détecté de telles signatures d'adaptation, mais il a été suggéré que de la sélection positive équilibrante aurait pu agir dans le traitement contrôle non-MA pour favoriser le maintien de la diversité moléculaire observée dans ce groupe (Flynn *et al.* 2017). La faible variabilité inter-lignées et l'absence de différence significative entre les variabilités génétiques des différents traitements compliquent l'interprétation des résultats. On ne retrouve pas la signature typique des expériences d'accumulation de mutations où les nouvelles mutations acquises de façons indépendantes dans chaque lignée induisent une plus grande variance génétique au sein des traitements MA.

Malgré cette absence de variabilité inter-lignées significative, plusieurs évidences empiriques et théoriques supportent l'hypothèse suggérant une diminution de la capacité catalytique causée par l'accumulation de mutations. Les analyses moléculaires réalisées antérieurement sur les lignées MA montraient qu'elles avaient un plus haut taux de mutations réalisés que les isolats du contrôle non-MA (Flynn *et al.* 2017; Chain *et al.* 2018). La sélection purifiante est donc à l'œuvre dans le groupe contrôle et permet d'éliminer efficacement des

mutations délétères qui, au contraire, s'accumulent dans les lignées MA. Conséquemment, l'hypothèse la plus parcimonieuse serait que les divergences de respiration mitochondriale observées entre les traitements sont, au moins partiellement, expliquées par la plus importante accumulation de mutations délétères dans les lignées MA. Les effets phénotypiques observés sur les traits d'histoire de vie de ces mêmes lignées de daphnies (baisse de la moyenne et hausse de la variance inter-lignée) montraient d'ailleurs que les mutations accumulées avaient des effets phénotypiques négatifs (voir chapitre 1). L'interprétation d'un effet mutationnel négatif sur le phénotype mitochondrial des lignées MA est également supportée par les caractéristiques du génome mitochondrial. Il a été précédemment montré que le taux de mutation des *D. pulex* était plus élevé dans l'ADNmt que l'ADNn (Xu *et al.* 2012). Bien que de la sélection positive puisse s'y produire (Ruiz-Pesini *et al.* 2004), l'évolution de l'ADNmt semble principalement déterminée par la dérive génétique et la sélection purifiante (Stewart *et al.* 2008; Rand 2001; Bazin, Glémin, et Galtier 2006). La probabilité qu'une forte sélection positive se soit produite dans ce génome au cours de la durée limitée de cette expérience est donc peu probable.

La distribution des effets des traitements MA sur la capacité mitochondriale des daphnies est étonnamment similaire aux effets précédemment observés suite à l'accumulation de mutations dans l'ADNmt des cellules somatiques de souris mutées (Edgar *et al.* 2009). Dans cette étude, les mitochondries ayant un taux de mutations artificiellement élevé (allèle mutateur pour ADNmt) avaient une diminution d'environ 15% de la respiration maximale (avec substrats du complexe I), mais aucun effet sur la respiration au repos. La correspondance entre les patrons observés chez ces souris et nos daphnies pourraient être causée par la présence de mécanismes de mutations similaires entre l'ADNmt des cellules somatiques et germinales. Edgar *et al.* (2009) proposent que le principal mécanisme moléculaire expliquant les effets phénotypiques observés serait l'induction de mutations ponctuelles non-synonymes affectant les gènes codants pour des protéines du STE. Les substitutions d'acides aminés dans les protéines synthétisées par ces gènes affecteraient la conformation et l'assemblage des sous-unités des complexes respiratoires ce qui expliquerait la diminution de l'efficacité des complexes, mais aussi une hausse du taux de dégradation des protéines mitochondriales instables. La sélection purifiante pourrait éliminer une importante proportion de telles mutations non-synonymes se

déposant dans l'ADNmt entre les générations (Stewart *et al.* 2008). Les mécanismes identifiés pour expliquer l'action de la sélection purifiante dans le génome mitochondrial (asexué et peu sujet à de la recombinaison) sont essentiellement liés à de la sélection intra-individuelle. Ces mécanismes pourraient donc être actifs même dans le contexte des lignées MA qui limitent l'action de la sélection inter-individuelle. Certaines évidences montrent malgré tout que certaines mutations échappent à la sélection (Fan *et al.* 2008; Taylor et Turnbull 2005). Il a d'ailleurs été montré que des mutations non-synonymes peuvent se maintenir dans le génome mitochondrial des *D. pulex* soumises à l'accumulation de mutations héréditaires (Xu *et al.* 2012).

2.4.2 L'exposition au cuivre n'affecte pas le taux de respiration mitochondriale des daphnies ayant accumulé des mutations

Contrairement à ce qui était attendu, aucune différence n'est observée entre les capacités mitochondriales des lignées MA Ctrl et MA Cu. Ce patron contraste avec les différences significatives observées entre ces deux groupes pour le taux de mutations nucléaires et les traits d'histoire de vie (Chain *et al.* 2018, chapitre 1). L'absence d'effet de l'exposition au cuivre sur la respiration mitochondriale pourrait suggérer que ce métal affecte moins le taux et la distribution des mutations dans l'ADNmt que dans l'ADNn. Cette hypothèse semble peu probable considérant que plusieurs études ont montré que l'ADNmt serait sensible aux dommages induits par les contaminants, dont le cuivre (Meyer *et al.* 2013; Rumsey *et al.* 2018; Hosseini *et al.* 2014). Toutefois, d'autres études suggèrent que l'ADNmt pourrait être résilient face aux effets mutagènes des contaminants chimiques (Valente *et al.* 2016; Melvin et Ballard 2017). Un séquençage des génomes mitochondriaux pour caractériser les mutations déposées dans les lignées des deux traitements serait nécessaire afin de tester plus avant la plausibilité de cette hypothèse.

2.4.3 La distribution des effets mutationnels et/ou des mécanismes de compensation pourraient expliquer la faible variabilité génétique

La distribution des effets mutationnels sur la respiration mitochondriale est également caractérisée par une faible variabilité entre les lignées MA qui contraste avec ce qui est généralement attendu dans les expériences d'accumulation de mutations. Ce patron, combiné à la baisse de moyenne de plusieurs paramètres de respirométrie, suggère que les effets mutationnels sur la respiration mitochondriale seraient davantage générés par les effets cumulés de nombreuses mutations de faibles effets plutôt que par quelques mutations de plus grands effets. Cette distribution d'effets s'oppose à ce qui était estimé pour les variables de traits d'histoire de vie (chapitre 1), mais correspond davantage au patron suggéré par la théorie du cliquet de Müller. Ce patron reste par ailleurs cohérent avec une capacité des mitochondries à éliminer les plus grosses mutations par sélection purifiante intra-individuelle, mais pas celles de plus faibles effets.

Divers mécanismes de compensation pourraient contribuer à limiter la variance entre les lignées –et entre les traitements MA Ctrl et MA Cu– en permettant d'atténuer les impacts négatifs des mutations et d'ainsi maintenir un certain niveau de respiration mitochondriale plus uniforme entre les lignées. Les mitochondries sont des organites capables d'une réponse plastique importante pour s'ajuster aux variations normales des demandes énergétiques, mais aussi à d'éventuelles dysfonctions ou aux mutations (Lee *et al.* 1998; Ballard et Melvin 2011; Blier, Lemieux, et Pichaud 2014). Les réponses compensatoires reconnues des mitochondries comprennent la hausse du nombre de protéines mitochondriales, du nombre de copies d'ADNmt, de la quantité de mitochondries et de l'activité catalytiques d'enzymes mitochondriales ainsi que la réorganisation des mitochondries (Bratic *et al.* 2009; Verkaart *et al.* 2007; Bess *et al.* 2012; Hood *et al.* 2006; H.-C. Lee et Wei 2005; Van Bergen *et al.* 2011).

À 18°C, les concentrations en ADNmt plus élevées chez la majorité des lignées MA par rapport au contrôle non-MA suggèrent l'existence d'une telle réponse compensatoire suivant l'accumulation de mutations. Une hausse du nombre de copies d'ADNmt est un des mécanismes compensatoires les plus fréquemment observés dans les mitochondries en lien avec des

pathologies, le vieillissement ainsi que diverses sources de stress exogène (température, contaminants, etc.) (Bai et Wong 2005; Crane *et al.* 2013; Rumsey *et al.* 2018; Fetterman, Sammy, et Ballinger 2017; Bai *et al.* 2004; Bratic *et al.* 2009). Les dysfonctions mitochondriales légères induiraient une réponse rétrograde favorisant la réplication de l'ADNmt, probablement induite par une hausse du niveau de ROS (Moreno-Loshuertos *et al.* 2006; Lee et Wei 2005). L'interprétation courante est qu'un niveau élevé d'ADNmt permettrait de maintenir un excès fonctionnel visant à assurer un bon niveau d'expression génique, protégeant ainsi les organismes contre un déclin du métabolisme énergétique (Atamna *et al.* 2018; Lee et Wei 2005). Il a précédemment été montré que des mutations légères, non pathologiques, affectant les fonctions mitochondriales pouvaient également susciter une réponse compensatoire du contenu en ADNmt (Correa *et al.* 2012; Ballard et Melvin 2011). Chez les drosophiles, les effets négatifs de mutations sur leur respiration mitochondriale seraient atténués notamment en augmentant leur contenu en ADNmt durant leur développement (Correa *et al.* 2012). Dans notre étude, l'observation d'un ratio ADNmt/ADNn de l'ordre de 15 à 30% plus élevé dans les traitements MA que dans le contrôle est donc compatible avec une réponse compensatoire suite à l'accumulation de mutations spontanées légèrement délétères. De plus, contrairement au patron de la respiration mitochondriale, les traitements MA affichent une plus grande variabilité inter-lignées que le contrôle pour le contenu en ADNmt. Cette distribution est en accord avec une compensation variable en réponse à des mutations aléatoires accumulées indépendamment dans chaque lignée. Cette variation inter-lignées est donc cohérente avec l'hypothèse de mécanismes physiologiques intermédiaires permettant d'alléger et de contraindre les effets négatifs des mutations visibles sur le taux de respiration mitochondrial.

2.4.4 La réponse compensatoire mitochondriale aux mutations délétères pourrait être limitée face à un niveau de stress trop élevé

Contrairement à l'effet attendu suite à une hausse du niveau de stress, le nombre de copies d'ADNmt a diminué entre 18°C et 27°C dans les traitements d'accumulation de mutations. Cette réponse plastique est à l'opposé de ce qui avait été précédemment observé chez

les nématodes exposés à un stress thermique (Bratic *et al.* 2009). Cet effet négatif du stress thermique ramène la concentration en ADNmt des lignées MA au même niveau que la concentration du contrôle non-MA qui, elle, reste stable. Des diminutions du nombre de copies d'ADNmt ont déjà été documentées suivant l'exposition à un stress élevé (Lee *et al.* 1998; Yuzefovych *et al.* 2013). Une étude a aussi montré que des souris knock-out pour l'enzyme de défense anti-oxydante Sod2, qui doivent déjà gérer un important niveau de stress oxydant basal, ne réussissaient pas à générer la même hausse compensatoire d'ADNmt que leurs congénères de type sauvage lorsqu'elles étaient exposées à une nouvelle source de stress (Crane *et al.* 2013). Ainsi, si un niveau modéré de stress peut générer une réponse compensatoire, un stress trop important ou persistant pourrait empêcher les mitochondries de maintenir cette réponse (Lee et Wei 2005). La différence de plasticité thermique de l'ADNmt entre les traitements MA et non-MA pourrait donc refléter une plus faible capacité des daphnies affectées par des mutations spontanées à gérer une hausse de stress environnemental.

