







Université du Québec  
à Rimouski

**CANICULE DANS L'ARCTIQUE : LE RÉCHAUFFEMENT  
CLIMATIQUE POURRAIT-IL PROTÉGER *CALANUS GLACIALIS*  
DE CES ÉVÉNEMENTS EXTRÊMES?**

Une étude de l'effet de la température sur le métabolisme énergétique  
d'une espèce-clé de l'Arctique

Mémoire de recherche

Gestion de la faune et de ses habitats

*maîtres ès sciences*

© Marie-Hélène Carignan

Octobre 2020

## **COMPOSITION DU JURY**

Christian Nozais, PhD, président du jury, Université du Québec à Rimouski (UQAR)

Piero Calosi, PhD, directeur de recherche, UQAR

Peter Thor, PhD, codirecteur de recherche, Swedish Institute of Meteorology and Hydrology

Gesche Winkler, PhD, examinatrice externe, UQAR – Institut des sciences de la mer

Pierre Blier, PhD, examinateur externe, UQAR

Dépôt initial Juin 2019

Dépôt final Octobre 2020

# 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.

Pour Lucie, pour sa curiosité et sa vivacité d'esprit, pour sa profonde conviction de la place des femmes aux études supérieures. Tu n'en croirais pas tes yeux si tu savais sur quoi je travaille aujourd'hui.

Pour la diversité en sciences, autant dans les sujets explorés que dans les explorateurs.trices qui ont le courage de se confronter chaque jour à l'inconnu, à l'inconcevable.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à cet ouvrage, merci à Fanny V., Ella G., Fanny N., Catherine M. et Aude B.R., pour ne nommer que quelques personnes. Merci à mes codirecteurs, Piero et Peter, pour leur soutien, leur confiance et leurs conseils. Merci tout spécialement à Marc-André, qui a su me ramener les pieds sur terre lorsque j'avais la tête dans les nuages.

Je tiens également à remercier les organismes subventionnaires qui ont rendu mon projet possible et qui m'ont permis de manger à ma faim pendant ma maîtrise – merci au Conseil de recherche en science naturelle et génie du Canada, aux Fonds de recherche du Québec – nature et technologies, au *Svalbard Science Forum* du gouvernement norvégien, au Programme de formation scientifique dans le Nord, au Centre de la science de la biodiversité du Québec (CSBQ) et à la Fondation UQAR. Finalement, merci à Québec Océan, ArcticNet, *Gordon Conferences* et le CSBQ pour les opportunités de discuter mes résultats dans les cadres de conférences qui m'ont permis de pousser toujours un peu plus loin mes réflexions et mon développement comme chercheure en début de carrière.

## AVANT-PROPOS

Ceux qui me connaissent ne seront pas surpris que je me permette d'écrire ces quelques lignes pour mettre en contexte le résultat de ces dernières années de dur labeur.

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai bien sûr appris beaucoup sur mon sujet et la recherche comme discipline (parmi tant d'autres en biologie), mais mes plus grands apprentissages sont sans conteste sur les plans humain et personnel. J'ai commencé cette maîtrise avec la ferme intention de présenter deux objectifs dans ce mémoire, mais un concours de circonstances autant humaines que scientifiques m'ont menées à la décision de n'en présenter qu'un – mais tout un! En me confrontant à la complexité notoire de la biologie, j'ai dû apprendre à faire des choix et accepter les failles inévitables dans chaque expérience ou entreprise en science environnementale. J'ai ainsi pu apprivoiser un peu plus l'incertitude, l'inconnu, l'imprévu et la nature fondamentalement humaine dans l'exercice de la science. À cet effet, je tiens donc à remercier tout spécialement les membres de mon jury qui offrent leur temps et leur expertise pour améliorer cet ouvrage et en faire un objet toujours un peu plus *scientifique*.



## RÉSUMÉ

Par le biais d'un système complexe de réactions biochimiques, le métabolisme des organismes vivants transforme l'énergie contenue dans leur alimentation et leur environnement en métabolites énergétiques. Ces derniers permettent aux organismes d'investir leurs ressources énergétiques dans des fonctions primaires, comme maintenir leur homéostasie, et secondaires, comme la locomotion, la croissance et la reproduction. Puisque la température affecte grandement la cinétique biochimique, elle est un facteur déterminant de la vitesse du métabolisme des organismes. Les ectothermes ne régulant pas physiologiquement leur température interne, ces espèces sont particulièrement sensibles aux variations de température dans leur environnement. Toutefois, certaines espèces dites plastiques ont également la capacité d'ajuster leur physiologie afin d'optimiser leur performance dans de nouvelles conditions environnementales, comme une hausse de température. Dans le contexte actuel des changements climatiques, le paysage thermique des océans sera affecté par deux types de perturbations distincts, soient le réchauffement, à long terme, et les événements extrêmes, ou canicules marines. Puisque la région arctique apparaît comme particulièrement vulnérable selon les modèles climatiques, l'objectif de la présente étude est de déterminer si l'acclimatation d'une espèce-clé de cet écosystème, le copépoïde *Calanus glacialis*, lui permet de mieux tolérer le stress thermique ponctuel d'une canicule marine. Pour ce faire, j'ai élaboré et effectué une expérience séquentielle à Ny-Ålesund, Svalbard, où des femelles adultes de *C. glacialis* ont d'abord été exposées à des températures témoin ou de réchauffement prévu pour 2100 pendant trois semaines, suivi d'une semaine d'exposition (ou non) à une canicule marine. Pour étudier l'effet métabolique des différents traitements, j'ai analysé la probabilité de survie, les taux métaboliques et les profils métaboliques individuels de façon à intégrer les informations de chacun de ces niveaux biologiques. Il s'avère que l'acclimatation au réchauffement à long terme ne fournit aucune protection à *C. glacialis* lorsqu'il est confronté à une canicule, comme en témoigne la probabilité de survie décroissante et le ralentissement marqué du métabolisme à travers les traitements expérimentaux. La faible tolérance physiologique de *C. glacialis* au réchauffement et aux canicules laisse entrevoir des effets importants sur le comportement et l'écologie de cette espèce-clé, qui se refléteront vraisemblablement à l'échelle de l'écosystème.

### Mots-clés

Écophysiologie, écosystème marin arctique, métabolisme énergétique, ralentissement métabolique, plasticité phénotypique, dormance, invertébré marin

## ABSTRACT

Through a complex network of biochemical reactions, organisms' metabolism transforms the energy they extract from their food and their environment into energetic metabolites. In turn, these compounds enable organisms to invest in primary functions, such as homeostatic processes, and secondary functions, such as movement, growth and reproduction. Because of its effect on biochemical kinetics, temperature exerts a strong influence on metabolic processes. As such, ectotherms are especially sensitive to environmental temperature, because they do not regulate their inner temperature physiologically. Nonetheless, there are species who also have the capacity to adjust their physiology in order to optimize their performance in new environmental conditions, expressing various degrees of phenotypic plasticity. In the context of ongoing climate change, alterations of the thermal landscape will be two-fold: long-term increase in mean temperature and acute thermal extreme events, namely marine heat waves. As climatic models predict the Arctic region to be especially vulnerable to warming and heat waves, the aim of my master's project was to investigate whether a planktonic keystone species, the copepod *Calanus glacialis*, could benefit from acclimation to elevated temperature before exposure to a marine heat wave. In order to achieve this goal, I elaborated and set-up a sequential experiment in Ny-Ålesund, Svalbard, to first expose adult females to either control or warm temperature predicted to occur in 2100 for three weeks, followed by a marine heat wave for an additional week. To study the treatments' effect on specimens' metabolism, I analyzed their survival probability, individual metabolic rates and metabolic profiles and integrated the information from each aforementioned biological level of organization. My results reveal that acclimation to ocean warming does not provide any protection to *C. glacialis* when facing a marine heat wave, as indicated by the decreasing probability of survival and important metabolic slowdown at warmer experimental temperatures. *Calanus glacialis*'s limited tolerance for elevated temperature, as shown in this study, corroborates observed modifications to its behavior and ecology, all likely to affect the functioning of the Arctic marine ecosystem.

### Key words

Ecophysiology, arctic marine ecosystem, energy metabolism, metabolic depression, phenotypic plasticity, dormancy, marine invertebrate

# TABLE DES MATIÈRES

<b>CANICULE DANS L'ARCTIQUE : LE RÉCHAUFFEMENT CLIMATIQUE POURRAIT-IL BÉNÉFICIER À <i>CALANUS GLACIALIS</i> ?</b> .....	<b>III</b>
COMPOSITION DU JURY .....	I
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI .....	II
AVERTISSEMENT .....	II
REMERCIEMENTS .....	IV
AVANT-PROPOS .....	V
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>1</b>
LA TEMPÉRATURE CHEZ LES ECTOTHERMES .....	5
LIMITES PHYSIOLOGIQUES ET PLASTICITÉ .....	7
CHANGEMENTS CLIMATIQUES : TENDANCES <i>VERSUS</i> ÉVÈNEMENTS .....	10
BIOLOGIE DE <i>CALANUS GLACIALIS</i> .....	11
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET .....	14
<b>CHAPITRE I- LORSQUE LA DIAPAUSE DEVIENT QUIESCENCE, LES CANICULES MARINES BATTENT LE COPÉPODE ARCTIQUE <i>CALANUS GLACIALIS</i> À SON PROPRE JEU</b> .....	<b>19</b>
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS .....	19
FROM DIAPAUSE TO QUIESCENCE: MARINE HEAT WAVES BEAT ARCTIC COPEPOD <i>CALANUS GLACIALIS</i> AT ITS OWN GAME .....	21
CONTRIBUTIONS .....	21
ABSTRACT .....	22
INTRODUCTION .....	23
MATERIAL AND METHODS .....	26
<i>Specimens collection, transport, and sorting</i> .....	26
<i>Experimental design, system and protocol</i> .....	27

<i>Survival count</i> .....	<b><i>Error! Bookmark not defined.</i></b>
<i>Metabolic rate determination</i> .....	29
<i>Metabolite extraction and quantification</i> .....	31
<i>Statistical analyses</i> .....	32
<b>RESULTS</b> .....	<b>36</b>
<i>Survival</i> .....	36
<i>Metabolic rates</i> .....	36
<i>Metabolomic profiles</i> .....	40
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>52</b>
<i>Survival</i> .....	52
<i>Metabolic rates</i> .....	53
<i>Metabolomic profiles</i> .....	54
<i>Integrating responses</i> .....	<b><i>Error! Bookmark not defined.</i></b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>57</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>62</b>
L'IMPORTANCE DE L'ÉCHELLE TEMPORELLE .....	63
TENIR COMPTE DE LA DIVERSITÉ MÉTABOLIQUE .....	63
HÉTÉROGÉNÉITÉ SPATIALE ET HOMOGÉNÉITÉ GÉNÉTIQUE.....	64
À CHACUN SON ARCTIQUE.....	65
<b>LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>67</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma conceptuel des compartiments et mouvements de l'énergie au sein d'un organisme .....	4
Figure 2. Courbe de performance thermique d'un organisme ectotherme .....	9
Figure 3. Carte des courants océaniques autour de l'archipel de Svalbard.....	13
Figure 4. Design expérimental pour évaluer le potentiel d'acclimatation de <i>Calanus glacialis</i> à une hausse de température à long terme et sa réponse métabolique au stress thermique aigu d'une canicule marine.....	17
Figure 5. Scénarios de réponses métaboliques possibles de <i>Calanus glacialis</i> à une hausse de température à long terme et à une canicule marine à court terme .....	18
Figure 6. The effect of exposure to a heat wave and chronic warming in isolation and combined on the survival of adult females of the Arctic copepod <i>Calanus glacialis</i> ....	37
Figure 7. The effect of exposure to a heat wave and chronic warming in isolation and combined on the mean metabolic rate of adult females of <i>C. glacialis</i> .....	38
Figure 8. The effect of exposure to a heat wave and chronic warming in isolation and combined on log concentration of metabolites in <i>C. glacialis</i> adult females.....	42
Figure 9. Multivariate analysis of metabolites based on Log <sub>10</sub> normalized concentrations in adult females of <i>C. glacialis</i> .....	43
Figure 10. Heatmap and hierarchical clustering of relative Log <sub>10</sub> normalized concentrations in adult females of <i>C. glacialis</i> .....	46
Figure 11. Metabolic Pathway Analysis result for the comparison between adult females of <i>C. glacialis</i> exposed to control and warm heat wave conditions .....	51

## LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Experimental parameters during pre-exposure to control and chronic warming conditions and during exposure to a marine heat wave.....	28
Table 2. List of detected and selected compounds for metabolomics analyses on the Arctic copepod <i>Calanus glacialis</i> adult females based on percentage of detection.....	35
Table 3. ANOVA results and post-hoc comparisons of metabolic rates measured on females <i>C. glacialis</i> .....	39
Table 4. Significant metabolites (log normalized concentrations) detected by parametric ANOVA with post-hoc comparisons in adult females of <i>C. glacialis</i> .....	41
Table 5. List of significant pathways detected by Quantitative Enrichment Analysis (QEA) in adult females of <i>C. glacialis</i> .....	47
Table 6. Correlation between metabolites with special consideration for compounds changing significantly between at least two experimental treatments .....	60

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP : Adénosine diphosphate

AMP : Adénosine monophosphate

ATP : Adénosine triphosphate

C : Condition expérimentale témoin (*Control*)

CH : Condition expérimentale de canicule simple (*Control heat wave*)

CPT : Courbe de performance thermique

MO<sub>2</sub> : Consommation d'oxygène

MV : Donnée manquante (*missing value*)

RA : Registre aérobie

TMM : Taux métabolique maximal TMM

TMS : Taux métabolique standard

TAG : Triacylglycérol

W : Condition expérimentale de réchauffement climatique (*Warming*)

WH : Condition expérimentale de canicule combinée au réchauffement climatique (*Warm Heat wave*)

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le métabolisme énergétique est fondamental à toute forme de vie, il est responsable de fournir l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules et des organismes (Hochachka & Somero 2002), ce qui affecte ultimement la dynamique des populations et le fonctionnement des écosystèmes (Brown *et al.* 2004, Sibly *et al.* 2012). Les systèmes biologiques sont essentiellement des systèmes ouverts qui transforment la matière et l'énergie environnementale pour supporter leurs structures, leur développement et leur reproduction *via* leur activité métabolique (

Figure 1) (Kooijman 2010). Pour se faire, les individus ingèrent des nutriments sous différentes formes dans leur environnement pour former des réserves dynamiques. Les voies du métabolisme énergétique transforment ensuite les réserves en vecteurs énergétiques biochimiques, ou métabolites énergétiques, pour fournir l'énergie nécessaire au travail métabolique cellulaire (Kooijman 2010).