La grande variabilité inter-lignées pour le nombre de copies d'ADNmt indique que certaines lignées pourraient avoir plus de difficulté à répliquer leur génome mitochondrial pour le maintenir en concentration cellulaire suffisante, que ce soit en condition standard ou stressante. Dans le cas de ces lignées MA Cu, les effets délétères plus importants des mutations accumulées pourraient ainsi représenter en eux-mêmes un stress suffisamment important pour compromettre la réponse compensatoire de l'ADNmt, même en conditions thermiques optimales. C'est particulièrement le cas des lignées C268 et C291 qui ne présentent pas la même réponse compensatoire que les autres lignées MA à 18°C et dont le ratio ADNmt/ADNn est encore davantage diminué à 27°C. Ces lignées, qui affichaient également les plus faibles performances au niveau des traits d'histoire de vie, avaient été identifiées comme ayant probablement une charge mutationnelle plus importante (chapitre 1). Les mutations délétères accumulées dans ces lignées pourraient entraver la réplication de l'ADNmt. Cet effet pourrait être médié par une hausse excessive de stress oxydatif causé par ces mutations (Lee et Wei 2005). Une hypothèse alternative, mais non mutuellement exclusive, serait que des mutations dans la région contrôle de la D-loop –identifiée comme un hot-spot de mutations chez cette espèce– empêche la réplication efficace du génome mitochondrial (Xu *et al.* 2012). De telles

mutations pourraient affecter la compatibilité entre les sites promoteurs de réplifications situés dans cette région et la polymérase mitochondriale (Burton, Ellison, et Harrison 2006). Des diminutions du nombre de copies d'ADNmt ont été associées à des mutations dans la région de la D-loop chez des cellules cancéreuses (Lee *et al.* 2004). Les lignées C268 et C291 réussissaient malgré tout à maintenir un taux de respiration mitochondrial similaire aux autres lignées. Cette absence d'impact direct mesurable sur la respiration mitochondriale suggère que le nombre de copies d'ADNmt maintenues chez ces daphnies reste suffisant pour assurer les fonctions mitochondriales.

2.4.5 Conclusion

La plus faible capacité mitochondriale et la hausse du contenu en ADNmt observées dans les traitements MA par rapport au contrôle non-MA indiquent que les fonctions mitochondriales sont négativement affectées par les mutations accumulées dans ces traitements pendant plus de 120 générations. Il s'agit ainsi de la première étude à montrer que l'accumulation de mutations héréditaires peut avoir des effets délétères sur les mitochondries. Tel qu'attendu, nos résultats suggèrent qu'une réponse compensatoire –comprenant, mais ne se limitant pas nécessairement à une hausse du niveau d'ADNmt– peut être déclenchée pour pallier aux effets mutationnels. Cette réponse permettrait d'ajuster les fonctions mitochondriales et pourrait expliquer le faible niveau de variation inter-lignées observé pour la capacité mitochondriale. La réponse du niveau d'ADNmt est par ailleurs dépendante des conditions environnementales. En conditions thermiques stressantes, les mécanismes compensatoires pourraient être limités et résulter en une baisse de la capacité respiratoire. Il serait intéressant de tester si d'autres mécanismes mitochondriaux compensatoires sont activés chez ces lignées MA de daphnies. Séquencer l'ADNmt afin d'identifier les mutations s'étant déposées dans les lignées MA permettrait également de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les mutations spontanées peuvent produire les effets observés sur la respiration mitochondriale.

CONCLUSION GENERALE

Le premier objectif de la présente étude visait à mieux comprendre comment la présence d'un contaminant environnemental comme le cuivre peut affecter le phénotype des organismes en modifiant le processus d'accumulation de mutations. Des études antérieures avaient montré que les daphnies des lignées MA utilisées pour cette étude avaient un taux d'accumulation de mutations supérieur à celui des daphnies contrôles et que les lignées élevées en présence de cuivre avaient un taux supérieur à celui des daphnies élevées en milieu bénin pour certains types de mutations (Flynn *et al.* 2017; Chain *et al.* 2018). Toutefois, les impacts phénotypiques de ces différences n'avaient pas encore été testés. Une bonne compréhension de la distribution des effets mutationnels est essentielle pour évaluer les conséquences potentielles de l'accumulation de mutations pour les populations naturelles. Le deuxième objectif de notre étude était de tester plus spécifiquement comment les fonctions mitochondriales sont affectées par les mutations spontanées accumulées en présence ou non de cuivre. Les effets de l'accumulation de mutations héréditaires sur le phénotype mitochondrial n'avaient auparavant jamais été directement testés en dépit de la plus grande sensibilité de l'ADNmt à ce processus évolutif. L'impact des mutations sur les mitochondries nous apparaissait d'autant plus pertinent à tester que les variations génotypiques et phénotypiques mitochondriales ont souvent été identifiées comme pouvant avoir une influence importante sur les traits d'histoire de vie des organismes (par exemple Denver *et al.* 2000; Ballard *et al.* 2007). Pour répondre à ces questions nous avons mesuré et comparé des traits d'histoire de vie et des traits mitochondriaux de lignées de daphnies ayant accumulé des mutations en milieu bénin et en milieu enrichi en cuivre ainsi que de daphnies contrôles ayant été élevées dans un environnement limitant l'accumulation de mutations. Les traits phénotypiques ont été mesurés à température optimale (18°C) et stressante (27°C) ou uniquement à température stressante. Ce choix a été motivé par les

nombreux exemples retrouvés dans la littérature où des conditions stressantes exacerbent les effets mutationnels (par exemple Krasovec *et al.* 2016; Shabalina *et al.* 1997; Szafraniec *et al.* 2001).

Les résultats des traits d'histoire de vie révèlent des impacts phénotypiques plus importants chez les daphnies ayant accumulé des mutations en présence de cuivre qu'en milieu bénin. Les mutations spontanées accumulées dans les lignées MA Ctrl avaient peu d'impact sur les traits d'histoire de vie des daphnies par rapport au contrôle non MA. Une seule des dix lignées testées se distinguait de la moyenne des daphnies contrôles avec un délai prolongé avant la première portée et des portées moins productives, particulièrement en conditions thermiques stressantes. Le plus grand nombre de mutations accumulées se traduisait aussi par une tendance non significative vers une plus faible fertilité moyenne des daphnies MA Ctrl que non MA lorsqu'elles étaient exposées à des conditions environnementales stressantes. Parmi les lignées MA Cu, ce sont cinq des dix lignées testées qui présentaient une réduction significative d'au moins un trait d'histoire de vie par rapport à la moyenne des daphnies contrôles. De façon globale, une différence significative entre la moyenne de ce traitement et celle du groupe contrôle non-MA pour l'âge à première portée à 18°C et pour la taille moyenne de portée à 27°C étaient aussi observées. Ces résultats démontrent que l'exposition au cuivre peut non seulement modifier le processus d'accumulation de mutations, mais que cela se traduit aussi au niveau du phénotype par des effets mutationnels plus importants.

Nous émettons l'hypothèse que les différences phénotypiques observées entre les traitements MA Cu et MA Ctrl sont au moins partiellement imputables au plus grand nombre de mutations de type CNVs (délétions ou duplications de longs fragments d'ADN) s'étant déposées dans les génomes des lignées MA exposées au cuivre. Cette différence au niveau du taux d'accumulation de mutations de type CNVs et, plus spécifiquement, de larges délétions, était le principal patron mutationnel distinctif des lignées MA Cu par rapport aux lignées MA Ctrl (Chain *et al.* 2018). En raison des disparités entre les lignées échantillonnées par les deux études, des tests de corrélations entre les résultats

génomiques de Chain *et al.* (2018) et nos résultats phénotypiques n'ont pas été faits pour tester cette hypothèse. Nous pouvons toutefois souligner que parmi les huit lignées MA Cu testées dans les deux études, les trois lignées qui avaient le plus grand nombre de CNVs (i.e. C291, C251 et C281) ressortaient également comme ayant un impact mutationnel négatif significatif pour au moins un des traits d'histoire de vie testés. Ces correspondances, bien que limitées, suggèrent que les effets phénotypiques observés dans les lignées exposées au cuivre pourraient être liés à la présence de quelques mutations de larges effets. Cette étude met en lumière la pertinence de conduire davantage de recherches combinant séquençage et tests phénotypiques afin de mieux comprendre comment les mutations se déposent, quels sont leurs impacts potentiels et comment ces paramètres sont influencés par les conditions environnementales.

Pour les traits mitochondriaux, les résultats montrent que l'accumulation de mutations se traduisait par des effets négatifs sur les fonctions respiratoires de ces organites. En moyenne, les daphnies des deux traitements MA avaient une respiration mitochondriale de 9 à 13% plus faible que celles du traitement contrôle selon les substrats fournis (mesuré à 27°C). Ces différences étaient significatives pour les traitements MA Ctrl et MA Cu au moins dans le cas de la respiration maximale mesurée avec les substrats des voies NADH et succinate. Les lignées MA Ctrl présentaient également une hausse significative de leur concentration relative en ADNmt en conditions thermiques standard. La même tendance était observée pour les lignées MA Cu, mais cette différence n'était pas significative pour ce traitement, notamment en raison d'une plus grande variabilité inter-lignées. Une hausse du nombre de copies d'ADNmt est une réponse compensatoire mitochondriale qui a été notamment documentée suite à des pathologies, au vieillissement et à l'exposition à des stress environnementaux (Lee et Wei 2005; Bratic *et al.* 2009; Fetterman *et al.* 2017). La présence de cette réponse dans les lignées MA suggèrent également que les mutations accumulées dans les lignées MA provoquent des effets mitochondriaux négatifs. Notre étude est, à notre connaissance, la première à montrer que les fonctions mitochondriales peuvent effectivement être affectées négativement par l'accumulation de mutations spontanées héréditaires.

En affectant négativement la production énergétique, la diminution du taux de respiration mitochondriale pourrait avoir des effets sur les traits d'histoire de vie. Toutefois, la comparaison des résultats de respiration mitochondriale avec les données de traits d'histoire de vie recueillies sur les mêmes lignées de daphnies ne permet pas d'établir de relation de corrélation. Les patrons généraux qui ressortaient dans l'analyse des traits d'histoire de vie –soit de plus importants effets mutationnels dans le traitement MA Cu que MA Ctrl et des effets variables entre les lignées– ne sont pas retrouvés pour la respiration mitochondriale. Contrairement à ce qui était observé au niveau des traits d'histoire de vie, les traitements MA Ctrl et MA Cu ne différaient pas entre eux pour aucun des paramètres de respirométrie et aucune lignée MA ne présentait un phénotype significativement plus faible que la moyenne du traitement contrôle pour ces variables. Ces patrons se distinguent aussi de ce qui est généralement attendu et observé au niveau des effets phénotypiques des expériences d'accumulation de mutations dans lesquelles les mutations accumulées de façon indépendante génèrent habituellement une plus grande variabilité inter-lignées. Il est possible que la capacité des mitochondries à moduler leur activité par différents mécanismes compensatoires puisse expliquer les plus faibles variabilités inter-lignées et inter-traitements pour les variables de respirométrie. La présence d'une hausse compensatoire du ratio ADNmt/ADNn chez les lignées MA Ctrl à 18°C supporte cette hypothèse. Toutefois, la réponse compensatoire des lignées ne se limite probablement pas à ce seul mécanisme.

La réponse compensatoire mitochondriale pourrait aussi être affectée négativement par l'accumulation de mutations. Le ratio ADNmt/ADNn moyen du traitement MA Cu à 18°C, bien que légèrement plus élevé que celui du groupe contrôle, ne se distinguait pas significativement de ce dernier, mais était significativement plus faible que celui du traitement MA Ctrl. Nous interprétons ce résultat comme une capacité limitée des lignées MA Cu à générer une réponse mitochondriale compensatoire équivalente à celle observée dans le traitement MA Ctrl en raison de leur taux d'accumulation de mutations plus important. Ceci serait particulièrement vrai pour les lignées ayant accumulé davantage de mutations. Cette hypothèse est supportée par certaines correspondances entre les ratios

ADNmt/ADNn, les traits d'histoire de vie et le nombre de CNVs accumulés chez les lignées MA Cu. Les deux lignées ayant le plus faible ratio ADNmt/ADNn à 18°C comme à 27°C sont les lignées C268 et C291. Ces lignées avaient déjà été identifiées comme ayant probablement plus de mutations délétères puisqu'elles avaient aussi des effets mutationnels négatifs sur leurs traits d'histoire de vies. Il s'agit notamment des deux lignées avec les plus faibles valeurs adaptatives à 27°C. Une troisième lignée avait un ratio ADNmt/ADNn significativement plus bas que la moyenne du contrôle à 27°C. Cette lignée, la C251, affichait aussi une taille de portée plus faible en conditions de stress thermique. Au sein du traitement MA Cu on note d'ailleurs une corrélation positive significative entre le ratio ADNmt/ADNn et la taille de portée ou la valeur adaptative en conditions thermiques optimales (voir ANNEXE I). À 27°C, ces corrélations sont aussi significatives bien que plus faibles. Aussi, certaines lignées qui ressortent par leur plus faible concentration en ADNmt avaient un taux de CNVs plus élevé. Par exemple, les lignées C251 et C291 avaient accumulé des CNVs. Malheureusement cette information n'était pas disponible pour la lignée C268.

Une autre information importante qui ressort autant des analyses de traits d'histoire de vie que de contenus en ADNmt est que l'exposition à des conditions thermiques stressantes exacerbe plusieurs des effets négatifs de l'accumulation de mutations. En effet, l'exposition à 27°C permettait de révéler une tendance vers une réduction de la taille moyenne de portée chez les lignées MA Ctrl et une réduction significative de cette variable chez les lignées MA Cu. Alors que les isolats contrôles maintenaient leur ratio ADNmt/ADNn entre 18°C et 27°C, les lignées MA voyaient leur ratio diminuer significativement en conditions stressantes. Cette diminution est interprétée comme une incapacité des lignées MA à maintenir leur réponse compensatoire aux effets des mutations en conditions stressantes. Ces résultats sont similaires à ce qui avait été précédemment observé dans d'autres expériences de lignées MA où des conditions environnementales plus stressantes exacerbaient les effets phénotypiques délétères des mutations. À la lumière de nos données, il semble que les conséquences négatives de cette exacerbation pourraient être

particulièrement importantes pour les organismes ayant accumulé des mutations dans d'autres conditions stressantes, ici l'exposition au cuivre. Ces résultats illustrent bien comment l'accumulation et l'expression des mutations spontanées dépendent du contexte environnemental et souligne l'importance de tester les effets mutationnels dans plusieurs conditions environnementales. Une bonne compréhension des interactions entre l'accumulation de mutations et l'environnement est primordiale pour comprendre ce processus et ses conséquences sur les populations naturelles. L'accumulation de mutations légèrement délétères pourrait avoir des effets négatifs dans les populations si elle limite leur capacité à répondre à un nouveau stress. L'exacerbation des effets mutationnels à haute température était aussi généralement accompagnée d'une hausse de la variabilité mutationnelle entre les lignées. Il a été suggéré que ce patron pourrait permettre de tamponner les effets négatifs des mutations spontanées en permettant d'augmenter le taux d'évolution des populations (Latta *et al.* 2015).

En conclusion, nos résultats montrent que l'exposition au cuivre durant le processus d'accumulation de mutations peut engendrer, à long terme, des effets phénotypiques négatifs sur les fonctions physiologiques et les traits d'histoire de vie des daphnies, particulièrement si elles sont exposées à un stress environnemental supplémentaire comme une hausse de température. Ces résultats suggèrent que l'exposition à un contaminant environnemental qui peut modifier le taux d'accumulation de mutation (par exemple King *et al.* 2014; Somers *et al.* 2002) et/ou le type de mutations pourrait avoir des effets négatifs sur le métabolisme des organismes sauvages et leur survie. Les conséquences de ces effets mutationnels pour les populations naturelles restent difficiles à évaluer en raison des nombreux facteurs concomitants qui influencent le devenir des mutations. Toutefois nos résultats appuient l'importance de tenir compte des impacts que les contaminants peuvent avoir sur l'évolution des populations en modifiant le processus d'accumulation de mutations légèrement délétères, particulièrement dans un contexte de changements globaux. Ces impacts qui sont difficilement mesurables à court terme sont souvent ignorés des études de risques écotoxicologiques.

En démontrant que l'accumulation de mutations spontanées héréditaires se traduit chez les daphnies par une réduction du taux de respiration et une réponse compensatoire de l'ADNmt, notre étude apporte aussi des données empiriques importantes pour le débat entourant la question du rôle relatif de l'accumulation de mutations délétères dans l'évolution de ces organites. L'absence de correspondance entre les effets mutationnels sur la respiration mitochondriale et sur les traits d'histoire de vie ne permet pas de conclure, comme il a déjà été avancé, que les effets sur les fonctions physiologiques font le pont entre le génotype et les effets phénotypiques sur les traits liés à la valeur adaptative. Toutefois, les corrélations entre les traits d'histoire de vie et les ratios ADNmt/ADNn entre les traitements et au sein du traitement MA Cu suggèrent que les mécanismes de régulation des fonctions mitochondriales pourraient jouer un rôle important dans la médiation des effets mutationnels sur les fonctions mitochondriales, mais aussi les traits d'histoire de vie. Une possible explication est que des mécanismes compensatoires mitochondriaux peuvent être activés pour tamponner les effets des mutations spontanées délétères sur les fonctions mitochondriales, mais que ces mécanismes sont limités en conditions stressantes ou dans certaines lignées ayant accumulé plus de mutations délétères.

Parmi les limites importantes de notre jeu de données notons le fait que les analyses moléculaires disponibles ne recourent que partiellement notre échantillonnage des lignées MA et n'ont pas été faites sur les mêmes isolats contrôles que ceux que nous avons testés pour les traits phénotypiques. Aucune donnée sur le taux et les patrons de mutations ne sont disponibles pour l'ADNmt. Les mutations accumulées dans ce génome jouent vraisemblablement un rôle dans les effets phénotypiques, au moins pour les effets sur le métabolisme énergétique. Finalement les données de respirations mitochondriales n'ont été mesurées qu'à 27°C et non à 18°C comme c'était le cas pour les autres données phénotypiques. Il n'est donc pas possible de déterminer si la réduction du taux de respiration mitochondriale des lignées MA observée à 27°C suit la diminution de la réponse compensatoire de l'ADNmt et la réduction de la capacité de reproduction des lignées MA observées à cette température. Afin de palier à certaines de ces limitations et de tester plus avant les hypothèses sur les relations entre génotype et effets mutationnels mitochondriaux

et plus complexes, nous prévoyons procéder à l'analyse des mutations des génomes mitochondriaux des différentes lignées testées ainsi que d'isolats du groupe contrôle. De plus, nous testerons si d'autres mécanismes compensatoires mitochondriaux sont activés de façon différentielle entre les traitements. Bien que, selon les résultats de l'activité de la citrate synthase, le nombre de mitochondries ne semblait pas être modifié suivant l'accumulation de mutations, il serait possible de mesurer le contenu cellulaire en mitochondrie de façon plus directe (Passos *et al.* 2007). Une autre réponse compensatoire déjà associée à des mutations mitochondriales et qui pourrait être testée est la hausse de l'expression de gènes nucléaires codant pour des sous-unité mitochondriales (Ballard *et al.* 2010) et de la concentration des protéines en résultant (Edgar *et al.* 2009). L'activité de la LON protéase, une enzyme impliquée dans la dégradation des protéines oxydées pourrait également être mesurée puisqu'elle a été associée à la capacité des mitochondries à répondre à une hausse du niveau de stress (Ngo, Pomatto, et Davies 2013).

Une autre question qui serait intéressante à explorer à la lumière de nos résultats est le rôle potentiel des espèces réactives de l'oxygène comme mécanisme intermédiaire entre l'accumulation de mutations et les différents effets phénotypiques observés. Plusieurs études ont associé une hausse du niveau de mutation à une hausse de production d'ERO (Lee et Wei 2005; Wei et Lee 2002; Liu et Chen 2003). Dans une étude sur des lignées MA de nématodes il a aussi été montré que les organismes ayant accumulé des mutations spontanées avaient un niveau de production d'ERO et de dommages oxydatifs significativement plus élevé que celui de leur ancêtre commun (Joyner-Matos *et al.* 2013). Une hausse du niveau d'ERO suite à l'accumulation de mutations légèrement délétères dans les lignées de daphnies pourrait représenter un mécanisme physiologique intermédiaire faisant le pont entre le génotype des lignées, les effets phénotypiques sur les traits mitochondriaux et sur les traits plus complexes liés à la valeur adaptative. En effet, les mitochondries sont la principale source de production cellulaire d'ERO et celle-ci est reconnue comme un mécanisme important de régulation des fonctions mitochondriales. La production d'ERO agirait notamment comme signal de rétroaction pour maintenir un taux constant de respiration cellulaire (Moreno-Loshuertos *et al.* 2006; Sena et Chandel 2012).

Des concentrations modérées d'ERO peuvent notamment déclencher une hausse compensatoire du nombre de mitochondries et de copies d'ADNmt. Toutefois, en concentrations plus élevées, les ERO peuvent avoir des effets néfastes en augmentant les dommages oxydatifs et en perturbant la réponse cellulaire au stress (Lee et Wei 2005). La réponse compensatoire variable du contenu en ADNmt des différentes lignées pourrait être associée à des niveaux de production d'ERO différentiels selon les mutations déposées dans leurs génomes. Une hausse d'ERO a aussi été corrélée à une réduction de la survie et à la sénescence (Passos *et al.* 2007; Sena et Chandel 2012). Afin de tester si ce mécanisme peut être associé aux différences de contenus en ADNmt, de taux de reproduction et de valeur adaptative le niveau de production d'ERO des différentes lignées et des isolats contrôles pourrait être comparé. Pour ce faire il serait possible de mesurer un ou plusieurs indicateurs d'ERO comme le taux d'activité d'enzymes antioxydantes telles que la catalase et la superoxyde dismutase (De Block et Stoks 2008) ou encore le niveau de dommages oxydatifs à l'ADN (Joyner-Matos *et al.* 2013) des daphnies.

ANNEXE I

CORRELATIONS ENTRE LES RATIOS ADNmt/ADNn ET LES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES LIGNÉES MA CU

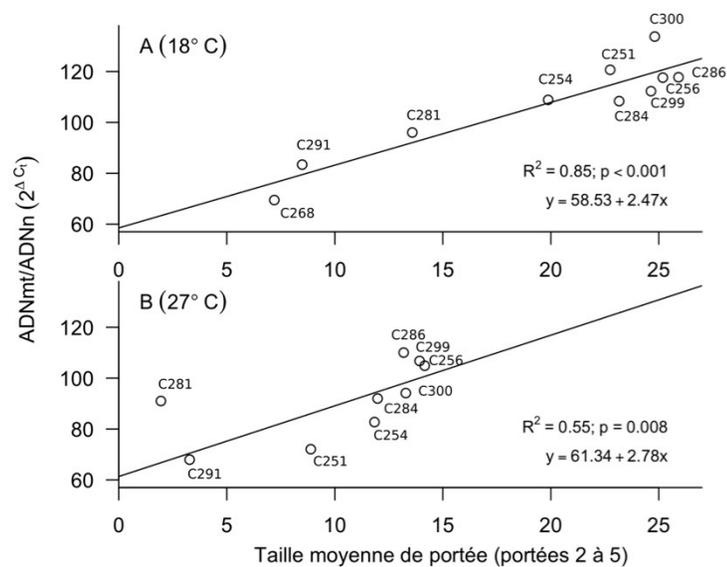


Figure A1 : Corrélation entre les moyennes des ratios ADNmt/ADNn et les moyennes de la taille moyenne de portée des lignées MA Cu.