En règle générale, le métabolite énergétique de prédilection dans les cellules est l'adénosine triphosphate (ATP), qui peut être synthétisée par des processus nécessitant la présence d'oxygène, i.e. métabolisme aérobie, ou non, i.e. métabolisme anaérobie (Hochachka & Somero 2002). Chez les organismes multicellulaires, le métabolisme aérobie fournit la forte majorité de l'ATP grâce à l'activité mitochondriale, alors que le métabolisme anaérobie agit principalement à titre de source énergétique accessoire en cas d'accès limité à l'oxygène au niveau cellulaire ou lorsque le métabolisme aérobie fait défaut (Pörtner 2001, Hochachka & Somero 2002, Sokolova *et al.* 2012). La production d'ATP est régulée à plusieurs niveaux, notamment par sa propre concentration et celles de ses dérivés, l'adénosine di- et monophosphate (ADP et AMP), qui résulte en un équilibre dynamique entre la production et l'utilisation de l'énergie (Nelson & Cox 2005, Hardie 2011, De La Fuente *et al.* 2014). L'accumulation d'ADP et d'AMP signale ainsi une demande énergétique qui stimule les processus des voies métaboliques énergétiques, ce qui entraîne notamment une augmentation de la consommation d'oxygène (Clarke 1993). Le rendement en ATP du métabolisme aérobie dépend du substrat initial qui sera



oxydé dans les mitochondries (Nelson & Cox 2005), mais la consommation en oxygène des organismes qui en résulte correspond à une quantité définie d'énergie en fonction du substrat utilisé (Elliott & Davison 1975, Nelson & Cox 2005) et de l'état des mitochondries. À l'inverse, le métabolisme anaérobie est moins efficace dans sa production d'ATP, même chez les groupes d'invertébrés qui en ont recours régulièrement (Hochachka & Somero 2002). L'activation du métabolisme anaérobie se détecte notamment par l'accumulation de produits finaux de ses voies métaboliques, comme le succinate et le lactate (Hochachka & Somero 2002). Puisque les systèmes biologiques sont ouverts, les organismes doivent activement investir dans leur homéostasie, qui consiste en le maintien d'un équilibre physiologique dynamique et résulte en des dépenses énergétiques modulées par des facteurs intrinsèques, comme la masse corporelle et le stade de développement, et des facteurs extrinsèques, comme les conditions environnementales (Gillooly *et al.* 2001, Kooijman 2010, Sokolova *et al.* 2012).

Au niveau individuel, le budget énergétique fourni par l'alimentation et le métabolisme énergétique est distribué entre les fonctions essentielles et accessoires selon leur priorité et l'état physiologique de l'organisme. Le taux métabolique de base, ou standard chez les ectothermes (TMS), représente les dépenses énergétiques minimales pour entretenir les conditions intracellulaires optimales qui incluent notamment le maintien des gradients ioniques autour des membranes cellulaires et la réparation des dommages structuraux (Hochachka & Somero 2002, Makarieva *et al.* 2006). L'énergie allouée aux fonctions physiologiques accessoires, comme les déplacements, la croissance, le développement ou encore la reproduction, dépend ensuite de l'étendue du registre aérobie (RA), soit la différence entre le TMS et le taux métabolique maximal (TMM) (Pörtner & Farrell 2008, Sokolova 2013). Le RA informe donc sur l'état physiologique des organismes dans des conditions données, puisqu'une valeur élevée indique que la demande en énergie minimale (i.e. TMS) est faible par rapport à la capacité de production maximale. À l'inverse, un RA moins prononcé indique plutôt un TMS élevé, voire même supérieur au TMM si les conditions sont plus extrêmes que ce que l'organisme peut supporter (Sokolova *et al.* 2012). L'une des sources majeures de détérioration de l'état

physiologique et donc de diminution du RA des organismes est l'exposition à des conditions environnementales défavorables prolongées, comme un accès limité à l'oxygène, un environnement chimique altéré, mais surtout des températures sous-optimales (Pörtner 2001, Sokolova 2013).

Le métabolisme des organismes est fortement affecté par les contraintes thermodynamiques (Gillooly *et al.* 2001). La masse et la température interne des organismes sont deux facteurs clés qui affectent la vitesse du métabolisme énergétique (taux métabolique ci-après) (Gillooly *et al.* 2001, Brown *et al.* 2004), qui est classiquement estimée par la formule suivante :

$$I \approx M^b \times e^{-E/kT} \quad (1)$$

Où  $I$  représente le taux métabolique ;  $M$ , la masse de l'organisme ;  $b$ , l'exposant allométrique;  $E$ , l'énergie d'activation du métabolisme aérobie ;  $k$  la constante de Boltzmann ; et  $T$ , la température (Brown *et al.* 2004). Par conséquent, le taux métabolique d'organismes de masse semblable est généralement plus important à température élevée, même chez des organismes vivant dans leurs conditions optimales respectives (Brown *et al.* 2004, Dillon *et al.* 2010). Certains groupes ont développé des mécanismes de régulation physiologique de leur température interne, i.e. endothermie, ou des mécanismes compensatoires à des conditions thermodynamiques extrêmes (e.g. « *Metabolic Cold Adaptation* » ; Clarke 1980). Toutefois, la grande majorité des espèces animales actuelles sont ectothermes, et leur température interne est donc directement lié à leur température environnementale (Angilletta 2009).

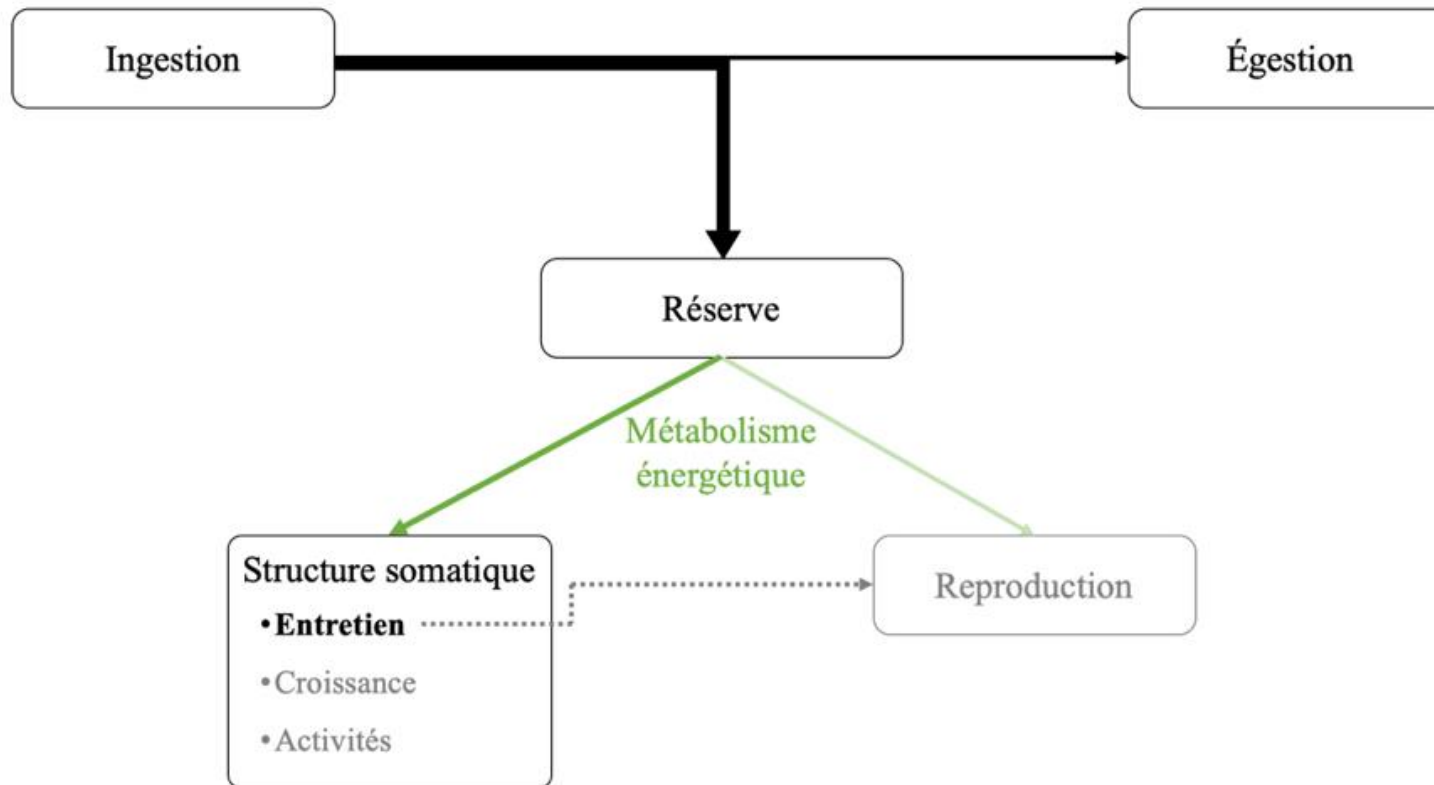


Figure 1. Schéma conceptuel des compartiments et mouvements de l'énergie au sein d'un organisme selon la théorie du budget énergétique dynamique (*Dynamic Energy Budget Theory*), tiré et adapté de Kooijman 2010. Le métabolisme énergétique utilise les réserves issues de l'alimentation des organismes pour fournir l'énergie nécessaire aux fonctions prioritaires (en noir) et secondaires (en gris).

## La température chez les ectothermes

La méthode classique pour déterminer la sensibilité thermique des systèmes biologiques est d'établir leur courbe de performance thermique (CPT), qui consiste en la mesure de la performance d'un trait sur un gradient de température défini (Angilletta 2009). Typiquement, les CPT comptent trois phases distinctes en commençant par (1) une amélioration progressive suivie (2) d'un plateau de performance optimale, et terminant par (3) une détérioration rapide (Figure 2a) (Angilletta 2009, Rohr *et al.* 2018). Au même titre que dans la formule (1), la phase positive est typiquement attribuée au principe d'Arrhenius, qui précise que l'augmentation de la température d'une réaction diminue son énergie d'activation, entraînant typiquement l'accélération de l'activité enzymatique et donc de la réaction dans son ensemble (Schulte 2015). La phase de détérioration rapide est caractérisée par un écart marqué de la relation prédite par l'équation d'Arrhenius (*Arrhenius Breakpoint Temperature*) qui définit alors le seuil de tolérance du système à l'étude (Schulte 2015). Une asymétrie plus marquée entre la phase positive graduelle et la phase négative rapide dans les CPTs suggère alors un effet plus marqué et plus dommageable des températures élevées par rapport à l'optimum que les plus basses (Pörtner 2001). Ceci étant dit, les systèmes biologiques sont issus d'interactions complexes où chaque élément est affecté différemment par les variations de température, ce qui suggère que plusieurs facteurs sont responsables de la forme caractéristique des CPT (Schulte 2015). Par exemple, l'efficacité de catalyse des enzymes est elle-même modulée par la température du système réactionnel, ce qui s'apparente à des variations empiriques dans l'énergie d'activation d'une réaction donnée selon un gradient de température (Hochachka & Somero 2002, Pawar *et al.* 2016).