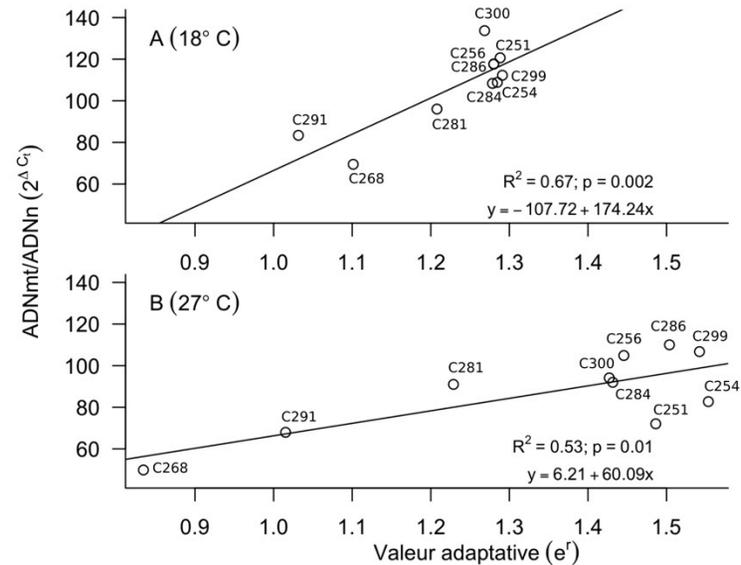


Figure A2 : Corrélation entre les moyennes des ratios ADNmt/ADNn et les moyennes de la valeur adaptative des lignées MA Cu.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Astles, P. A., A. J. Moore, et R. F. Preziosi. 2006. « A comparison of methods to estimate cross-environment genetic correlations ». *Journal of Evolutionary Biology* 19 (1): 114-22. doi:10.1111/j.1420-9101.2005.00997.x.
- Atamna, H., A. Tenore, F. Lui, et J. M. Dhahbi. 2018. « Organ reserve, excess metabolic capacity, and aging ». *Biogerontology* 19 (2). Springer Netherlands: 171-84. doi:10.1007/s10522-018-9746-8.
- Atienzar, F. A., V. V. Cheung, A. N. Jha, et M. H. Depledge. 2001. « Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. » *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 59 (2): 241-50.
- Baer, C. F., N. Phillips, D. Ostrow, A. Avalos, D. Blanton, A. Boggs, T. Keller, L. Levy, et E. Mezerhane. 2006. « Cumulative effects of spontaneous mutations for fitness in *Caenorhabditis*: Role of genotype, environment and stress ». *Genetics* 174 (3): 1387-95. doi:10.1534/genetics.106.061200.
- Baer, C. F., M. M. Miyamoto, et D. R. Denver. 2007. « Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. » *Nature reviews. Genetics* 8 (8): 619-31. doi:10.1038/nrg2158.
- Baer, C. F., F. Shaw, C. Steding, M. Baumgartner, A. Hawkins, A. Houppert, N. Mason, *et al.* 2005. « Comparative evolutionary genetics of spontaneous mutations affecting fitness in rhabditid nematodes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (16): 5785-90. doi:10.1073/pnas.0406056102.
- Bai, R.-K., C.-L. Perng, C.-H. Hsu, et L.-J. C. Wong. 2004. « Quantitative PCR Analysis of Mitochondrial DNA Content in Patients with Mitochondrial Disease ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011 (1): 304-9. doi:10.1196/annals.1293.029.
- Bai, R.-K., et L.-J., C. Wong. 2005. « Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion , and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease ». *The Journal of Molecular Diagnostics* 7 (5). American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology: 613-22. doi:10.1016/S1525-1578(10)60595-8.
- Ballard, J. William O., Richard G. Melvin, Michael Lazarou, Fiona J. Clissold, et Stephen J. Simpson. 2010. « Cost of a Naturally Occurring Two–Amino Acid Deletion in

- Cytochrome c Oxidase Subunit 7A in *Drosophila simulans* ». The American Naturalist 176 (4): E98-108. doi:10.1086/656263.
- Ballard, J. W. O., et R. G. Melvin. 2011. « Early life benefits and later life costs of a two amino acid deletion in *Drosophila simulans* ». Evolution 65 (5): 1400-1412. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01209.x.
- Ballard, J. W. O., R. G. Melvin, S. D. Katewa, et K. Maas. 2007. « Mitochondrial DNA variation is associated with measurable differences in life-history traits and mitochondrial metabolism in *Drosophila simulans* ». Evolution 61 (7): 1735-47. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00133.x.
- Ballard, J. W. O., et N. Pichaud. 2014. « Mitochondrial DNA: more than an evolutionary bystander ». Édité par Charles Fox. Functional Ecology 28 (1): 218-31. doi:10.1111/1365-2435.12177.
- Ballard, J. W. O., et R. G. Melvin. 2010. « Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. » Molecular ecology 19 (8): 1523-39. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04594.x.
- Barata, C., D. J. Baird, J. A. Nogueira, M. V. M. Soares, et M. C. Riva. 2006. « Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. » Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands) 78 (1): 1-14. doi:10.1016/j.aquatox.2006.01.013.
- Barata, C., I. Varo, J. C. Navarro, S. Arun, et C. Porte. 2005. « Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds ». Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 140 (2): 175-86. doi:10.1016/j.cca.2005.01.013.
- Barraclough, T. G., D. Fontaneto, C. Ricci, et E. A. Herniou. 2007. « Evidence for inefficient selection against deleterious mutations in cytochrome oxidase I of asexual bdelloid rotifers ». Molecular Biology and Evolution 24 (9): 1952-62. doi:10.1093/molbev/msm123.
- Bazin, E., Sylvain G., et N. Galtier. 2006. « Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals ». Science 312 (5773): 570-72.
- Berckmoes, V., J. Scheirs, K. Jordaens, R. Blust, T. Backeljau, et R. Verhagen. 2005. « Effect of Environmental Pollution on Microsatellite DNA Diversity in Wood Mouse (*Adopemus sylvaticus*) Populations ». Environmental Toxicology and Chemistry 24 (11): 2898-2907.
- Bess, A. S., T. L. Crocker, I. T. Ryde, et J. N. Meyer. 2012. « Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in *Caenorhabditis elegans*. » Nucleic acids research 40 (16): 7916-31. doi:10.1093/nar/gks532.

- Bickham, J. W., S. Sandhu, P. D. Hebert, L. Chikhi, et R. Athwal. 2000. « Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. » *Mutation research* 463 (1): 33-51.
- Bickham, J. W. 2011. « The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. » *Ecotoxicology (London, England)* 20 (3): 497-502. doi:10.1007/s10646-011-0636-y.
- Birky, C. W., C. Wolf, H. Maughan, L. Herbertson, et E. Henry. 2005. « Speciation and selection without Sex ». *Hydrobiologia* 546 (1): 29-45. doi:10.1007/s10750-005-4097-2.
- Blajszczak, C., et M. G. Bonini. 2017. « Mitochondria targeting by environmental stressors: Implications for redox cellular signaling ». *Toxicology* 391 (April). Elsevier: 84-89. doi:10.1016/j.tox.2017.07.013.
- Blier, P. U., H. Lemieux, et N. Pichaud. 2014. « Holding our breath in our modern world : will mitochondria keep the pace with climate changes ? » *Canadian Journal of Zoology* 92 (May 2013): 591-601. doi:10.1139/cjz-2013-0183.
- Bourret, V., P. Couture, P. G. C. Campbell, et L. Bernatchez. 2008. « Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. » *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 86 (1): 76-90. doi:10.1016/j.aquatox.2007.10.003.
- Brady, S. P., E. Monosson, C. W. Matson, et J. W. Bickham. 2017. « Evolutionary toxicology: Toward a unified understanding of life's response to toxic chemicals ». *Evolutionary Applications* 10 (8): 745-51. doi:10.1111/eva.12519.
- Brand, Martin D, Lee-feng Chien, Edward K Ainscow, David F S Rolfe, et Richard K Porter. 1994. « The causes and functions of mitochondrial proton leak ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1187: 132-39.
- Bratic, I., J. Hench, J. Henriksson, A. Antebi, T. R. Bürglin, et A. Trifunovic. 2009. « Mitochondrial DNA level, but not active replicase, is essential for *Caenorhabditis elegans* development. » *Nucleic acids research* 37 (6): 1817-28. doi:10.1093/nar/gkp018.
- Brown, T. A., C. Cecconi, A. N. Tkachuk, C. Bustamante, et D. A. Clayton. 2005. « Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. » *Genes & development* 19 (20): 2466-76. doi:10.1101/gad.1352105.
- Burger, R., et M. Lynch. 1997. « Adaptation and extinction in changing environments ». Dans *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*, édité par R Biljsma et V Loeschcke, *Experienti*, 209-39. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8882-0_12.

- Burton, R. S., C. K. Ellison, et J. S. Harrison. 2006. « The Sorry State of F₂ Hybrids: Consequences of Rapid Mitochondrial DNA Evolution in Allopatric Populations ». *The American Naturalist* 168 (S6): S14-24. doi:10.1086/509046.
- Castellana, S., S. Vicario, et C. Saccone. 2011. « Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein coding genes. » *Genome biology and evolution* 3 (October 2010): 1067-79. doi:10.1093/gbe/evr040.
- Celis-Salgado, M. P., A. Cairns, N. Kim, et N. D. Yan. 2008. « The FLAMES medium: a new, soft-water culture and bioassay medium for Cladocera ». *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen* 30 (April): 265-71. doi:10.1080/03680770.2008.11902123.
- Chain, F. J.J., J. M. Flynn, J. Bull, et M. E. Cristescu. 2018. « Highly accelerated rates of heritable large-scale mutations under prolonged exposure to a mixture of copper and nickel stress ». (in preparation for submission to *Nature Communications* in December 2017) 3 (978). doi:https://doi.org/10.1101/349563.
- Chance, B., et G. R. Williams. 1955. « Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation ». *J Biol Chem* 217: 409-28.
- Charlesworth, B., et D. Charlesworth. 2017. « Population genetics from 1966 to 2016 ». *Heredity* 118 (1). 2-9. doi:10.1038/hdy.2016.55.
- Charlesworth, B., et D. Charlesworth. 1999. « The genetic basis of inbreeding depression ». *Genet Res* 74 (3). 329-40. doi:10.1017/S0016672399004152.
- Charlesworth, B. 2012. « The effects of deleterious mutations on evolution at linked sites ». *Genetics* 190 (1): 5-22. doi:10.1534/genetics.111.134288.
- Chen, Xin Jie, Xiaowen Wang, et Ronald A Butow. 2007. « Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA ». *PNAS* 104 (34): 13738-43.
- Christie, J. R., et M. Beekman. 2016. « Uniparental Inheritance Promotes Adaptive Evolution in Cytoplasmic Genomes » 34 (3): 677-91. doi:10.1093/molbev/msw266.
- Clancy, D. J. 2008. « Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background ». *Aging Cell* 7 (6): 795-804. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00428.x.
- Coors, A., J. Vanoverbeke, T. De Bie, et L. De Meester. 2009. « Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of *Daphnia magna*. » *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 95 (1): 71-79. doi:10.1016/j.aquatox.2009.08.004.
- Correa, C. C., W. C. Aw, R. G. Melvin, N. Pichaud, et J. W. O. Ballard. 2012. «

Mitochondrial DNA variants influence mitochondrial bioenergetics in *Drosophila melanogaster* ». *Mitochondrion* 12 (4): 459-64. doi:10.1016/j.mito.2012.06.005.

Cortopassi, G. A. 2002. « A Neutral Theory Predicts Multigenic Aging and Increased Concentrations of Deleterious Mutations on the Mitochondrial and Y Chromosomes ». *Free Radical Biology and Medicine* 33 (5): 605-10.

Crane, J. D., A. Abadi, B. P. Hettinga, D. I. Ogborn, L. G. Macneil, R. Gregory, et M. A. Tarnopolsky. 2013. « Elevated Mitochondrial Oxidative Stress Impairs Metabolic Adaptations to Exercise in Skeletal Muscle » 8 (12): 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0081879.

Crease, T. J. 1999. « The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea) ». *Gene* 233 (1-2): 89-99. doi:10.1016/S0378-1119(99)00151-1.

De Block, M., et R. Stoks. 2008. « Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275 (1636): 781-85. doi:10.1098/rspb.2007.1515.

Denver, D. R., P. C. Dolan, L. J. Wilhelm, W. Sung, J. I. Lucas-Lledo, D. K. Howe, S. C. Lewis, et al. 2009. « A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (38): 16310-14. doi:10.1073/pnas.0904895106.

Denver, D. R., K Morris, M. Lynch, L. L. Vassilieva, et W. K. Thomas. 2000. « High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans*. » *Science* (New York, N.Y.) 289 (5488): 2342-44.

Denver, D. R., K. Morris, M. Lynch, et W. K. Thomas. 2004. « High Mutation Rate and Predominance of Insertions in the *Caenorhabditis elegans* nuclear genome ». *Nature* 430 (August): 679-82. doi:10.1038/nature02721.1.

Denver, D. R., L. J. Wilhelm, D. K. Howe, K. Gafner, P. C. Dolan, et C. F. Baer. 2012. « Variation in base-substitution mutation in experimental and natural lineages of *Caenorhabditis nematodes*. » *Genome biology and evolution* 4 (4): 513-22. doi:10.1093/gbe/evs028.

Depledge, M. H. 1998. « The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. » *Mutation research* 399 (1): 109-22.

Dingley, S., E. Polyak, R. Lightfoot, J. Ostrovsky, M. Rao, T. Greco, H. Ischiropoulos, et M. J. Falk. 2010. « Mitochondrial respiratory chain dysfunction variably increases oxidant stress in *Caenorhabditis elegans*. » *Mitochondrion* 10 (2). *Mitochondria Research Society*: 125-36. doi:10.1016/j.mito.2009.11.003.

- Doğanlar, Z. B., O. Doğanlar, et K. Tabakçioğlu. 2014. « Genotoxic Effects of Heavy Metal Mixture in *Drosophila melanogaster*: Expressions of Heat Shock Proteins, RAPD Profiles and Mitochondrial DNA Sequence ». *Water, Air, & Soil Pollution* 225 (9): 2104. doi:10.1007/s11270-014-2104-9.
- Dowling, D. K. 2014. « Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype. » *Biochimica et biophysica acta* 1840 (4). Elsevier B.V.: 1393-1403. doi:10.1016/j.bbagen.2013.11.013.
- Dowling, D. K., U. Friberg, et J. Lindell. 2008. « Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. » *Trends in ecology & evolution* 23 (10): 546-54. doi:10.1016/j.tree.2008.05.011.
- Doyle, J. J., et J. L. Doyle. 1987. « A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. » *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Edgar, D., I. Shabalina, Y. Camara, A. Wredenberg, M. A. Calvaruso, L. Nijtmans, J. Nedergaard, B. Cannon, N. G. Larsson, et A. Trifunovic. 2009. « Random Point Mutations with Major Effects on Protein-Coding Genes Are the Driving Force behind Premature Aging in mtDNA Mutator Mice ». *Cell Metabolism* 10 (2): 131-38. doi:10.1016/j.cmet.2009.06.010.
- Eichhorn, G. L., et Y. A. Shin. 1968. « Interaction of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. XII. Relative Effect of Various Metal Ions on DNA Helicity ». *J. Am. Chem. Soc.* 90 (26): 7323-28. doi:10.1021/ja01028a024.
- Elena, S. F., et J. A. G. M. De Visser. 2003. « Environmental stress and the effects of mutation ». *Journal of Biology* 2 (12): 12.
- Ellison, C. K., et R. S. Burton. 2006. « Disruption of Mitochondrial Function in Interpopulation Hybrids of *Tigriopus Californicus* ». *Evolution* 60 (7): 1382-91.
- Ercal, N., H. Gurer-Orhan, et N.t Aykin-Burns. 2001. « Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage ». *Current topics in ...*, no 1: 529-39.
- Estes, S., A. L. Coleman-Hulbert, K. A. Hicks, G. de Haan, S. R. Martha, J. B. Knapp, S. W. Smith, K. C. Stein, et D. R. Denver. 2011. « Natural variation in life history and aging phenotypes is associated with mitochondrial DNA deletion frequency in *Caenorhabditis briggsae*. » *BMC evolutionary biology* 11 (1). BioMed Central Ltd: 11. doi:10.1186/1471-2148-11-11.
- Eyre-Walker, A., et P. D. Keightley. 2007. « The distribution of fitness effects of new mutations ». *Nature Reviews Genetics* 8 (8): 610-18. doi:10.1038/nrg2146.
- Fan, W., K. G. Waymire, N. Narula, P. Li, C. Rocher, P. E. Coskun, M. A. Vannan, J.

- Narula, G. R. Macgregor, et D. C. Wallace. 2008. « NIH Public Access » 319 (5865): 958-62. doi:10.1126/science.1147786.A.
- Fasching, M., et E. Gnaiger. 2016. O2k Quality Control 2: Instrumental oxygen background correction and accuracy of oxygen flux. Mitochondrial Physiology Network, issued 2016.
- Felsenstein, J. 1974. « The Evolutionary advantage of recombination ». *Genetics* 78: 737-56.
- Fetterman, J. L., M. J. Sammy, et S. W. Ballinger. 2017. « Mitochondrial toxicity of tobacco smoke and air pollution ». *Toxicology* 391 (August). Elsevier: 18-33. doi:10.1016/j.tox.2017.08.002.
- Flynn, J. M., F. J. J. Chain, D. J. Schoen, et M. E. Cristescu. 2017. « Spontaneous mutation accumulation in daphnia pulex in selection-free vs. competitive environments ». *Molecular Biology and Evolution* 34 (1): 160-73. doi:10.1093/molbev/msw234.
- Fry, J. D., et S. L. Heinsohn. 2002. « Environmental dependence of mutation parameters for viability in *Drosophila*. » *Genetics* 161 (July): 1155-67.
- Fry, J. D., P. D. Keightley, S. L. Heinsohn, et S. V. Nuzhdin. 1999. « New estimates of the rates and effects of mildly deleterious mutation in *Drosophila melanogaster*. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (2): 574-79. doi:10.1073/pnas.96.2.574.
- Furda, A. M., A. M. Marrangoni, A. Lokshin, et B. Van Houten. 2012. « Oxidants and not alkylating agents induce rapid mtDNA loss and mitochondrial dysfunction. » *DNA repair* 11 (8). Elsevier B.V.: 684-92. doi:10.1016/j.dnarep.2012.06.002.
- Gabriel, W., M. Lynch, et R. Burger. 1993. « Muller's Ratchet and Mutational Meltdowns ». *Evolution* 47 (6): 1744-57.
- Gaetke, L. M., et C. K. Chow. 2003. « Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients ». *Toxicology* 189 (1-2): 147-63. doi:10.1016/S0300-483X(03)00159-8.
- Garceau, N., N. Pichaud, et P. Couture. 2010. « Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. » *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 98 (2): 107-12. doi:10.1016/j.aquatox.2010.01.020.
- García-Dorado, A., J. L. Monedero, et C. López-Fanjul. 1998. « The mutation rate and the distribution of mutational effects of viability and fitness in *Drosophila melanogaster*. » *Genetica* 102-103 (1-6): 255-65. doi:10.1023/A:1017086909282.
- Garcia-Dorado, A. 1997. « The Rate and Effects Distribution of Viability Mutation in *Drosophila*: Minimum Distance Estimation ». *Evolution* 51 (4): 1130. doi:10.2307/2411042.

- Gillespie, J. H. 2000. « Genetic drift in an infinite population: the pseudohitchhiking model ». *Genetics* 155: 909-19. doi:10.1038/356519a0.
- Giska, I., W. Babik, C. A.M. van Gestel, N. M. van Straalen, et R. Laskowski. 2015. « Genome-wide genetic diversity of rove beetle populations along a metal pollution gradient ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: 98-105. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.048.
- Glazier, D. S. 1992. « Effects of Food, Genotype, and Maternal Size and Age on Offspring Investment in *Daphnia Magna* ». *Ecology* 73 (3): 910-26.
- Gnaiger, E., A. V. Kuznetsov, S. Schneeberger, R. Seiler, G. Brandacher, W. Steurer, et R. Margreiter. 2000. « Mitochondria in the Cold », 431-38.
- Gnaiger, E. 2009. « Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle New perspectives of mitochondrial physiology ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 1837-45. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.013.
- Gnaiger, E. 2014. « Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, An Introduction to OXPHOS Analysis ». 4th ed. Innsbruck: Mitochondrial Physiol. Network 19.12. OROBOROS MipNet Publications.
- Gnaiger, E., B. Lassnig, A. Kuznetsov, G. Rieger, et R. Margreiter. 1998. « Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase ». *The Journal of experimental biology* 201: 1129-39.
- Gnaiger, E., R. Steinlechner-Maran, G. Méndez, T. Eberl, et R. Margreiter. 1995. « Control of Mitochondrial and Cellular Respiration by Oxygen ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27 (6): 583-96.
- Goho, S., et G. Bell. 2000. « Mild environmental stress elicits mutations affecting fitness in *Chlamydomonas* », no August 1999: 123-29.
- Greaves, L. C., A. K. Reeve, R. W. Taylor, et D. M. Turnbull. 2012. « Mitochondrial DNA and disease. ». *The Journal of pathology* 226 (2): 274-86. doi:10.1002/path.3028.
- Haag-Liautard, C., N. Coffey, D. Houle, M. Lynch, B. Charlesworth, et P. D. Keightley. 2008. « Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster* ». *PLoS Biology* 6 (8): 1706-14. doi:10.1371/journal.pbio.0060204.
- Haag-Liautard, C., M. Dorris, X. Maside, S. Macaskill, D. L. Halligan, B. Charlesworth, et P. D. Keightley. 2007. « Direct estimation of per nucleotide and genomic deleterious mutation rates in *Drosophila* ». *Nature* 445 (7123): 82-85. doi:10.1038/nature05388.
- Halligan, D. L., et P. D. Keightley. 2009a. « Spontaneous Mutation Accumulation Studies in Evolutionary Genetics ». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*

40 (1): 151-72. doi:10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173437.