Au niveau cellulaire, les températures sous-optimales, chaudes comme froides, entraînent des dommages d'abord réversibles au-delà du seuil *pejus*, puis irréversibles au-delà du seuil *pessimum*, qui mènent à la mort de l'organisme en s'éloignant de l'optimum thermique (Pörtner 2001). Dans le cas d'une hausse de température, ces dommages résultent notamment des effets délétères de la température sur l'intégrité des structures cellulaires et des effets d'une activité oxydative accrue (Nelson & Cox 2005, Hazel 1995,

Sørensen *et al.* 2003, Abele *et al.* 2007). La capacité du métabolisme énergétique à compenser pour les effets de la température dépend notamment de son intégrité fonctionnelle des mitochondries (Abele *et al.* 2007, Blier *et al.* 2014, Somero 2020) et de leur approvisionnement en oxygène (e.g. *Oxygen and Capacity Limited Thermal Tolerance Hypothesis*) (Pörtner 2001, 2010). La transition entre les états *pejus* et *pessimum* correspond (typiquement) à une perte de capacité du métabolisme aérobie qui résulte en une augmentation de l'activité du métabolisme anaérobie, limitant ainsi la période que l'organisme sera en mesure de supporter ces conditions (Sokolova *et al.* 2012). Étant donné l'étroite relation entre la température environnementale et interne chez les ectothermes, leurs limites physiologiques de tolérance thermique représentent un facteur déterminant de leur distribution géographique (Bozinovic *et al.* 2011). Il existe toutefois une diversité de mécanismes qui pondèrent les effets de la température et affecte en retour la sensibilité réalisée des organismes à leur environnement (Dowd *et al.* 2015, Rohr *et al.* 2018).

La sensibilité thermique des organismes se décrit fondamentalement selon deux axes, soit l'étendue des températures tolérées autour de leur optimum et leur capacité d'ajuster leurs limites thermiques (Angilletta 2009). Le premier distingue les espèces qui ne tolèrent qu'une plage restreinte de température, i.e. sténothermes, de celles capables de bien performer sur un large gradient de température, i.e. eurythermes (Huey & Kingsolver 1993). Le second évalue la capacité d'ajustement du phénotype qui définit la tolérance des organismes, i.e. plasticité phénotypique (Huey & Kingsolver 1993). Cette dernière peut être bénéfique (ou non) et se manifeste par l'induction de mécanismes de protection dont, par exemple, l'expression d'enzymes modifiées (Hochachka & Somero 2002, Somero 2010), l'expression de protéines chaperonnes (Sørensen *et al.* 2003, Haslbeck *et al.* 2005, Daugaard *et al.* 2007), une réorganisation des membranes cellulaires (Hazel 1995) ou encore un ralentissement drastique des fonctions métaboliques pour limiter les dommages cellulaires pendant une période défavorable, i.e. état de dormance contrôlé (diapause) ou incontrôlé (quiescence) (Hand 1996, Guppy & Withers 1999).

## La performance physiologique et la plasticité

Alors que le premier axe définit l'amplitude de la CPT d'un organisme, surtout au niveau du plateau optimal de performance, le deuxième intervient plus précisément dans la forme des phases d'amélioration et de détérioration (Figure 2d à g). Lorsque la plasticité phénotypique est adaptative, elle améliore la performance des organismes dans des conditions *a priori* défavorables (Ghalambor *et al.* 2007, Dowd *et al.* 2015). Par exemple, une exposition chronique à des températures sous-optimales, mais non létales, peut accélérer la mise en place des processus responsables de l'acclimatation des organismes et ainsi, favoriser leur survie, et ultimement leur fitness (Dowd *et al.* 2015). À l'inverse, lorsqu'elle est non-adaptative, i.e. elle ne se traduit pas par un fitness accru, elle crée des phénotypes alternatifs moins performants et ainsi accentue l'effet d'une pression sélective vers un nouvel optimum (e.g. Ghalambor *et al.* 2015). La différence entre la performance initiale et plastique se traduit mathématiquement par des normes de réactions qui mesurent alors la capacité d'acclimatation des organismes (Angilletta *et al.* 2003). D'autres phénomènes plastiques plus contraignants peuvent aussi prendre forme, comme la plasticité exprimée pendant le développement dans des conditions sous-optimales, qui altère la performance d'un organisme de manière irréversible dans son développement subséquent (Woods & Harrison 2002). Le calcul et l'interprétation des normes de réactions est toutefois sujet à nuance, puisque bien que la performance des organismes dépende de la taille corporelle et la distribution géographique des organismes, son estimation est aussi soumise à l'influence de la méthode de mesure utilisée (Rohr *et al.* 2018). À ce titre, l'un des plus grands défis de la biologie thermique reste à ce jour la standardisation des paramètres expérimentaux pour obtenir des données comparables et pertinentes dans le contexte ontogénétique et écologique des espèces (Woods & Harrison 2002, Angilletta *et al.* 2006, Pawar *et al.* 2016, Rohr *et al.* 2018, Leiva *et al.* 2019)

Généralement, les espèces ayant évolué dans un environnement stable, p.ex. les milieux tropicaux et polaires, sont plus enclin à la sténothermie et à posséder une faible capacité d'acclimatation, ce qui les rend plus vulnérables aux variations de température

(Dillon et al. 2010, Somero 2010). Ceci étant dit, l'étalement de la distribution géographique des populations d'une espèce peut favoriser l'évolution d'adaptations locales qui modulent la réponse physiologique des organismes à une variation de température (Calosi *et al.* 2017). Les variations entre les populations sont notamment possibles grâce à la variation interindividuelle des traits phénotypiques qui ouvre la voie aux processus de sélection locaux et globaux (Darwin 1859, Bennett 1987, Bolnick *et al.* 2011, Calosi *et al.* 2013b, Dowd *et al.* 2015, Guscelli *et al.* 2019). Dans un contexte de changements environnementaux importants, une compréhension approfondie de la tolérance thermique des espèces ectothermes apparaît comme un élément clé dans nos prédictions de l'état des écosystèmes dans les décennies à venir (Chown et al. 2010, Somero 2010, Stillman 2019).

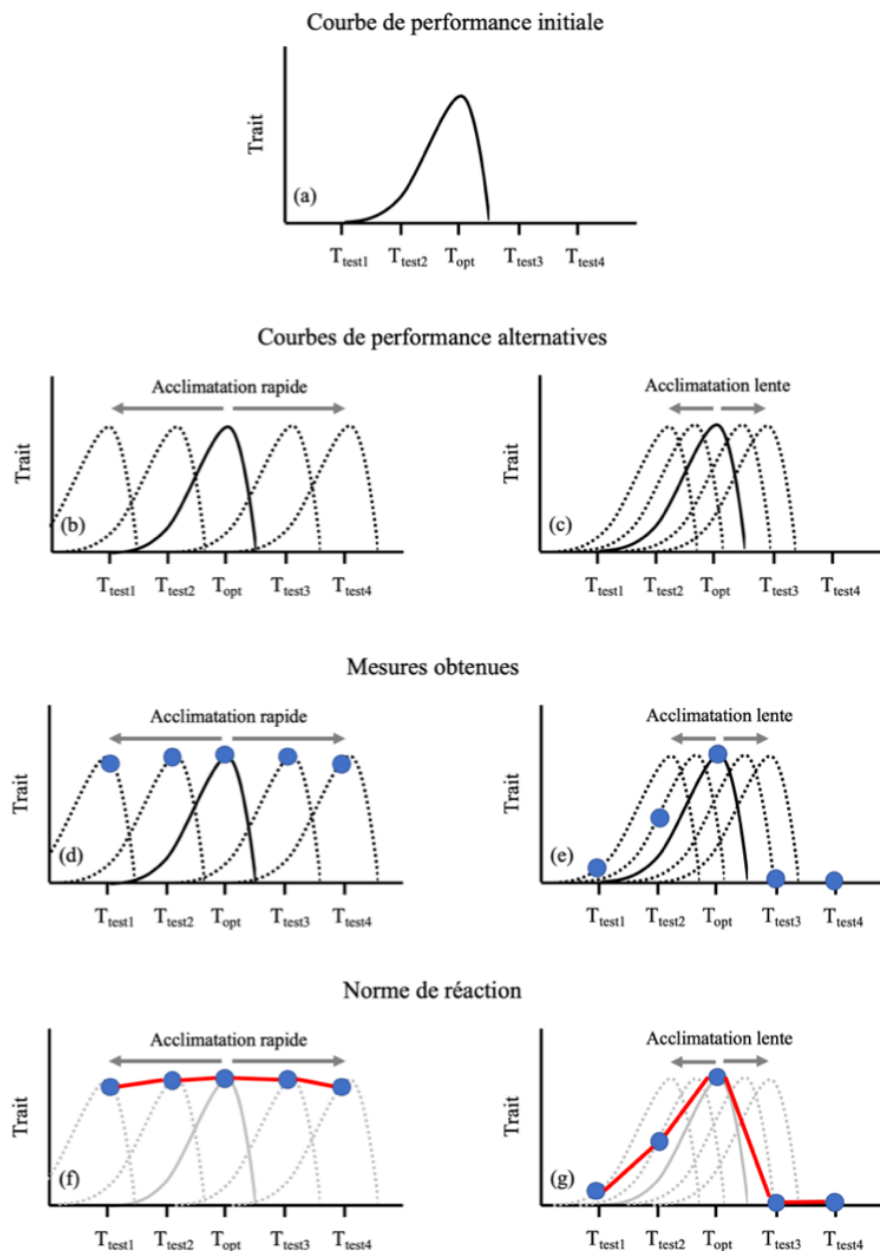


Figure 2. Courbe de performance thermique d'un organisme ectotherme ; les panneaux illustrent (a) une courbe de performance typique en trois phases (augmentation lente, plateau optimum et diminution rapide; (b) et (c) l'effet de l'acclimation qui permet aux organismes d'améliorer leur performance dans des conditions initialement sous-optimales; (d) et (e) la mesure de performance du trait après acclimation; et (f) et (g) les normes de réactions estimées à partir des mesures de performance. Tiré et adapté de Rorh *et al.* 2018.



## Les changements climatiques : tendances *versus* évènements

Le réchauffement climatique est un phénomène planétaire complexe qui se manifeste sous différents processus en fonction des écosystèmes et des régions (IPCC 2013). Outre l'augmentation des températures moyennes à long terme, le réchauffement climatique causera également une augmentation de la fréquence et de l'intensité des phénomènes météorologiques extrêmes, comme notamment les canicules, autant dans les milieux terrestres que les milieux marins (IPCC 2013, Oliver *et al.* 2018). Une canicule marine survient par le biais d'échanges importants de chaleur entre l'atmosphère et l'océan, qui forme alors une masse d'eau de surface chaude et distincte (Hobday *et al.* 2016; Stillman 2019). Pour qu'une anomalie de température soit qualifiée de canicule marine, la masse d'eau en question doit atteindre une température d'un niveau égal ou supérieur au 90<sup>e</sup> percentile d'occurrence pour la région touchée, et ce, pour un minimum de cinq jours consécutifs (Hobday *et al.* 2016). Des épisodes de canicule marine sont principalement documentés dans les régions de basses latitudes où les effets néfastes des hautes températures se soldent en mortalités massives au sein des écosystèmes côtiers, surtout chez les ectothermes (Wernberg *et al.* 2012, Benthuisen *et al.* 2018, Smale *et al.* 2019). Or, ces phénomènes extrêmes sont recensés à l'échelle planétaire, sans que les effets sur tous les écosystèmes ne soient pour l'instant étudiés (<http://www.marineheatwaves.org/>). Parmi les régions les plus sujettes à de tels phénomènes extrêmes, l'océan Arctique apparaît en tête de liste (Frölicher *et al.* 2018).

L'écosystème marin arctique, qui se démarque entre autres par sa forte saisonnalité, se réchauffe actuellement à un rythme parmi les plus rapides au monde (IPCC 2013, Larsen *et al.* 2014). Non seulement atteindra-t-il un niveau de réchauffement parmi les plus élevés dans les décennies à venir, mais les modèles prédisent également que les probabilités de canicules marines augmenteront davantage que presque partout ailleurs pour chaque degré de réchauffement moyen (Frölicher *et al.* 2018). L'écosystème marin arctique est toutefois hétérogène, puisqu'il est influencé par plusieurs paramètres géographiques et océanographiques (Wassmann 2011, Bluhm *et al.* 2015). Le réchauffement de son secteur atlantique est attribué à l'intrusion plus profonde d'eau

provenant l'océan Atlantique le long du courant à l'ouest de Spitzberg (*West Spitsbergen Current* ; Figure 3) (Pavlov *et al.* 2013) L'influence croissante de l'océan Atlantique se fait notamment ressentir dans le Kongsfjord (Svendsen *et al.* 2002, Cottier *et al.* 2005, Divya & Krishnan 2017), sur la côte ouest de l'archipel de Svalbard, qui abrite par conséquent un assemblage changeant de faune arctique et boréale (Hop *et al.* 2002, Kwasniewski *et al.* 2003). Au sein de sa communauté zooplanctonique diversifiée, le Kongsfjord compte une forte abondance de copépodes calanoïdes, dont notamment l'espèce arctique *Calanus glacialis* (Jaschnov 1955).