- Henry, L., T. Schwander, et B. J. Crespi. 2012. « Deleterious Mutation Accumulation in Asexual *Timema* Stick Insects Research article » 29 (1): 401-8. doi:10.1093/molbev/msr237.
- Hicks, K. A., D. K. Howe, A. Leung, D. R. Denver, et S. Estes. 2012. « In vivo quantification reveals extensive natural variation in mitochondrial form and function in *Caenorhabditis briggsae*. » PloS one 7 (8): e43837. doi:10.1371/journal.pone.0043837.
- Hill, J. H., Z. Chen, et H. Xu. 2014. « Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant ». Nature Genetics 46 (4). Nature Publishing Group: 389-92. doi:10.1038/ng.2920.
- Hoffmann, A. A., et P. A. Ross. 2018. « Rates and Patterns of Laboratory Adaptation in (Mostly) Insects ». Journal of Economic Entomology 111 (2): 501-9. doi:10.1093/jee/toy024.
- Hollister, J. D., S. Greiner, W. Wang, J. Wang, Y. Zhang, G. Ka-shu Wong, S. I. Wright, et M. T. J. Johnson. 2014. « Recurrent Loss of Sex Is Associated with Accumulation of Deleterious Mutations in *Oenothera* » 32 (4): 896-905. doi:10.1093/molbev/msu345.
- Hood, D. A., I. Irrcher, V. Ljubicic, et A.-M. Joseph. 2006. « Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle ». Journal of Experimental Biology 209 (12): 2265-75. doi:10.1242/jeb.02182.
- Hosseini, M.-J., F. Shaki, M. Ghazi-Khansari, et J. Pourahmad. 2014. « Toxicity of Copper on Isolated Liver Mitochondria: Impairment at Complexes I, II, and IV Leads to Increased ROS Production. » Cell biochemistry and biophysics, avril. doi:10.1007/s12013-014-9922-7.
- Houle, D., D. K. Hoffmaster, S. Assimacopoulos, et B. Charlesworth. 1992. « The Genomic Mutation Rate for Fitness in *Drosophila* ». Nature 359: 58-60. doi:10.1038/355242a0.
- Houle, D. 1998. « How should we explain variation in genetic variation of traits? » Genetica 102/103 (1-6): 241-53. doi:10.1023/a:1017034925212.
- Houle, D. 1992. « Comparing evolvability and variability of quantitative traits ». Genetics 130: 195-204. doi:citeulike-article-id:10041224.
- Howe, D. K., et D. R. Denver. 2008. « Muller's Ratchet and compensatory mutation in *Caenorhabditis briggsae* mitochondrial genome evolution. » BMC evolutionary biology 8 (janvier): 62. doi:10.1186/1471-2148-8-62.
- Howe, P. D., G. C. Becking, P. Callan, C. Dameron, et L. Tomaska. 1998. « Environmental

Health Criteria 200: Copper ». Geneva.

- Huey, R. B., G. W. Gilchrist, K. Ward, L. Maves, D. Pepin, et D. Houle. 2003. « Mutation Accumulation, Performance, Fitness ». *Integrative and comparative biology* 395: 387-95.
- James, J. E., G. Piganeau, et A. Eyre-Walker. 2016. « The rate of adaptive evolution in animal mitochondria ». *Molecular Ecology* 25 (1): 67-78. doi:10.1111/mec.13475.
- Jenuth, J. P., A. C. Peterson, K. Fu, et E. A. Shoubridge. 1996. « Random Genetic Drift in the Female Germline Explains the Rapid Segregation of Mammalian Mitochondrial DNA ». *Nature Genetics* 14: 146-51. doi:10.1038/ng0496-417.
- Jiang, C., A. Mithani, E. J. Belfield, R. Mott, L. D. Hurst, et N. P. Harberd. 2014. « Environmentally responsive genome-wide accumulation of de novo *Arabidopsis thaliana* mutations and epimutations ». *Genome Research* 24 (11): 1821-29. doi:10.1101/gr.177659.114.
- Joyner-Matos, J., K. A. Hicks, D. Cousins, M. Keller, D. R. Denver, C. F. Baer, et S. Estes. 2013. « Evolution of a higher intracellular oxidizing environment in *Caenorhabditis elegans* under relaxed selection. » *PloS one* 8 (6): e65604. doi:10.1371/journal.pone.0065604.
- Kake-Guena, S. A., K. Touisse, R. Vergilino, F. Dufresne, P. U. Blier, et H. Lemieux. 2015. « Assessment of mitochondrial functions in *Daphnia pulex* clones using high-resolution respirometry ». *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, no August 2014: n/a-n/a. doi:10.1002/jez.1913.
- Kake-Guena, S. A., K. Touisse, B. E. Warren, K. Y. Scott, F. Dufresne, P. U. Blier, et H. Lemieux. 2017. « Temperature-related differences in mitochondrial function among clones of the cladoceran *Daphnia pulex* ». *Journal of Thermal Biology*.
- Keightley, P. D., et Æ D. L. Halligan. 2009. « Analysis and implications of mutational variation », no July 2008: 359-69. doi:10.1007/s10709-008-9304-4.
- Keightley, P. D., U. Trivedi, M. Thomson, F. Oliver, S. Kumar, et M. L. Blaxter. 2009. « Analysis of the genome sequences of three *Drosophila melanogaster* spontaneous mutation accumulation lines », 1195-1201. doi:10.1101/gr.091231.109.more.
- Kim, Seok-Jo, Paul Cheresch, David Williams, Yuan Cheng, Karen Ridge, Paul T. Schumacker, Sigmund Weitzman, Vilhelm A. Bohr, et David W. Kamp. 2014. « Mitochondria-targeted Ogg1 and Aconitase-2 Prevent oxidant-induced mitochondrial DNA damage in alveolar epithelial cells ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (9): 6165-76. doi:10.1074/jbc.M113.515130.
- Kimura, M. 1968. « Evolutionary Rate at the Molecular Level ». *Nature* 217: 624-26.

doi:10.1006/rwgn.2001.0432.

- King, J. L., et T. H. Jukes. 1969. « Non-Darwinian Evolution ». *Science* 164: 788-97.
- King, L. E., S. R. De Solla, J. M. Small, E. Sverko, et J. S. Quinn. 2014. « Microsatellite DNA Mutations in Double-Crested Cormorants (*Phalacrocorax auritus*) Associated with Exposure to PAH-Containing Industrial Air Pollution ». *Environmental science & technology* 48: 11637-45.
- Kondrashov, A. S., et D. Houle. 1994. « Genotype-environment interactions and the estimation of the genomic mutation rate in *Drosophila melanogaster*. » *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 258 (1353): 221-27. doi:10.1098/rspb.1994.0166.
- Kraemer, S. A., K. B. Böndel, R. W. Ness, P. D. Keightley, et N. Colegrave. 2017. « Fitness change in relation to mutation number in spontaneous mutation accumulation lines of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Evolution* 71 (12): 2918-29. doi:10.1111/evo.13360.
- Krakauer, D. C., et A. Mira. 1999. « Mitochondria and germ-cell death ». *Nature* 400: 125-26.
- Krasovec, M., A. Eyre-Walker, N. Grimsley, C. Salmeron, D. Pecqueur, G. Piganeau, et S. Sanchez-Ferandin. 2016. « Fitness Effects of Spontaneous Mutations in Picoeukaryotic Marine Green Algae ». *G3 & Genes|Genomes|Genetics* 6 (7): 2063-71. doi:10.1534/g3.116.029769.
- Krumschnabel, G., C. Manzl, C. Berger, et B. Hofer. 2005. « Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. » *Toxicology and applied pharmacology* 209 (1): 62-73. doi:10.1016/j.taap.2005.03.016.
- Kujoth, G. C., A. Hiona, T. D. Pugh, et S. Someya. 2005. « Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging ». *Science* 309 (5733): 481-84.
- Kuznetsov, A. V., S. Schneeberger, G. Brandacher, W. Mark, W. Steurer, V. Saks, Y. Usson, *et al.* 2004. « Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion », 1633-41.
- Ladoukakis, E. D., et E. Zouros. 2017. « Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA : rules and exceptions ». *Journal of Biological Research-Thessaloniki. BioMed Central*, 1-7. doi:10.1186/s40709-017-0060-4.
- Larsen, N. B., M. Rasmussen, et L. J. Rasmussen. 2005. « Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? » *Mitochondrion* 5 (2): 89-108. doi:10.1016/j.mito.2005.02.002.

- Larsen, S., J. Nielsen, C. Neigaard Hansen, L. B. Nielsen, F. Wibrand, H. Daa Schroder, R. Boushel, J. W. Helge, et F. Dela. 2012. « Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects » 14: 3349-60. doi:10.1113/jphysiol.2012.230185.
- Latta, L. C., K. K. Morgan, C. S. Weaver, D. Allen, S. Schaack, et Michael Lynch. 2013. « Genomic background and generation time influence deleterious mutation rates in *Daphnia*. » *Genetics* 193 (2): 539-44. doi:10.1534/genetics.112.146571.
- Latta, L. C., M. Peacock, D. J. Civitello, J. L. Dudycha, J. M. Meik, et S. Schaack. 2015. « The Phenotypic Effects of Spontaneous Mutations in Different Environments ». *The American naturalist* 185 (2). doi:10.1086/679501.
- Ledoux, S. P., G. P. Wilson, et E. J. Beecham. 1992. « Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells » 13 (11): 1967-73.
- Lee, H.-C., C.-Y. Lu, H.-J. Fahn, et Y.-H. Wei. 1998. « Aging- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung » 441: 292-96.
- Lee, H.-C., et Y.-H. Wei. 2005. « Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. » *The international journal of biochemistry & cell biology* 37 (4): 822-34. doi:10.1016/j.biocel.2004.09.010.
- Lee, H. C., S. H. Li, J. C. Lin, C. C. Wu, D. C. Yeh, et Y. H. Wei. 2004. « Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma ». *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 547 (1-2): 71-78. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.12.011.
- Lemieux, H., et B. E. Warren. 2012. « An animal model to study human muscular diseases involving mitochondrial oxidative phosphorylation », 503-12. doi:10.1007/s10863-012-9451-2.
- Lenaz, G. 2012. *Advances in Mitochondrial Medicine*. Vol. 942. doi:10.1007/978-94-007-2869-1.
- Lenaz, Giorgio, et Maria Luisa Genova. 2010. « Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject ». *Antioxidant & redox signalling* 12 (8): 961-1008.
- Leung, M. C. K., J. P. Rooney, I. T. Ryde, A. J. Bernal, A. S. Bess, T. L. Crocker, A. Q. Ji, et J. N. Meyer. 2013. « Effects of early life exposure to ultraviolet C radiation on mitochondrial DNA content, transcription, ATP production, and oxygen consumption in developing *Caenorhabditis elegans*. » *BMC pharmacology & toxicology* 14 (1): 9. doi:10.1186/2050-6511-14-9.
- Levin, L., A. Blumberg, G. Barshad, et D. Mishmar. 2014. « Mito-nuclear co-evolution :

the positive and negative sides of functional ancient mutations » 5 (December): 1-11.
doi:10.3389/fgene.2014.00448.

Li, W.-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer As. Sunderland.

Linder, M. C., et M. Hazegh-Azam. 1996. « Copper biochemistry and molecular biology ». *American Journal for Clinical Nutrition* 63 (June): 797S-811S.

Linnane, A. W., S. Marzuki, T. Ozawa, et M. Tanaka. 1998. « Degenerative diseases. » *The Lancet* march 25: 642-45.

Liu, B., et L. Chen. 2003. « The Effects of Impulsive Toxicant Input on a Population in a Polluted Environment ». *Journal of Biological Systems* 11 (3): 265-74.

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 (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Lloyd, D. R., et D. H. Phillips. 1999. « Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: Evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links ». *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424 (1-2): 23-36. doi:10.1016/S0027-5107(99)00005-6.

Loewe, L. 2006. « Quantifying the genomic decay paradox due to Muller's ratchet in human mitochondrial DNA ». *Genetical research* 87: 133-59. doi:10.1017/S0016672306008123.

Loewe, L., et W. G. Hill. 2010. « The population genetics of mutations : good, bad and indifferent », 1153-67. doi:10.1098/rstb.2009.0317.

Lopes, I., D. J. Baird, et R. Ribeiro. 2004. « Genetic Determination of Tolerance to Lethal and Sublethal Copper Concentrations in Field Populations of *Daphnia longispina* ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46 (1): 43-51. doi:10.1007/s00244-003-2143-5.

Lynch, M., et J. L. Blanchard. 1998. « Deleterious mutation accumulation in organelle genomes. » *Genetica* 102-103 (1-6): 29-39.

Lynch, M., R. Bürger, D. Butcher, et W. Gabriel. 1993. « The mutational meltdown in asexual populations. » *The Journal of heredity* 84 (5): 339-44.

Lynch, M., J. Conery, et R. Burger. 1995a. « Mutation accumulation and the extinction of small populations ». *American Naturalist* 146 (4): 489-518.

Lynch, M., J. Conery, et R. Burger. 1995b. « Mutational meltdowns in sexual populations ». *Evolution* 49 (6): 1067-80.

- Lynch, M. 1985. « Spontaneous Mutations for Life-History Characters in an Obligate Parthenogen ». *Evolution* 39 (4): 804-18.
- Lynch, M. 1996. « Mutation Accumulation in Transfer RNAs: Molecular Evidence for Muller's Ratchet in Mitochondrial Genomes ». *Molecular biology and evolution* 13: 209-20.
- Lynch, M. 2007. *The Origins of Genome Architecture*. Sinauer As.
- Lynch, Michael, Jeff Blanchard, David Houle, Travis Kibota, Stewart Schultz, et John Willis. 1999. « Spontaneous Deleterious Mutation ». *Evolution* 53 (3): 645-63.
- Lynch, M., B. Koskella, et S. Schaack. 2006. « Mutation Pressure and the Evolution of Organelle Architecture » 311 (5768): 1727-30.
- Lynch, M., L. Latta, J. Hicks, et M. Giorgianni. 1998. « Mutation, Selection, and the Maintenance of Life-History Variation in a Natural Population ». *Evolution* 52 (3): 727-33.
- Matson, C. W., M. M. Lambert, T. J. McDonald, R. L. Autenrieth, K. C. Donnelly, A. Islamzadeh, D. I. Politov, et J. W. Bickham. 2006. « Evolutionary Toxicology: Population-Level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan ». *Environmental Health Perspectives* 114 (4): 547-52. doi:10.1289/ehp.8404.
- Matsuba, C., D. G. Ostrow, M. P. Salomon, A. Tolani, et C. F. Baer. 2012. « Temperature, stress and spontaneous mutation in *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans* ». *Biology Letters* 9 (1): 20120334-20120334. doi:10.1098/rsbl.2012.0334.
- Mehta, R., D. M. Templeton, et P. J. O. Brien. 2006. « Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity II. Copper toxicity ». *Chemico-biological interactions* 163: 77-85. doi:10.1016/j.cbi.2006.05.011.
- Melvin, R. G., et J. W. O. Ballard. 2017. « Cellular and population level processes influence the rate , accumulation and observed frequency of inherited and somatic mtDNA mutations », no March 2017: 323-34. doi:10.1093/mutage/gex004.
- Meyer, J. N., M. C. K. Leung, J. P. Rooney, A. Sendoel, M. O. Hengartner, G. E. Kisby, et A. S. Bess. 2013. « Mitochondria as a target of environmental toxicants. » *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 134 (1): 1-17. doi:10.1093/toxsci/kft102.
- Mineau, P. 2005. « A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of "long term" pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife ». *Ecotoxicology* 14 (8): 775-99. doi:10.1007/s10646-005-0028-2.
- Moreno-Loshuertos, R., R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, N. Movilla, A. Perez-Martos,

- S. Rodriguez de Cordoba, M. E. Gallardo, et J. A. Enriquez. 2006. « Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants ». *Nature genetics* 38 (11): 1261-69. doi:10.1038/ng1897.
- Mukai, T.. 1964. « The Genetic Structure of Natural Populations of *Drosophila Melanogaster*. I. Spontaneous Mutation Rate of Polygenes Controlling Viability ». *Genetics* 50: 1-19.
- Mukai, T., S. I. Chigusa, L. E. Mettler, et J. F. Crow. 1972. « Mutation Rate and Dominance of Genes Affecting Viability in *Drosophila Melanogaster* ». *Genetics* 72: 335-55.
- Neiman, M., G. Hehman, J. T. Miller, J. M. Logsdon, et D. R. Taylor. 2010. « Accelerated mutation accumulation in asexual lineages of a freshwater snail ». *Molecular Biology and Evolution* 27 (4): 954-63. doi:10.1093/molbev/msp300.
- Neiman, M., et D. R. Taylor. 2009. « The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. » *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 276 (1660): 1201-9. doi:10.1098/rspb.2008.1758.
- Ngo, J. K., L. C. D. Pomatto, et K. J. A. Davies. 2013. « Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging. » *Redox biology* 1 (1). Elsevier: 258-64. doi:10.1016/j.redox.2013.01.015.
- Ohnishi, O. H. M. 1977. « Spontaneous and Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutations Controlling Viability in *Drosophila Melanogaster*. II. Homozygous Effect of Polygenic Mutations ». *Genetics* 87: 529-45.
- Ohta, Tomoko. 1992. « The Nearly Neutral Theory of Molecular Evolution ». *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 263-86.
- Olsen, A. K., Å. Andreassen, R. Singh, R. Wiger, N. Duale, P. B. Farmer, et G. Brunborg. 2010. « Environmental exposure of the mouse germ line: DNA adducts in spermatozoa and formation of De Novo mutations during spermatogenesis ». *PLoS ONE* 5 (6). doi:10.1371/journal.pone.0011349.
- Orsini, L., E. Decaestecker, L. De Meester, M. E. Pfrender, et J. K. Colbourne. 2011. « Genomics in the ecological arena. » *Biology letters* 7 (1): 2-3. doi:10.1098/rsbl.2010.0629.
- Paland, S., et M. Lynch. 2006. « Transitions to asexuality result in excess amino acid substitutions ». *Science* 311 (5763): 990-92.
- Papadopoulos, V., et W. L. Miller. 2012. « Role of mitochondria in steroidogenesis ». *Best*

- Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 26 : 771-90. doi:10.1159/000321204.
- Passos, J. F., G. Saretzki, S. Ahmed, G. Nelson, T. Richter, H. Peters, I. Wappler, *et al.* 2007. « Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence ». *PLoS Biology* 5 (5): 1138-51. doi:10.1371/journal.pbio.0050110.
- Pearson, D. A. B., J. M. Gunn, et W. Keller. 2002. « The Past, Present and Future of Sudbury's Lakes ». Dans *Physical Environment-Sudbury*; Ontario Geolocial Survey Special Volume, édité par D. H. Rousselle et K. J. Jansons, 6:194-215.
- Pichaud, N., J. W. O. Ballard, R. M. Tanguay, et P. U. Blier. 2011. « Thermal sensitivity of mitochondrial functions in permeabilized muscle fibers from two populations of *Drosophila simulans* with divergent mitotypes ». *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301 (1): R48-59. doi:10.1152/ajpregu.00542.2010.
- Pichaud, N., J. W. O. Ballard, R. M. Tanguay, et P. U. Blier. 2012. « Naturally occurring mitochondrial DNA haplotypes exhibit metabolic differences: insight into functional properties of mitochondria. » *Evolution* 66 (10): 3189-97. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01683.x.
- Piganeau, G., M. Gardner, et A. Eyre-Walker. 2004. « A broad survey of recombination in animal mitochondria ». *Molecular Biology and Evolution* 21 (12): 2319-25. doi:10.1093/molbev/msh244.
- Pinheiro, J., D. Bate, S. DebRoy, D. Sarkar Sarkar, et R Core Team. 2014. « {nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models ».
- Popadin, K., L. V. Polishchuk, L. Mamirova, D. Knorre, et K. Gunbin. 2007. « Accumulation of slightly deleterious mutations in mitochondrial protein-coding genes of large versus small mammals. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (33): 13390-95. doi:10.1073/pnas.0701256104.
- Pourahmad, J., et P. J. O'Brien. 2000. « A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺ ». *Toxicology* 143 (3): 263-73. doi:10.1016/S0300-483X(99)00178-X.
- Qiu, C., K. Hevner, D. Abetew, M. Sedensky, P. Morgan, D. A. Enquobahrie, et M. A. Williams. 2014. « Mitochondrial DNA Copy Number and Oxidative DNA Damage in Placental Tissues from Gestational Diabetes and Control Pregnancies : A Pilot Study ». *Clin Lab*. 59 (0): 655-660.
- Rajotte, J. W., et P. Couture. 2002. « Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*) ». *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59 : 1296-1304 (Adams 1990):

1296-1304. doi:10.1139/F02-095.

Rand, D. M. 2001. « The Units of Selection on Mitochondrial DNA ». *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 415-48.

Rand, D. M. 2011. « Population genetics of the cytoplasm and the units of selection on mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*. » *Genetica* 139 (5): 685-97. doi:10.1007/s10709-011-9576-y.

Remold, S. K., et R. E. Lenski. 2001. « Contribution of individual random mutations to genotype-by-environment interactions in *Escherichia coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (20): 11388-93. doi:10.1073/pnas.201140198.

Reyes, A., C. Gissi, G. Pesole, et C. Saccone. 1982. « Asymmetrical Directional Mutation Pressure in the Mitochondrial Genome of Mammals », no Clayton: 957-66.

Ribeiro, R., D. J. Baird, A. M. V. M. Soares, et I. Lopes. 2012. « Contaminant driven genetic erosion: a case study with *Daphnia longispina*. » *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 31 (5): 977-82. doi:10.1002/etc.1802.

Ribeiro, R., et I. Lopes. 2013. « Contaminant driven genetic erosion and associated hypotheses on alleles loss, reduced population growth rate and increased susceptibility to future stressors: an essay. » *Ecotoxicology (London, England)* 22 (5): 889-99. doi:10.1007/s10646-013-1070-0.

Richter, C. 1995. « Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. » *The international journal of biochemistry & cell biology* 27 (7): 647-53. doi:10.1016/1357-2725(95)00025-K.

Ridley, M. 2004. *Evolution*. 3rd éd. Malden: Blackwell Pub.

Rinner, B. P., C. W. Matson, A. Islamzadeh, T. J. McDonald, K. C. Donnelly, et J. W. Bickham. 2011. « Evolutionary toxicology: Contaminant-induced genetic mutations in mosquitofish from Sumgayit, Azerbaijan ». *Ecotoxicology* 20 (2): 365-76. doi:10.1007/s10646-010-0587-8.

Rogstad, S. H., B. Keane, et M. H. Collier. 2003. « Minisatellite DNA Mutation Rate in Dandelions Increases with Leaf-Tissue Concentrations of Cr, Fe, Mn AND Ni ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (9): 2093-99.

Roubicek, Deborah A, et Nadja C De Souza-pinto. 2017. « Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants ». *Toxicology* 391 (April). Elsevier: 100-108. doi:10.1016/j.tox.2017.06.012.

Ruiz-Pesini, E., D. Mishmar, M. Brandon, V. Procaccio, et D. C. Wallace. 2004. « Effects of Purifying and Adaptive Selection on Regional Variation in Human mtDNA ».