### **La biologie de *Calanus glacialis***

Les copépodes *Calanus spp.* sont un complexe d'espèces qui se succèdent selon un gradient latitudinal principalement issu de changements de température, salinité et saisonnalité (Daase *et al.* 2007, Falk-Petersen *et al.* 2007). *Calanus glacialis* partage sa frontière atlantique avec *C. finmarchicus*, sa contrepartie boréale de plus en plus recensée en Arctique, et partage les régions arctiques avec *C. hyperboreus*, l'espèce la plus massive et associée aux eaux plus froides et profondes (Hop *et al.* 2002, Arnkværn *et al.* 2005, Daase *et al.* 2007). *Calanus glacialis* est une espèce pérenne dont le cycle de vie complexe dure entre un et deux ans, et comprend six stades de *nauplii*, cinq stades copépodites et un stade adulte gonochorique (Falk-Petersen *et al.* 2007). Les femelles peuvent effectuer leur cycle de reproduction selon une stratégie d'investissement de leurs réserves acquises l'année précédente, i.e. *capital breeding*, ou de leurs ressources immédiates, i.e. *income breeding*, en fonction des conditions environnementales souvent définies par la zone géographique d'une population (Daase *et al.* 2013). Les œufs pondus au printemps se développent rapidement à travers les différents stades de développement grâce à leur consommation de la floraison saisonnière de phytoplancton. À la fin de la saison estivale, les copépodites de stade IV et V, et parfois les femelles adultes, entreprennent une migration en profondeur pour hiverner en état de dormance métabolique, ou diapause (Falk-Petersen *et al.* 2009, Kosobokova 1999, Niehoff & Hirche 2005, Bandara *et al.* 2016, Baumgartner & Tarrant 2017). L'accumulation de réserves lipidiques pendant les saisons printanières et estivales représente alors un élément clé du cycle de vie de

*C. glacialis* (Falk-Petersen *et al.* 2009, Schmid *et al.* 2018). Ces réserves sont entreposées en esters cireux qui forment une gouttelette occupant jusqu'à 80 % du volume de leur prosome (Lee *et al.* 2006). Outre sa fonction énergétique, la réserve lipidique *C. glacialis* pourrait également jouer un rôle important dans le moment, la profondeur physique et l'intensité métabolique de leur diapause (Pond 2012, Schmid *et al.* 2018).

Dans le Kongsfjord, *C. glacialis* peut atteindre des abondances supérieures à  $2,0 \times 10^5$  individus  $m^2$  pendant les périodes de floraison de phytoplancton (Daase *et al.* 2013). Ce copépode de relativement grande taille au stade adulte (prosome > 3 mm) (Arnkværn *et al.* 2005) est peu sélectif dans son alimentation et constitue un important brouteur lorsque le phytoplancton est abondant (Cleary *et al.* 2017), en plus d'être lui-même consommé par une diversité de prédateurs (Hop *et al.* 2002, Berge *et al.* 2012). Il représente jusqu'à 80% des copépodes dans les communautés de zooplancton dans les fjords arctiques (Bandara *et al.* 2016, Arnkværn *et al.* 2005). En plus de son rôle important dans le réseau trophique arctique, *C. glacialis* influence également le transport et le recyclage de la matière organique par son mode d'alimentation peu efficace (i.e. *sloppy feeding*) et sa production de pelotes fécales lors de ses migrations verticales quotidiennes et saisonnières (Moller *et al.* 2003, Jónasdóttir *et al.* 2015). Puisque que *C. glacialis* occupe un rôle clé au sein de l'écosystème arctique côtier, incluant les régions en transition comme le Kongsfjord (Weydmann *et al.* 2018), et qu'il entretient une relation étroite avec les eaux de surface à un moment sensible de son cycle de vie, étudier les effets du réchauffement climatique et des canicules marines sur cette espèce devient un élément important de notre compréhension des effets potentiels des changements climatiques pour affiner nos prédictions de leurs conséquences biologiques et écologiques.

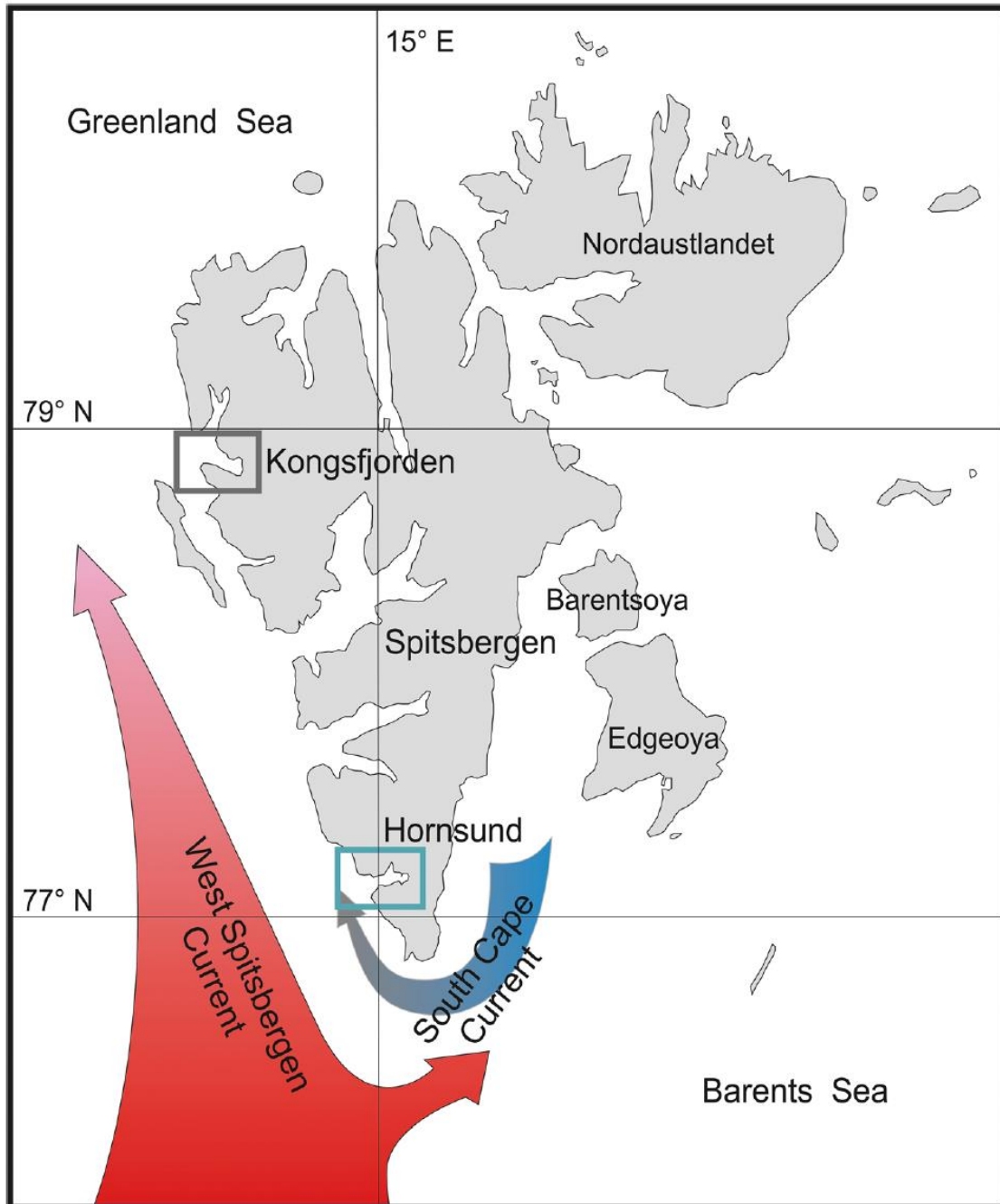


Figure 3. Carte des courants océaniques autour de l'archipel de Svalbard tiré de Weydmann *et al.* (2018). La flèche rouge indique la direction et l'importance relative des eaux chaudes atlantiques dans le West Spitzbergen Current (WSC). Kongsfjorden se situe dans l'encadré gris au niveau du 79° parallèle. Pendant les deux dernières décennies, le WSC s'est rapproché de la côte de Svalbard et l'eau atlantique pénètre plus tôt et plus longtemps dans le Kongsfjorden (Cottier *et al.* 2005, Divya et Krishnan 2017)

La réponse métabolique de *C. glacialis* au stress thermique est peu étudiée par l'approche expérimentale, et ces études font généralement abstraction de la variation individuelle. À ce jour, deux études se sont intéressées aux variations du taux métabolique de *C. glacialis* en fonction de la température. Tande (1988) a d'abord conclu que la température n'affecte pas significativement la consommation d'oxygène entre -1 et 5 °C chez des individus échantillonnés en mer de Barents, mais elle entraîne une augmentation notable de leur taux métabolique lorsqu'elle est supérieure à 5°C. Une deuxième étude, effectuée par Alcaraz et collègues (2013) dans la région de Svalbard, notait plutôt une augmentation du taux métabolique entre 0 et 6 °C, suivi d'une légère diminution à 10 °C. En parallèle, d'autres études ont démontré une augmentation du taux d'ingestion (Grote *et al.* 2015), une hausse de la mortalité (Grenvald *et al.* 2013), une augmentation du taux quotidien de production d'œufs et un développement plus rapide suite à une augmentation de température (Kjellerup *et al.* 2012, Weydmann *et al.* 2015). En milieu naturel, la distribution verticale et géographique de *C. glacialis* s'avère corrélée aux températures de surface plus froide que 6 °C (Niehoff & Hirche 2005, Daase *et al.* 2007, Carstensen *et al.* 2012) et les femelles adultes échantillonnées dans les masses d'eau plus chaude que 5 °C présentaient un ralentissement du développement gonadique (Niehoff & Hirche 2005). Bien que *C. glacialis* montre des signes de sensibilité aux hausses de température, il n'existe pas de travaux à l'heure actuelle qui aient étudié la possibilité d'acclimatation chez cette espèce.

## **Objectifs et hypothèses du projet**

Ainsi, l'objectif de la présente étude est de déterminer si **le réchauffement prévu en 2100, et donc à long terme, par le RCP 4.5 (IPCC 2013) pour l'océan Arctique permettra à *C. glacialis* de s'acclimater à une hausse de température afin de mieux tolérer les épisodes de canicules marines**, un stress thermique à court terme. Par le biais de l'approche expérimentale détaillée dans le prochain chapitre, des copépodes femelles adultes échantillonnées dans le Kongsfjorden ont été exposées à des conditions de réchauffement à long terme et/ou à une canicule marine (Figure 4) pour en évaluer l'effet sur :

- (i) leur survie ;
- (ii) leur demande énergétique;
- (iii) leur profil métabolomique.

Chaque paramètre physiologique a été mesuré au niveau individuel afin de tenir compte de la variabilité entre les individus, tout en permettant l'intégration des différents niveaux biologiques pour évaluer le potentiel d'acclimatation par la plasticité phénotypique (Figure 4).

Selon les connaissances actuelles sur l'effet de la température sur le métabolisme énergétique, la demande énergétique de *C. glacialis* devrait augmenter de façon progressive avec la température jusqu'à son seuil de tolérance thermique, le point *pejus*, marquée par son écart au principe d'Arrhenius (*Arrhenius Breakpoint Temperature*) et la transition entre le métabolisme aérobie et anaérobie (Portner 2001, Sokolova *et al.* 2012). Les études antérieures, toutes effectuées sur une courte période de temps (24 heures pour Tande (1988) et quelques jours sans précisions pour Alcaraz *et al.* (2013)), suggèrent que *C. glacialis* atteint un maximum de respiration autour de 10 °C (Tande 1988, Alcaraz *et al.* 2013), un seuil dépassé uniquement par le traitement le plus chaud de mon expérience, la canicule du scénario réchauffement climatique (WH) (Figure 4). La consommation d'oxygène des copépodes devrait donc augmenter avec la température des trois premiers traitements, selon la séquence contrôle (*control*; C), réchauffement (*warming*; W) et canicule du scénario contrôle (*control heatwave*; CH), puis diminuer chez les individus soumis au traitement de canicule du scénario réchauffement (*warming heatwave*; WH).

Si les organismes sont en mesure de s'acclimater aux conditions chaudes à long terme, alors la différence de performance, ou norme de réaction, entre les scénarios contrôle (C – CH) et chaud (W – WH) devrait être semblable ou indiquer une différence de performance atténuée (Figure 5). Pour déterminer si l'acclimatation a un effet bénéfique, la comparaison des profils métabolomiques fournira les indices nécessaires à évaluer la part des métabolismes aérobie et anaérobie dans la production d'énergie à

l'échelle individuelle. Une accumulation importante d'ATP signalera un fonctionnement adéquat du métabolisme aérobie, puisque son rendement est beaucoup plus efficace, alors qu'un rendement faible en ATP et une accumulation de sous-produits du métabolisme aérobie (e.g. lactate, aspartate, succinate, oxaloacétate, alanine) indiqueront une transition physiologique associée à des conditions *pessimum* (Sokolova *et al.* 2012, Muller *et al.* 2012). Finalement, le taux de survie dans les différentes conditions informera sur la durabilité et l'effet bénéfique (ou non) de la réponse plastique des organismes et devrait diminuer en augmentant la température expérimentale (Figure 5, flèche pâle vs opaque).

La présente étude vise donc à approfondir notre compréhension des mécanismes responsables de la tolérance thermique des espèces ectothermes marines polaires et explorer la possibilité des espèces à s'ajuster, et éventuellement s'adapter, aux changements rapides dans leur environnement.