- Science 303 (5655): 223-26. doi:10.1126/science.1088434.
- Rumsey, W. L., B. Bolognese, A. B. Davis, P. L. Flamberg, S. R. Katchur, C. J. Kotzer, R. R. Osborn, et P. L. Podolin. 2018. « Effects of airborne toxicants on pulmonary function and mitochondrial DNA damage in rodent lungs », no December 2016: 343-53. doi:10.1093/mutage/gew063.
- Salazar, J. J., et B. Van Houten. 1997. « Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts ». Mutation Research/DNA Repair 385 (2): 139-49. doi:10.1016/S0921-8777(97)00047-5.
- Schaack, S., D. E. Allen, L. C. Latta, K. K. Morgan, et M. Lynch. 2013. « The effect of spontaneous mutations on competitive ability. » Journal of evolutionary biology 26 (2): 451-56. doi:10.1111/jeb.12058.
- Schoen, D. J., J. L. David, et T. M. Bataillon. 1998. « Deleterious mutation accumulation and the regeneration of genetic resources. » Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (1): 394-99. doi:10.1073/pnas.95.1.394.
- Schon, E. A., S. DiMauro, et M. Hirano. 2012. « Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. » Nature reviews. Genetics 13 (12): 878-90. doi:10.1038/nrg3275.
- Schrider, D. R., D. Houle, M. Lynch, et Matthew W. Hahn. 2013. « Rates and genomic consequences of spontaneous mutational events in *Drosophila melanogaster* ». Genetics 194 (4): 937-54. doi:10.1534/genetics.113.151670.
- Schultz, S. T., M. Lynch, et J. H. Willis. 1999. « Spontaneous deleterious mutation in *Arabidopsis thaliana* ». Proceedings of the National Academy of Sciences 96 (20): 11393-98. doi:10.1073/pnas.96.20.11393.
- Scott, G. R., et K. A. Sloman. 2004. « The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity ». Aquatic Toxicology 68 (4): 369-92. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.016.
- Sena, L. A., et N. S. Chandel. 2012. « Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species ». Molecular Cell 48 (2). Elsevier Inc.: 158-66. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025.
- Shabalina, S., L. Y. Yampolsky, et A. S. Kondrashov. 1997. « Rapid decline of fitness in panmictic populations of *Drosophila melanogaster* maintained under relaxed natural selection. » Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (24): 13034-39. doi:10.1073/pnas.94.24.13034.
- Shadel, G. S., et T. L. Horvath. 2015. « Mitochondrial ROS Signaling in Organismal

- Homeostasis ». *Cell* 163 (3). Elsevier Inc.: 560-69. doi:10.1016/j.cell.2015.10.001.
- Shaughnessy, D. T., K. Mcallister, L. Worth, A. C. Haugen, J. N. Meyer, F. E. Domann, B. Van Houten, *et al.* 2014. « Mitochondria, Energetics, Epigenetics, and Cellular Responses to Stress ». *Environmental Health Perspectives* 122 (12): 1271-78. doi:10.1289/ehp.1408418.
- Shaw, J. R., M. E. Pfrender, B. D. Eads, R. Klaper, A. Callaghan, I. Colson, D. Gilbert, et J. K. Colbourne. 2008. « *Daphnia* as an emerging model of toxicological genomics ». *Advances in experimental biology on toxicogenomics*, 165-219.
- Shaw, R. G., D. L. Byers, et E. Darmo. 2000. « Spontaneous Mutational Effects on Reproductive Traits of *Arabidopsis thaliana* ». *Genetics* 155: 369-78.
- Shoubridge, E. A., et T. Wai. 2007. « Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte ». *Current Topics in Developmental Biology* 77 (06): 87-111. doi:10.1016/S0070-2153(06)77004-1.
- Simmons, M. J., et J. F. Crow. 1977. « Mutations Affecting Fitness in *Drosophila* Populations ». *Annual review of genetic* 11: 49-78.
- Singer, T. M., et C. L. Yauk. 2010. « Germ Cell Mutagens : Risk Assessment Challenges in the 21st Century ». *Environmental and molecular mutagenesis* 51: 919-28. doi:10.1002/em.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, et D. C. Klenk. 1985. « Measurement of protein using bicinchoninic acid ». *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76-85. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Somers, C. M., C. L. Yauk, P. A. White, C. L. J. Parfett, et J. S. Quinn. 2002. « Air pollution induces heritable DNA mutations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (25): 15904-7. doi:10.1073/pnas.252499499.
- Somers, C. M., et D. N. Cooper. 2009. « Air pollution and mutations in the germline : are humans at risk ? » *Human Genetics* 125: 119-30. doi:10.1007/s00439-008-0613-6.
- Spanier, Katina I, Florian Leese, Christoph Mayer, John K Colbourne, Don Gilbert, Michael E Pfrender, et Ralph 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 (janvier): 50. doi:10.1186/1471-2199-11-50.
- St. John, J. C., J. Facucho-Oliveira, Y. Jiang, R. Kelly, et R. Salah. 2010. « Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: A journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells ». *Human Reproduction*

Update 16 (5): 488-509. doi:10.1093/humupd/dmq002.

- Štambuk, A., M. Šrut, Z. Šatović, M. Tkalec, et G. I. V. Klobučar. 2013. « Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic ». *Aquatic Toxicology* 136-137: 22-31. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.017.
- Stewart, J. B., C. Freyer, J. L. Elson, A. Wredenberg, Z. Cansu, A. Trifunovic, et N.-G. Larsson. 2008. « Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. » *PLoS biology* 6 (1): e10. doi:10.1371/journal.pbio.0060010.
- Szafraniec, K., R. H. Borts, et R. Korona. 2001. « Environmental stress and mutational load in diploid strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (3): 1107-12. doi:10.1073/pnas.98.3.1107.
- Taanman, J.-W.. 1999. « The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1410: 103-23.
- Tait, Stephen W. G., et Douglas R. Green. 2012. « Mitochondria and cell signalling ». *Journal of Cell Science* 125 (4): 807-15. doi:10.1242/jcs.099234.
- Taylor, R. W., et D. M. Turnbull. 2005. « Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease ». *Genetics* 6: 389-402. doi:10.1038/nrg1606.
- Teschner, M. 1995. « Effects of salinity on the life history and fitness of *Daphnia magna*: variability within and between populations ». Dans *Cladocera as Model Organisms in Biology. Proceedings of the Third International Symposium on Cladocera held in Bergen, 9-16 August 1993*, 33-41.
- Thibault, M., P. U. Blier, et H. Guderley. 1997. « Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout ». *Fish Physiology and Biochemistry* 16 (2): 139-55.
- Tkeshelashvilis, L. K., T. McBride, K. Spence, et L. A. Loebg. 1991. « Mutation Spectrum of Copper-induced DNA Damage » 266 (10): 6401-6.
- Turrens, J. F. 2003. « Mitochondrial formation of reactive oxygen species ». *Journal of Physiology* 552 (2): 335-44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Valente, W. J., N. G. Ericson, A. S. Long, P. A. White, F. Marchetti, et J. H. Bielas. 2016. « Mitochondrial DNA exhibits resistance to induced point and deletion mutations ». *Nucleic Acids Research* 44 (18): 8513-24. doi:10.1093/nar/gkw716.
- Van Bergen, Nicole J, Jonathan G Crowston, Lisa S Kearns, Sandra E Staffieri, Alex W Hewitt, Amy C Cohn, David A Mackey, et Ian A Trounce. 2011. « Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Compensation May Preserve Vision in Patients with OPA1-Linked Autosomal Dominant Optic Atrophy ». *PloS one* 6 (6): e21347. doi:10.1371/journal.pone.0021347.

- Van Houten, B., V. Woshner, et J. H. Santos. 2006. « Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress ». *DNA Repair* 5 (2): 145-52. doi:10.1016/j.dnarep.2005.03.002.
- Van Straalen, N. M., et M. J. T. N. Timmermans. 2002. « Genetic Variation in Toxicant-Stressed Populations : An Evaluation of the “ Genetic Erosion ” Hypothesis ». *Human and Ecological Risk Assessment*, no 8: 983-1002.
- Vassilieva, L. L., A. M. Hook, et M. Lynch. 2000. « The fitness effects of spontaneous mutations in *Caenorhabditis elegans* ». *Evolution* 54 (4): 1234-46.
- Verkaart, S., W. J. H. Koopman, S. E. van Emst-de Vries, L. G. J. Nijtmans, L. W. P. J. van den Heuvel, J. A. M. Smeitink, et P. H. G. M. Willems. 2007. « Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. » *Biochimica et biophysica acta* 1772 (3): 373-81. doi:10.1016/j.bbadis.2006.12.009.
- Vilariño-güell, C., A. G. Smith, et Y. E. Dubrova. 2003. « Germline mutation induction at mouse repeat DNA loci by chemical mutagens » *526*: 63-73. doi:10.1016/S0027-5107(03)00016-2.
- Wai, T., D. Teoli, et E. A. Shoubridge. 2008. « The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes ». *Nature Genetics* 40 (12): 1484-88. doi:10.1038/ng.258.
- Wallace, D. C. 2011. « Bioenergetic origins of complexity and disease ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 76: 1-16. doi:10.1101/sqb.2011.76.010462.
- Wallace, D. C. 1999. « Mitochondrial diseases in man and mouse ». *Science* 283 (March): 1482-88.
- Wei, Y.-H., C.-Y. Lu, H.-C. Lee, C.-Y. Pang, et Y.-S Ma. 1998. « Oxidative Damage and Mutation to Mitochondrial DNA and Age-dependent Decline of Mitochondrial Respiratory Function ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 854: 155-70.
- Wei, Y. H., et H. C. Lee. 2002. « Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging ». *Experimental biology and medicine* 227: 671-82.
- Windig, J. J., C. G. F. De Kovel, et G. De Jong. 2004. « Genetics and Mechanics of Plasticity ». Dans *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches*, édité par Thomas J. DeWitt et Samuel M. Scheiner, Oxford Uni, 31-49. New York.
- Winner, R. W., et M. P. Farrell. 1976. « Acute and Chronic Toxicity of Copper to Four Species of *Daphnia* ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33 (8): 1685-91. doi:10.1139/f76-215.

- Wolfe, M. A. F., S. T. Schwarzbach, et R. A. Sulaiman. 1998. « Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review » 17 (2): 146-60.
- Woolfit, M., et L. Bromham. 2005. « Population size and molecular evolution on islands ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272 (1578): 2277-82. doi:10.1098/rspb.2005.3217.
- Xu, Sen, Sarah Schaack, Amanda Seyfert, Eunjin Choi, Michael Lynch, et Melania E Cristescu. 2012a. « High mutation rates in the mitochondrial genomes of *Daphnia pulex*. » *Molecular biology and evolution* 29 (2): 763-69. doi:10.1093/molbev/msr243.
- Yakes, F. M., et B. Van Houten. 1997. « Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (2): 514-19. doi:10.1073/pnas.94.2.514.
- Yan, N. D., J. B., J. C. McGeer, M. M. Manca, W. B. Keller, M. P. Celis-Salgado, et J. M. Gunn. 2016. « Arrive, survive and thrive: Essential stages in the re-colonization and recovery of zooplankton in urban lakes in Sudbury, Canada ». *Journal of Limnology* 75 (2S): 4-14. doi:10.4081/jlimnol.2016.1226.
- Yauk, C. L., G. A. Fox, B. E. Mccarry, et J. S. Quinn. 2000. « Induced minisatellite germline mutations in herring gulls (*Larus argentatus*) living near steel mills ». *Mutation Research* 452: 211-18.
- Yauk, C., A. Polyzos, A. Rowan-carroll, C. M. Somers, R. W. Godschalk, F. J. Van Schooten, M. L. Berndt, *et al.* 2008. « hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban / industrial location » 105 (2): 605-10.
- Yuzefovych, L. V., S. I. Musiyenko, G. L. Wilson, et Lyudmila I. Rachek. 2013. « Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction, and Oxidative Stress Are Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Protein Degradation and Apoptosis in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice ». *PLoS ONE* 8 (1). doi:10.1371/journal.pone.0054059.