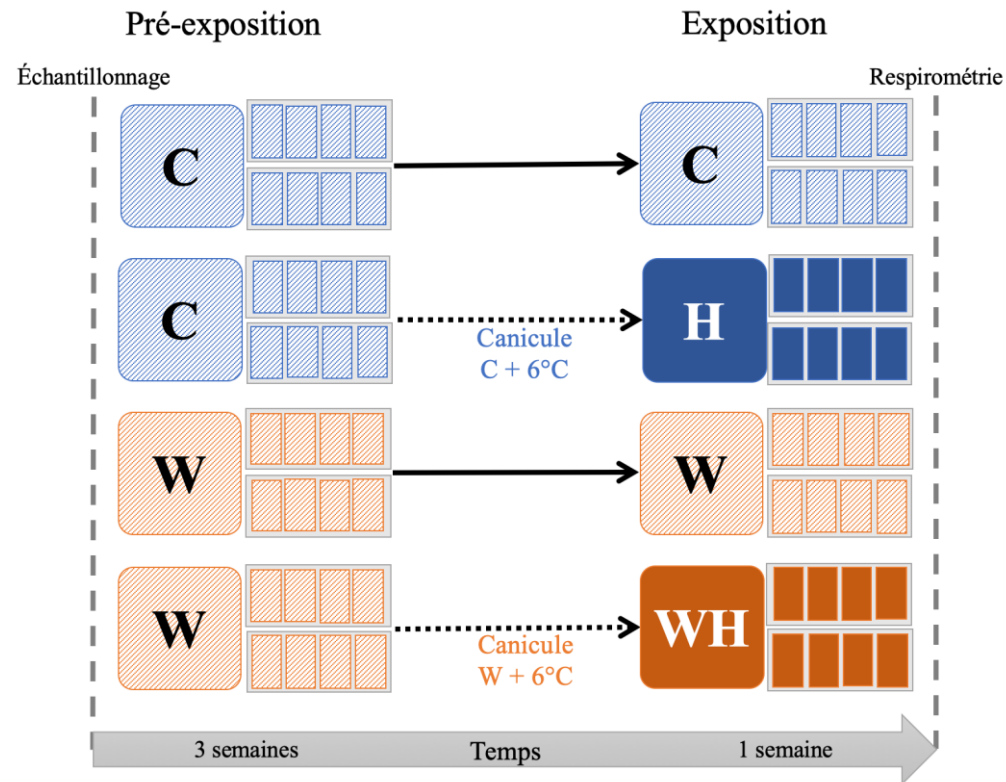


Figure 4. Design expérimental pour évaluer le potentiel d'acclimation de *Calanus glacialis* à une hausse de température à long terme et sa réponse métabolique au stress thermique aigu d'une canicule marine. Les unités en bleu rayé sont à température contrôlée ( $C = 3,5\text{ °C}$ ) ; le bleu uni représente une canicule marine contrôlée ( $H = C + 6,0\text{ °C}$ ) ; le rouge rayé, la température prévue en 2035 dans le contexte de réchauffement chronique ( $W = C + 3,0\text{ °C}$ ) ; le rouge uni, une canicule d'amplitude similaire, mais dans des conditions chaudes ( $WH = W + 6,0\text{ °C}$ )



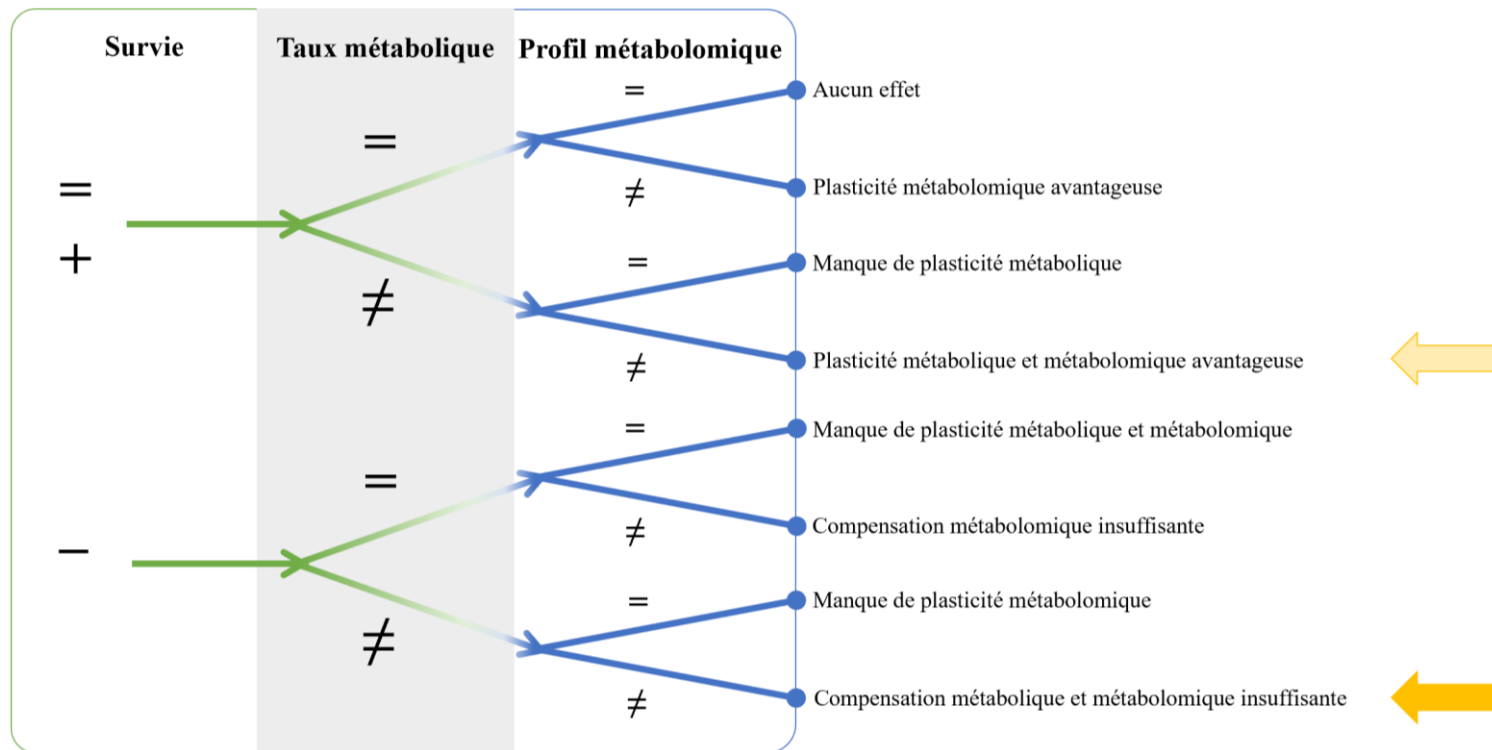


Figure 5. Scénarios de réponses métaboliques et métabolomiques possibles de *C. glacialis* à une hausse de température à long terme et à une canicule marine à court terme. Les symboles = et ≠ indiquent si la réponse mesurée au niveau biologique donné est semblable ou différente de la performance mesurée chez les individus témoins (contrôle ou réchauffement selon la référence de la canicule). La flèche pâle indique un scénario où la plasticité permettrait aux organismes de s'acclimater au réchauffement et perdurer après une canicule ; la flèche opaque indique un scénario où la capacité plastique des organismes n'est pas suffisante pour que les organismes s'acclimatent au réchauffement et ainsi, supporte encore moins bien une canicule.

## CHAPITRE I

# LORSQUE LA DIAPAUSE DEVIENT QUIESCENCE : LES CANICULES MARINES BATTENT LE COPÉPODE ARCTIQUE *CALANUS GLACIALIS* À SON PROPRE JEU

### RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Le métabolisme énergétique des organismes vivants se définit par la production et la transformation de l'énergie biochimique aux niveaux de la cellule, des individus, des populations et ultimement, des écosystèmes. La température interne des organismes et leur faculté à la contrôler influencent les conditions des processus métaboliques, ce qui rend les espèces ectothermes particulièrement vulnérables aux changements de température dans leur environnement. Dans le contexte actuel des changements climatiques, une attention particulière se porte sur les événements météorologiques extrêmes, puisqu'ils imposent une charge de stress additionnelle aux espèces déjà vulnérables. Ceci est particulièrement vrai dans l'océan Arctique, où le taux de réchauffement est parmi les plus rapides et où la fréquence et l'intensité des canicules marines augmentera sensiblement pendant les prochaines décennies. L'objectif de la présente étude est donc de déterminer si l'acclimatation à des températures élevées, comme celles induites par le réchauffement climatique, pourrait permettre à une espèce-clé de l'Arctique, le copépoде *Calanus glacialis*, de mieux tolérer des événements de température extrême grâce à des mécanismes d'acclimatation bénéfique. Pour ce faire, une expérience séquentielle a été montée, où des femelles étaient exposées d'abord à des températures témoin ou légèrement élevée pendant trois semaines, suivi d'une période d'exposition à une canicule ou non pendant une semaine supplémentaire. À la fin des quatre semaines d'expérience, nous avons compté les survivants, mesuré les taux métaboliques individuels et analysé les profils métabolomiques individuels. Il s'avère que l'exposition au réchauffement climatique ne permet pas aux femelles adultes de *C. glacialis* de mieux tolérer une canicule, bien au contraire, puisque la proportion de survie la plus faible a été comptée dans le traitement de canicule dans le scénario de

réchauffement. Les taux métaboliques étaient les plus faibles dans le traitement de réchauffement, suivi des deux traitements de canicules. Finalement, les profils métabolomiques ont permis de distinguer deux typologies de ralentissement métabolique, soient la diapause, un état de dormance contrôlé, et la quiescence, un état de dormance involontaire et plus dommageable. En somme, la combinaison du réchauffement et des canicules représente un défi plus important que lorsqu'ils surviennent seuls, vraisemblablement à cause du ralentissement métabolique à température légèrement élevée qui limite la capacité de *C. glacialis* de compensation d'un stress thermique additionnel. En tant qu'espèce-clé de l'écosystème arctique, il est plausible que les effets néfastes du réchauffement sur la physiologie de *C. glacialis* se refléteront aux niveaux trophiques supérieurs et ultimement, sur la structure et fonctionnement de cet écosystème.

Les premières versions du présent article fût rédigées par moi-même, puis révisées et commentées d'abord par le professeur Piero Calosi, PhD, puis par Peter Thor, PhD, mes deux codirecteurs. Tous les auteurs ont contribué à l'idée originale et au développement du design expérimental, et grâce à l'encadrement du chercheur Peter Thor, j'ai pu faire l'inventaire des survivants et mesurer les taux métaboliques moi-même pour les analyses. J'ai procédé aux analyses statistiques des données, encadrée directement par Piero Calosi et à distance par Peter Thor, et leur interprétation a évolué au fil de nos discussions. Bien qu'il ne soit pas encore soumis pour publication à ce jour, son caractère intégrateur entre les différents types d'information métabolique nous incite à considérer le soumettre au courant des prochaines semaines pour révision auprès de la revue *Scientific Reports* du groupe *Nature Research*. Les résultats présentés ici ont fait l'objet plus récemment, en mars 2019, d'une présentation par affiche dans le cadre de la conférence *Polar Marine Science* du groupe *Gordon Research Conference* et *Seminar* à Barga, en Italie. D'autres affiches ont également été présentées aux réunions scientifiques annuelles 2017 et 2018 du regroupement Québec Océan ainsi que la conférence Arctic Change 2017 du regroupement ArcticNet.

# **FROM DIAPAUSE TO QUIESCENCE: MARINE HEAT WAVES BEAT ARCTIC COPEPOD *CALANUS GLACIALIS* AT ITS OWN GAME**

Carignan Marie-Hélène<sup>1\*</sup>, Peter Thor<sup>2,3</sup>, Piero Calosi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Département de Biologie, Chimie et Géographie, Université du Québec à Rimouski, Rimouski (QC), G5L 3A1

<sup>2</sup> Norwegian Polar Institute, 9007 Tromsø (Norway)

<sup>3</sup> current address: Swedish Meteorological and Hydrological Institute, 426 71 Västra Fölunda (Sweden)

\* corresponding authors: marie-helene.carignan@uqar.ca; piero\_calosi@uqar.ca

## **CONTRIBUTIONS**

MHC and PT collected the copepods, MHC measured metabolic rates and extracted the metabolomic profiles. MHC executed the statistical analyses, supported by PC for interpretation of the results. MHC provided the first draft and all authors participated in reviewing the manuscript. MHC received the Arctic Field Grant to directly support financially the field work, PT supported participated in the project with funding from the Norwegian Polar Institute, and PC with funding from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada and Fond de Recherche en Sciences Naturelles et Technologies du Québec.

## ABSTRACT

Energy metabolism is a complex biochemical system that translates into the production and turnover of energy within cells, individuals and, ultimately, ecosystems. Organisms' internal temperature and their capacity to regulate it exert an important influence on metabolic processes, making ectotherms especially metabolically sensitive to environmental temperature. Within the context of the ongoing climate change, special consideration should be directed towards extreme events, as they pose an additional threat to already sensitive species. This is particularly relevant in the Arctic Ocean, where warming rates are amongst the fastest on Earth, and in addition marine heat waves will increase considerably in frequency and intensity in the near future. Consequently, the aim of our study was to determine whether chronic warming could provide protection from marine heat waves to the Arctic keystone copepod *Calanus glacialis* through beneficial acclimation. We conducted a sequential experiment by first exposing adult females to either control or chronic warming conditions for three weeks, followed by an exposure to either control or heat wave conditions for an additional week. At the end of the four-week experiment, we determined survival, measured individual routine metabolic rates, and collected specimens for the determination of individual metabolomic profiles. We found no evidence that chronic warming could provide protection from marine heat waves to *C. glacialis*, in fact quite the opposite, as survival was the lowest at the combined warming and heat wave condition. Metabolic rates decreased markedly with increased temperature, with the lowest rates measured in chronic warming individuals, followed by both heat wave treatments. Finally, metabolomic profiles allowed distinguishing diapause-like dormancy in individuals under the chronic warming in isolation from the quiescent state of individuals in both heat wave conditions. In conclusion, chronic warming and marine heat waves combined cause more important metabolic perturbations than in isolation, likely due to the detrimental impact of chronic stress on *C. glacialis*'s capacity to respond adequately to additional thermal stress. The keystone position of *C. glacialis* in the Arctic marine ecosystem implies important consequences as the species face considerable physiological challenges under ongoing global warming.

## INTRODUCTION

Energy metabolism is a complex biochemical system that translates as the production, distribution, and utilization of energy within cells, individuals and, ultimately populations and ecosystems (Brown *et al.* 2004). Because of the effect of temperature on biochemical processes, ectotherms are considered as especially physiologically vulnerable to variation of temperature in their environment (Clarke 2004, Angilletta 2009). Typically, the metabolic rate of an organism of a certain mass increases with temperature (Gillooly *et al.* 2001, Brown *et al.* 2004) until it reaches a threshold, or thermal limit, where physiological processes are no longer supported by aerobic metabolic energy production and cellular damages accumulate (Pörtner & Knust 2007, Pörtner & Farrell 2008). Ultimately, environmental temperature plays a key role in defining ectotherm species' geographical distribution (Bozinovic *et al.* 2011). As a consequence, modifications of thermal regimes caused by ongoing anthropogenic climate change will likely incur important metabolic and bioenergetic implications in marine invertebrates (Gunderson & Stillman 2015, Stillman 2019).

Changes in environmental temperature caused by ongoing climate change will be two-fold: a long-term increase in sea surface temperature averages, known as ocean warming, and acute extreme thermal events, such as heat waves (IPCC 2013). In particular, marine heat waves are defined as an elevated temperature condition which fall over the 90<sup>th</sup> percentile of occurrence over the last 30 years for at least five consecutive days (Hobday *et al.* 2016). These phenomena are not independent, as models suggest that an increase average temperature will generate more intense and frequent marine heat waves (Oliver 2019), especially in the Arctic (Frölicher *et al.* 2018). Marine heat waves are mostly documented in ecosystems at lower latitudes, where their effects on biomass and biodiversity have been markedly negative, especially for ectotherms (Wernberg *et al.* 2012, Benthuyssen *et al.* 2018, Smale *et al.* 2019). Therefore it can be expected that, despite ectotherms' capacity to enhance their thermal tolerance to elevated temperatures through physiological plasticity (Schulte *et al.* 2011, Dowd *et al.* 2015, Rohr *et al.* 2018), the combination of both chronic warming and extreme events will likely pose a serious

threat to numerous species (Vasseur *et al.* 2014, Gunderson & Stillman 2015, Stillman 2019).

The Arctic Ocean stands out as an area where warming rates are amongst the fastest on Earth (IPCC 2013), whilst being more likely than other areas to experience more intense and frequent marine heat waves for every degree of warming (Frölicher *et al.* 2018). Currently, the Arctic marine ecosystem shelters an important abundance and biomass of ectotherms, mostly marine invertebrates, who are thought to be particularly vulnerable to ongoing warming, either through direct physiological effects of temperature or indirect ecological effects, e.g. changes in competition levels caused by species migrating from boreal regions (Hirche & Kosobokova 2007, Kjellerup *et al.* 2012). The copepod *Calanus glacialis* (Jaschnov 1955) is broadly distributed in the Arctic Ocean, mostly in the continental shelf areas (Weydmann *et al.* 2016, 2018), and is an important element of biogeochemical processes, notably through its high abundance and reserves of lipid (Falk-Petersen *et al.* 2007, 2009), as well as its diurnal, seasonal, and ontogenetic migrations (Rabindranath *et al.* 2011, Jónasdóttir *et al.* 2015). Hence, *C. glacialis* can be considered as a keystone species in Arctic coastal ecosystems, where heat waves will likely have the greatest impact. Moreover, the tight association of *C. glacialis* with surface waters during the summer months makes it especially exposed to warming and marine heat waves in a crucial period of its life cycle, i.e. breeding and egg production, and reserve building for overwintering diapause (Daase *et al.* 2013). Its vertical and geographical distributions are typically limited to areas where temperature is colder than 5-6 °C (Niehoff & Hirche 2005, Carstensen *et al.* 2012), but the physiological mechanism underlying such observations remain unclear.

Altogether, the aim of our study was to determine whether acclimation to elevated temperature, i.e. ocean warming, provides protection from the negative effect of marine heat waves on *C. glacialis* survival and metabolism. In a lab experiment, we sequentially exposed adult females of *C. glacialis* to chronic warming and a marine heat wave, both in isolation and combined. We determined survival, and in order to assess copepods' metabolic response, we measured their metabolic rates and characterized their

metabolomic profiles at the individual level to account for inter-individual variability (Calosi *et al.* 2013b, Guscelli *et al.* 2019). Metabolic rates were estimated through oxygen consumption rates measurements, which were further investigated through a targeted metabolomics approach focusing on metabolites involved in energy production in order to detect differences in expression of metabolic pathways, and specifically shifts from aerobic to anaerobic metabolism (Hochachka & Somero 2002). We also analyzed free fatty acid and free amino acid concentrations to provide indications on potential changes in protein and lipid metabolism.

Thermal stress triggers different responses in *C. glacialis*, including an increase of metabolic rates in acute exposure to elevated temperatures (Tande 1988, Alcaraz *et al.* 2013), an increase in feeding activity (Grote *et al.* 2015) and the production of heat shock proteins (HSPs) (Voznesensky *et al.* 2004). Therefore, we expect lower survival in groups exposed to elevated temperature, especially in the heat wave conditions both in the control and warm scenario. Metabolic rates are predicted to increase with temperature, and thus an increase in ATP production, up to a given threshold of stress, as a result of increased cellular damages caused by elevated temperatures, such that copepods exposed to heat waves should display higher oxygen consumption rates than their control/warm counterparts. However, if a thermal sensitivity threshold (i.e. *pejus* point, *sensu* Pörtner 2002) is exceeded, the increased energy demand of living under stressful conditions should also be reflected by a shift in an organism's metabolomic profile from mostly aerobic to enhanced anaerobic metabolism. This would in turn result in a reduced efficiency of ATP production, and consequently a reduced yield of ATP, and a higher concentration of anaerobic end-products, such as succinate, aspartate, and lactate (Sokolova *et al.* 2012, Muller *et al.* 2012). Similar responses in all parameters measured in our study between the control and warm scenario would indicate that *C. glacialis* was able to acclimate to the warm conditions, and thus possess sufficient metabolic plasticity to minimize the deleterious effect of climate change, whilst a lack of acclimation capacity in metabolic pathway expression would indicate otherwise.



## MATERIAL AND METHODS

### Specimens collection, transport, and sorting

*Calanus glacialis* adult female specimens were collected in May 2017 in the Kongsfjorden, Svalbard (79.0° N, 11.7° E). Copepods were sampled through vertical tows on 100 m depth with a 1000 µm WP3 circular net of 113 cm diameter opening with a closed cod end (KC Research equipment, Silkeborg, Denmark). This mesh size was used specifically to deal with the high abundance of *Phaeocystis* sp. algae and to prevent the clogging of the net. Sampled zooplankton was then immediately transferred in 25 L containers already filled with sea water collected at 80 m depth and then covered by their lids to prevent any alteration by the outside elements (i.e. sunlight, rain, or snow). Specimens were then transported in their aforementioned containers to Kings Bay Marine Laboratory facility in Ny-Ålesund, Svalbard (78.9° N 11.9 °E), within 2 h and stored in a temperature-controlled room set at 3 °C. Containers were provided gentle aeration until samples were sorted the next day.

To sort out adult female copepods, seawater subsamples were collected in the original buckets and examined under stereomicroscope (MZ6, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), whilst kept on ice the whole time to prevent exposure to higher room temperatures. *Calanus glacialis* females were identified based on the urosome's morphology, and picked using a cut off plastic Pasteur pipette. They were distinguished from *C. finmarchicus* and *C. hyperboreus* by their size (Madsen *et al.* 2001), antenna pigmentation (Nielsen *et al.* 2014), and the lack of lateral spike on the distal end of the prosome. Healthy females were selected and identified by their overall appearance and the presence of hairs on their furca and antennae. We selected over 800 individuals and isolated them in separate 25 L containers gently aerated where they were fed *ad libitum* until they could be transferred in the experimental system within a maximum of 4 d.

## Experimental design, system and protocol

For this experiment, we built two flow-through systems in Kings Bay Marine Laboratory facility in Ny-Ålesund, Svalbard, supplied by water pumped from 80 m depth in the Kongsfjorden. Each system comprised four header tanks of 200 L (one *per* treatment), each feeding eight containers of 5.4 L distributed in two smaller holding tanks of 60 L (four containers *per* holding tank). The containers' lids were sealed with a 300 µm mesh over the opening, thus allowing the water to flow through from bottom to top whilst preventing copepods from escaping. Temperatures were regulated automatically by the computer-controlled water circulation system of the facility, whilst WH treatment was achieved by adding three aquarium heaters (300 W, EHEIM Jager, Deizisau, Germany) to the header tanks.

We exposed a total of 640 female copepods to either or both long-term elevated temperatures mimicking chronic warming (RCP 4.5, IPCC 2013) for 22 d pre-exposure, followed by exposure to short-term acute elevated temperatures mimicking a marine heatwave (+ 5 °C, Hobday *et al.* 2016) for a week exposure. During the pre-exposure period individuals were either exposed to control (C) or warm (W) conditions, and during the following exposure period to either their original C and W condition or to a heat wave conditions. This resulted in four conditions: control (C) at 3 °C, control heat wave (CH) at 9 °C, warm (W) 6 °C, and warm heat wave (WH) at 12.0 °C (Table 1).

At the beginning of the experiment, 10 individuals were randomly selected from the original ~800 healthy females previously sorted from the zooplankton samples and placed in every aquarium. All header tanks started at C temperature, then header tanks assigned to W and WH treatment, one of each in both systems, were heated to increase holding tanks' temperature by 0.1 °C h<sup>-1</sup>, for a maximum of 33 h to reach the W temperature of 6.5 °C, thus starting the pre-exposure period. After 22 d, header tanks assigned to H and WH treatments, one of each in both systems, were heated at a rate between 0.2 and 0.4 °C h<sup>-1</sup> to reach + 5.0 °C from their pre-exposure temperatures, respectively 8.9 and 12.0 °C (Table 1).

Table 1. Experimental parameters measured during pre-exposure to control and chronic warming conditions and during exposure to a marine heat wave. Values are presented as means  $\pm$  standard deviation and  $n$  is the number of observations. The letters indicate significant differences between groups estimated by ANOVA and *post-hoc* comparisons.

Treatment	Pre-Exposure			Exposure		
	Temperature	Salinity	pH	Temperature	Salinity	pH
Control	3.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> <i>n</i> = 358	34.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> <i>n</i> = 72	8.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> <i>n</i> = 86	3.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup> <i>n</i> = 120	33.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> <i>n</i> = 32	8.08 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> <i>n</i> = 36
Heatwave	3.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> <i>n</i> = 354	34.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> <i>n</i> = 70	8.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> <i>n</i> = 88	8.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup> <i>n</i> = 130	33.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> <i>n</i> = 34	8.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> <i>n</i> = 34
Warming	6.0 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup> <i>n</i> = 360	34.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> <i>n</i> = 72	8.10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> <i>n</i> = 88	7.3 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup> <i>n</i> = 120	33.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> <i>n</i> = 32	8.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> <i>n</i> = 36
Warming Heatwave	6.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup> <i>n</i> = 358	34.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> <i>n</i> = 72	8.10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> <i>n</i> = 86	12.0 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup> <i>n</i> = 156	33.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> <i>n</i> = 32	8.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> <i>n</i> = 36

Copepods were fed twice a day with a solution of diatom paste *Thalassiosira weissflogii*, (w 1200, Reed Mariculture, Campbell, CA, USA) to reach a Carbon concentration of  $500 \mu\text{gC L}^{-1}$  for 2 h at a time, until 24 h before the metabolic rate measurements. This was required as copepods experience an increase in metabolic rate after feeding related to digestion, i.e. specific dynamic action, that lasts the same time as the duration of feeding activity (Thor 2000). The set concentration corresponds approximately to the concentration *C. glacialis* feeds at the highest rate, thus optimizing the amount of algae solution used and the amount picked by the copepods (Frost 1972). At the end of the exposure period, the content of the containers was poured into a  $100 \mu\text{m}$  sieve held under water to retrieve the copepods. All individuals were counted for estimates of mortality and transferred to 200 mL bottles filled with filtered sea water (fsw) (Whatman<sup>TM</sup> polycap 36AS  $0,2 \mu\text{m}$ , GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) in preparation for oxygen consumption measurements.

### **Survival**

Survivors were counted during selection of individuals for respirometry, for which a minimum of two individuals *per* container were set aside. Additional individuals, i.e. survivors not selected for oxygen consumption measurements, were one-by-one photographed with a digital camera (DFC320 camera, Leica) mounted on a stereomicroscope (MZ6, Leica) under 1,0 X magnification and immediately put into 1.5 mL microcentrifuge snaplock tube (Axygen®, Corning Inc., Corning, NY, USA) to be flash frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until later transport to the Marine Eco-Evolutionary Physiology (MEEP) Laboratory at the University of Quebec in Rimouski (Rimouski, QC, Canada) in liquid nitrogen inside a dry shipper.

### **Metabolic rate determination**

Metabolic rates were determined by measuring individuals' oxygen consumption using a closed respirometry method (Elliott & Davison 1975, Peck 2016). At the end of the exposure period, individuals of each header tanks were divided in three series of 10 vials. In each series, five or six vials contained a copepod whilst four to five vials were

only filled with *fsw* and served as blanks to account for background bacterial respiration by micro-organisms remaining despite the filtering procedures. The optical oxygen meter (Oxy-10 mini system, PreSens) was calibrated with a 0% and 100% air saturated *fsw* following the fabricant's directives at each header tanks' temperature prior to the copepods' trials. Individuals selected for respirometry were transferred in 1.8 mL borosilicate vials equipped with non-invasive oxygen sensor spots (PSt3 spots, PreSens, Regensburg, Germany), a handmade miniature magnetic stirring rod, and filled with *fsw*. Individuals rested for about 20 min before sealing the vials with Teflon caps, whilst avoiding the formation of air bubbles inside. Once sealed, the vials were placed upside down in a flow-through water bath that was placed on a magnetic stirring plate. Oxygen concentration inside the vials was measured with an optical oxygen meter for 3 min at the beginning of the incubation and every hour for a total of 2 h. At the end of the incubation, copepods were gently removed from their vials to be photographed one-by-one, following the same procedure and equipment described above, transferred in 1,5 mL microcentrifuge snaplock tube (Axygen®).

In total, 10 to 16 copepods were assessed *per* header tank and compared to 10 to 14 methodological blanks. All oxygen consumption rates ( $MO_2$ ) were first calculated with:

$$MO_{2\ total} = \frac{\Delta O_2 \times V_{vial}}{\Delta time} \quad (1)$$

where  $MO_{2\ total}$  is expressed as  $mgO_2\ h^{-1}$  and refers to the total oxygen consumption rate, including the copepods' and bacterial background respiration,  $\Delta O_2$  refers to the difference in oxygen concentration in  $\mu mol\ L^{-1}$ ,  $V_{vial}$  refers to the volume in L of the vial, and  $\Delta time$  refers to the duration on the incubation in h. The copepods' individual oxygen consumption rates were obtained with the following equation:

$$MO_{2\ copepod} = MO_{2\ total} - MO_{2\ blanks} \quad (2)$$

where  $MO_{2\ blanks}$  refers to the average of measurements in the blanks within each series.

Finally, the weight of the copepod was estimated from the prosome length, measured with ImageJ software (National Institutes of Health, USA). The software was calibrated with a reference 3 mm grid photographed with the same microscope and settings as the copepods. Their weight was estimated with the relationship of Madsen *et al.* (2001):

$$We = 4.8L^{3.57} \quad (2)$$

where  $We$  refers to the weight, in  $\mu\text{g}$  of carbon ( $\mu\text{gC}$ ), and  $L$ , to the length in mm.

### **Metabolite extraction and quantification**

Metabolomic profiles of 16 individuals *per* treatment (two individuals *per* aquarium for two aquaria *per* secondary tanks), except for one heat wave where only eight individuals were recovered at the end of experiment, were determined through individual targeted metabolomics analysis. Both individuals who went through the respirometry protocol and individuals who were frozen immediately after sieving the containers were analyzed to confirm that no manipulation effect could be statistically detected. Copepods' weights were also calculated as described above for mass correction of the metabolites' measurements.

Upon arrival at the MEEP Laboratory, all frozen samples were transferred and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until metabolites extraction. Metabolomic profiles were extracted through liquid chromatography and metabolites were identified by mass spectrometry, a method adapted from Lu *et al.* (2006). Briefly, frozen individuals were crushed in microcentrifuge tubes and diluted in 250  $\mu\text{L}$  of an extraction solution of 8:2 solution of methanol and acetate ammonium, respectively. Samples were then vortexed, sonicated and centrifuged at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min at 10 000 RPM. 225  $\mu\text{L}$  of supernatant were then pipetted into an injection glass vial, which was then stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analyses no more than 2 d later. Four methodological blanks were included in the samples, one for each day of procedures.

Metabolites were first separated by liquid chromatography (LC) performed on an Accela LC system (Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, MA, USA) equipped with a silica column (Luna C18, Phenomenex, Torrance, CA, USA). LC procedures were

followed the identification phase of high-resolution mass spectrometry (HRMS) performed with a mass spectrometer (Orbitrap LTQ Discovery, Thermo Fisher Scientific inc.), using both positive and negative electrospray ionization mode. Resulting signals were processed with Xcalibur software 2.0 (Thermo Fisher Scientific inc.) with 10 ppm mass tolerance and data were converted to  $\text{ng mL}^{-1}$  through comparison with standard curves obtained from standard solutions processing: method details are covered in Vermandele (2019).

## **Statistical analyses**

### *Survival probability*

Differences in survival probability among treatments were tested using a generalized linear model (GLM) following a binomial distribution, considering the factors ‘pre-exposure’ (C vs W) and ‘exposure’ (C/W vs CH/WH respectively). Because of a leak detected only at the end of the experiment, eight aquaria from the C header tank in system 2 had to be discarded from the survival analysis due to the risk of loss of copepods, which would have represented an important bias in survivorship assessment. The GLM model did not display overdispersion, according to GLM assumptions for a binomial distribution (ratio deviance/residuals;  $p = 0.47$ ). A linear model (LM) was employed to assure similar body masses among treatments ( $F_{3,180} = 0.835$ ;  $p = 0.477$ ). All analyses were conducted in R 3.4.1 (R Core Team 2018).

### *Metabolic rates*

Metabolic rates were compared among treatments with an LM with the same factors as for survival and using individual body mass as a covariate. There were no differences in body mass among treatments (LM;  $F_{3,58} = 0.299$ ;  $p = 0.826$ ). Normality and homoscedasticity of residuals were tested with a Shapiro-Wilk test ( $p = 0.34$ ) and a Levene test ( $F_{3,58} = 3.41$ ;  $p = 0.02$ ) respectively, followed by a visual assessment of residuals’ dispersion using a Q-Qplot and a residuals vs fitted residuals plot, neither of

which showed any notable discrepancy. Metabolic rate statistical tests were also performed using R 3.4.1 (R Core Team 2018).

### *Metabolomic analyses*

All samples were blank corrected and the resulting concentration matrix was then filtered using web-server MetImp 1.2 (Wei *et al.* 2018b), to remove metabolites missing more than 30% values (assessed globally), which left 34 metabolites out of the original 58 targeted (Table 2). Since the missing values (MV) associated with LC-MS are typically not at random (Wei *et al.* 2018b), the remaining MV were imputed using the GSimp algorithm, seed 1234 (Wei *et al.* 2018a). The decision to deviate from the typical “80 % rule” was supported by the increased number of metabolites remaining after filtering, 34 metabolites at 70 % *versus* 31 at 80 %, and by the accuracy of imputation method, according to the type of MV (Wei *et al.* 2018a).

The new data matrix was then uploaded to MetaboAnalyst 4.0 (Chong *et al.* 2018) for further statistical analyses. Concentrations were standardized by individual Carbon mass (in  $\mu\text{gC}$ ), measured the same way as for metabolic rate determination, log-normalized to limit heteroscedasticity between metabolites, and pareto-scaled to center concentrations while minimizing the effect of extreme values (van den Berg *et al.* 2006). Data showed multivariate normality and homoscedasticity with a few exceptions according to Shapiro-Wilk’s test (ATP and Hydroxyproline  $p = 0.004$ , Phospho-L-Arginine  $p = 0.044$ , NAD, Fumarate, and Capric acid  $p < 0.001$ , and Elaidic acid  $p = 0.012$ ) and to Levene’s test (Glucose  $p = 0.045$  and Methionine  $p = 0.04$ ). The four treatments, C, W, CH, and WH, were considered as groups for the statistical comparisons on MetaboAnalyst.

First, univariate analyses were run to detect significantly changing metabolites and their correlative patterns. An ANOVA followed by Tukey’s Honest Significant Difference (HSD) post-hoc test allowed to find significant metabolites and to compare their concentrations among groups. Correlation patterns among metabolites were



determined using ‘Pearson’s  $r$ ’ metric, with special consideration for significant metabolites from the ANOVA.

Then, multivariate analyses were run to explore trends in the data and clustering of the four groups. Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) was first run as an exploratory procedure, followed by supervised Partial Least Square – Discriminant Analysis (PLS-DA) to further identify relevant metabolites to predict group membership (Worley & Powers 2013). Metabolites with discriminative power were assessed based on their Variable Importance in Projection score (VIP) and overall PLS-DA models’ performance was assessed by their ‘Accuracy during training’ in the permutation test (2000 permutations; Worley & Powers 2016). Metabolites were then assembled in a heatmap through hierarchical clustering using the ‘Pearson’ distance measure, ‘Complete linkage’ clustering algorithm, and ‘Autoscale features’ standardization.

Quantitative Enrichment Analysis (QEA) was performed on MetaboAnalyst to detect significantly enriched pathways, using normalized data submatrices to compare two groups at time. To avoid type II errors from multiple comparisons, the significance threshold for identified pathways was adjusted following the Bonferroni method: for six comparisons, the cut-off was set at 0.0083. Finally, Metabolic Pathway Analysis (metPA) was run to investigate the most important pathways according to Enrichment Analysis, using ‘Globaltest’ method, and Pathway Topology Analysis, using ‘Out-Degree Centrality’. The selected reference system for metPA was the fruit fly *Drosophila melanogaster*, as it was the only arthropod (i.e. pancrustacea) available as reference and considering that most of our targeted metabolites are highly conserved across taxa (Peregrín-Alvarez *et al.* 2009, Viant *et al.* 2017), significance threshold was also set at 0.0083 for raw p-values and at 0.1 for impact.

Table 2. List of detected and selected compounds for metabolomics analyses on the Arctic copepod *Calanus glacialis* adult females based on percentage of detection.

Compounds (selected)	% detection	Compounds (not selected)	% detection
a-Aminoadipic acid	100	Caprylic acid	69
a-aminobutyric+b-aminoisobutyric_acid	100	Arachidonic acid	59
a-Glycerophosphate	100	8-Oxo-2-deoxyguanosine	53
a-ketoglutaric_acid	100	Stearic acid	52
Alanine	100	Eicosenoic acid	50
Aspartate	100	Ginkgoic acid	48
Betaine	100	Pyruvate	41
Docosahexaenoic acid	100	Lauric acid	36
Eicosapentaenoic acid	100	Erucic acid	33
Elaidic acid	100	8-hydroxyguanine	21
Glucose	100	Cystine	21
Hydroxyproline	100	Ginkgolic acid	19
Linolelaidic acid	100	Linolenic acid	10
Malate	100	Lactate	7
Methionine	100	NADPH	7
NAD	100	Pentadecylic acid	7
Palmitoleic acid	100	Arachidic acid	5
Sarcosine	100	Eicosadienoic acid	5
Succinate	100	Nervonic acid	3
Threonine	100	Docosadienoic acid	2
AMP	98	Mead acid	2
Fumarate	98	Lignoceric acid	0
Glutamate	98		
Palmitic acid	98		
Margaric acid	97		
Tyrosine	97		
ADP	95		
Valine	95		
Proline	93		
Capric acid	90		
Serine	81		
ATP	78		
Phospho-L-Arginine	72		
Undecylic acid	71		

## RESULTS

### Survival

Mean survival at the end of the experiment was 53.75 % in the control, 35 % in the warming scenario, 28.75 % in the control heat wave, and 14.38 % in the warm heat wave. Probability of survival was significantly higher in the control group when compared to the warming group ( $z_{1,557} = -4.132$ ;  $df = 557$ ;  $p < 0.001$ ), and lower under control heat wave conditions when compared to pre-exposure conditions (control heat wave *vs* control and warming heat wave *vs* warming;  $z_{1,557} = -5.593$ ;  $p < 0.001$ ) (Figure 6).

### Metabolic rates

*C. glacialis* mean metabolic rates, measured as oxygen consumption rates ( $MO_2$ ) at the end of the experiment, were highest ( $0.064 \pm 0.007 \text{ mgO}_2 \mu\text{gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) in individuals from the control condition and lowest ( $0.014 \pm 0.005 \text{ mgO}_2 \mu\text{gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) in the ones from warming condition ( $p < 0.05$ ; Figure 7). In addition, the  $MO_2$  response to a heat wave differed between pre-exposures ( $F_{1,55} = 15.724$ ;  $p < 0.001$ ; Table 3). Specifically,  $MO_2$  decreased significantly in copepods which were subjected to the control heat wave compared to the control condition ( $p < 0.05$ ), but  $MO_2$  levels were comparable between the warming and warming heat wave scenarios.

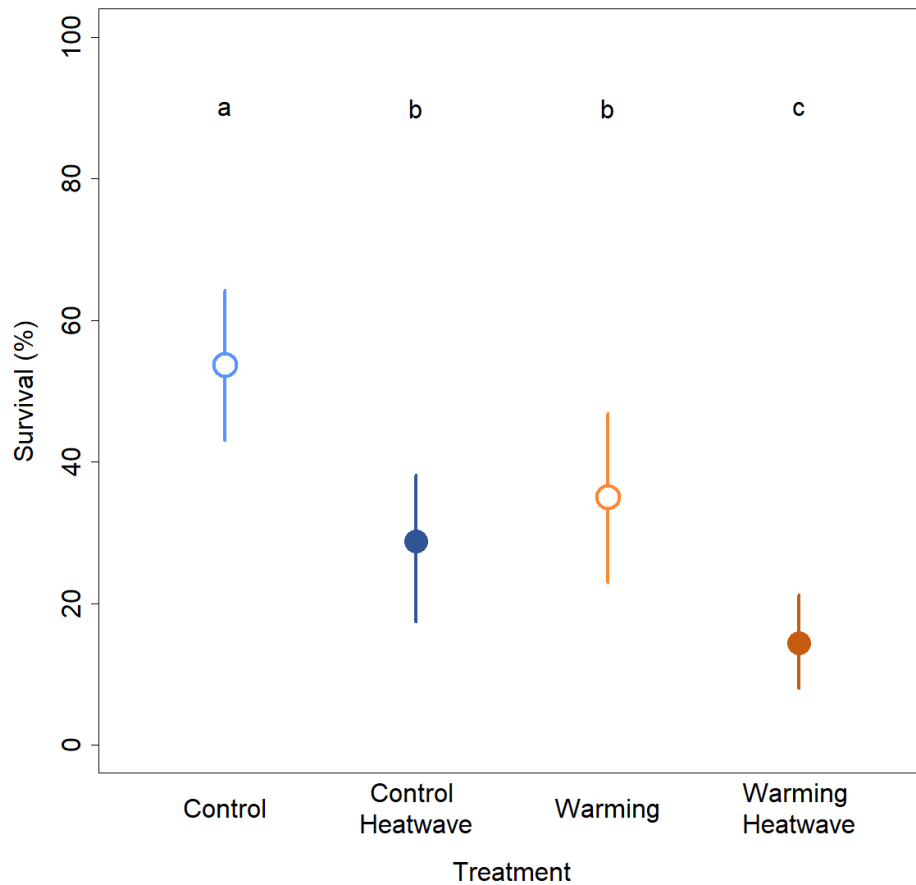


Figure 6. The effect of exposure to a heat wave (+ 5°C) and chronic warming (+ 3°C) in isolation and combined on the survival of adult females of the Arctic copepod *Calanus glacialis*. Dots represent mean percentage of survival and vertical lines the 95% confidence interval calculated *via* bootstrap procedures. Empty dots represent chronic conditions and full dots represent heatwaves conditions, whilst control scenarios are given in blue and chronic warming scenarios are given in orange. The letters indicate significant differences in Tukey *post-hoc* comparisons.

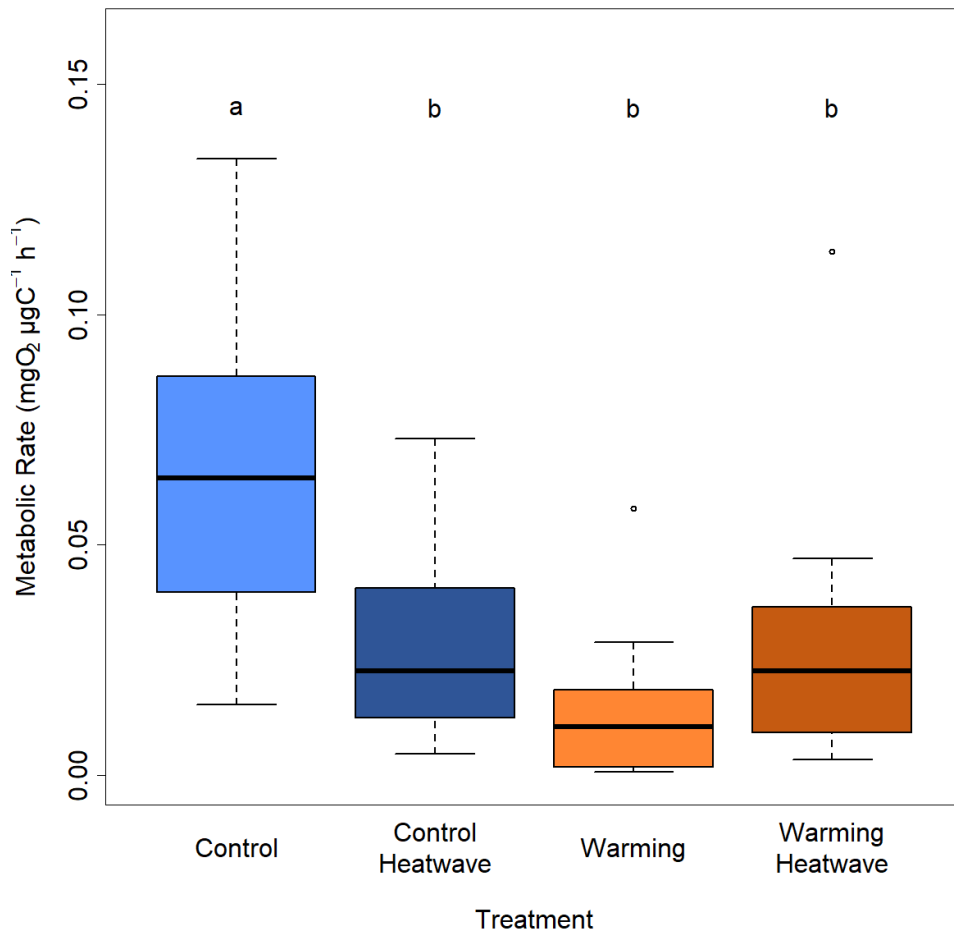


Figure 7. The effect of exposure to a heat wave (+ 5 °C) and chronic warming (+ 3 °C) in isolation and combined on the mean metabolic rate ( $\text{mg O}_2 \cdot \mu\text{g C}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) of adult females of *C. glacialis*. Results from the Control condition are blue – light shade, from the Heat wave are blue – dark shade, from the Warm are orange – light shade and from the Warm Heat wave are orange – dark shade. The letters indicate significant differences in Tukey *post-hoc* comparisons.

Table 3. Results of two-way ANOVA on metabolic rates measured in females *C. glacialis* at the end of the experiment. Individuals were pre-exposed to control or warming conditions, followed by the exposure period where they were either maintained in their pre-exposure conditions or exposed to a heat wave.

<b>Factors</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
pre-exposure	1	0.007599	0.0075988	11.765	0.001
exposure	1	0.005666	0.0056662	8.773	0.004
pre-exposure:exposure	1	0.009227	0.0092275	14.287	0.0004
Residuals	55	0.037461	0.0006459		

## Metabolomic profiles

Six metabolites displayed significantly different concentrations amongst treatments (Figure 8), namely Undecylic acid, ATP, Aspartate,  $\alpha$ -Glycerophosphate, Capric acid, and Phospho-L-Arginine (Table 4). The control and warming heat wave groups showed the most differences amongst these metabolites. More specifically, ATP and Phospho-L-Arginine were higher in the control, while Undecylic acid,  $\alpha$ -Glycerophosphate and Capric acid were detected in higher concentrations in copepods exposed to warm heat wave conditions. The warming and warm heat wave individuals displayed a similar pattern, excepted for Phospho-L-Arginine which was found to differ significantly between the two treatments. Finally, control and control heat wave treatments differed significantly in terms of ATP and Aspartate concentration, these compounds being higher in control individuals. See *Supplementary Materials* for correlation patterns between metabolites.

Metabolite profiles of individuals from different treatments did not display notable differentiation following the PCA analysis, although the first two PCs cumulated 45.4 % of explained variance (PC 1 32.2 % and PC 2 13.2 %, results not shown). PLS-DA revealed more discernible groups, where the control and warm heat wave groups did not overlap on the first axis, whereas W and H groups displayed intermediate distribution (Figure 9A). The first two components of PLS-DA explained 13.3 % (PC1) and 12.6 % (PC2) of variance. The results from the permutation test confirmed the model was valid ( $p < 0.001$ ), and although cross-validation suggested the best model included up to four PCs, the similarity between them was judged sufficient to interpret only PC1 and PC2 (Figure 9B and C). All six metabolites identified in the univariate analysis (see above) scored higher than 1.2 in Variable Importance in Projection (VIP), the five most important being ATP and Phospho-L-Arginine (highest to lowest: C – W – CH – WH), Undecylic acid and Capric acid (WH – CH – W – C), and  $\alpha$ -Glycerophosphate (WH – W – CH – C).

Table 4. Significant metabolites (log normalized concentrations) detected by ANOVA in adult females of *C. glacialis* exposed to control, heatwave, chronic warming, or warm heatwave conditions, provided by MetaboAnalyst 4.0.

<b>Compounds</b>	<b>df</b>	<b>F value</b>	<b>p value</b>
Undecylic acid	54	8.05	< 0.01
ATP	54	5.99	< 0.01
Aspartate	54	5.98	< 0.01
a-Glycerophosphate	54	5.85	< 0.01
Capric acid	54	5.80	< 0.01
Phospho-L-Arginine	54	4.47	0.01



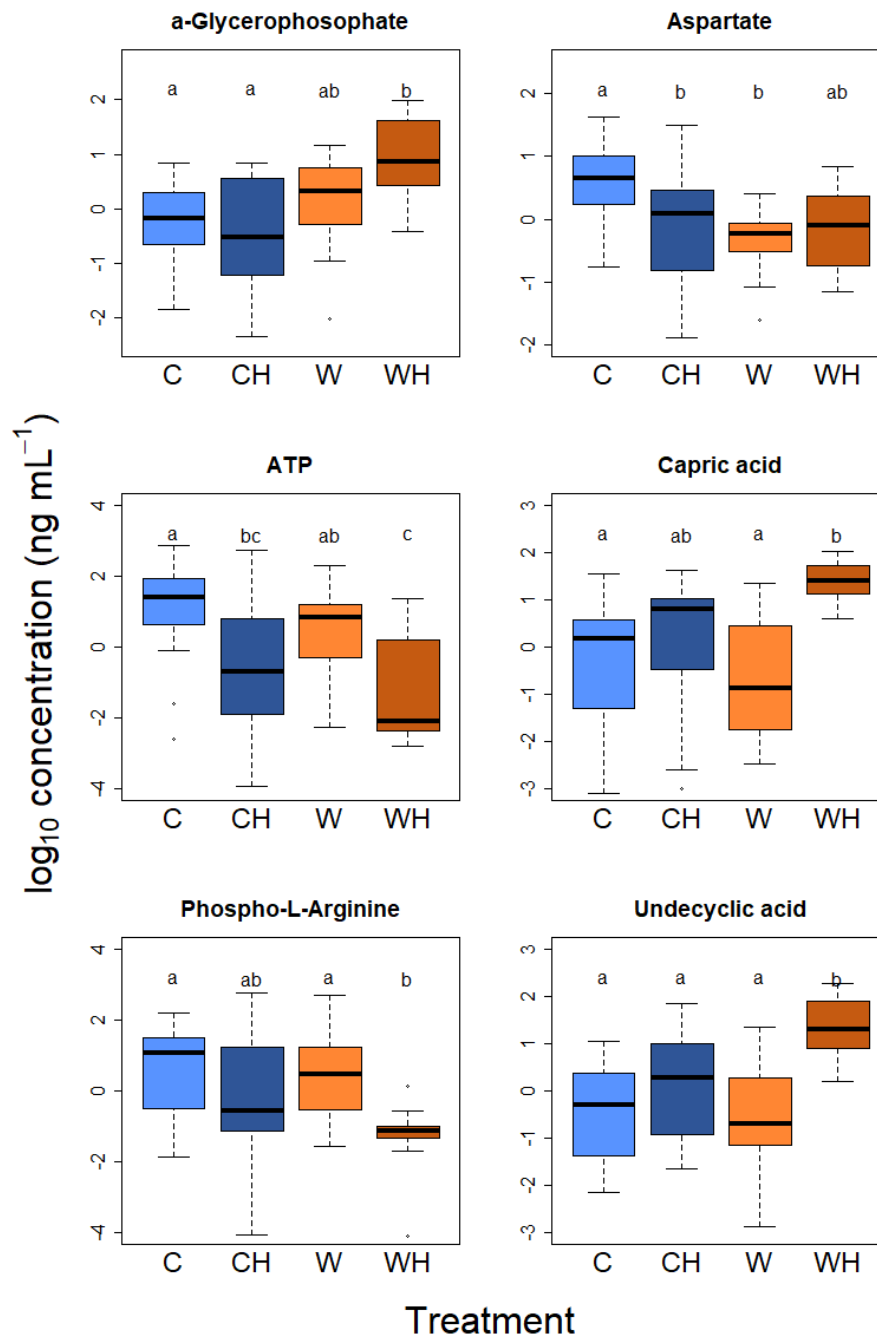


Figure 8. The effect of exposure to a heat wave (+ 5 °C) and chronic warming (+ 3 °C) in isolation and combined on log concentration (ng mL<sup>-1</sup>) of metabolites in *C. glacialis* adult females. Experimental treatments were defined as control (C), control heat wave (CH), warming (W), and warm heat wave (WH). Results from the control scenario are in blue (light shade is for control and dark shade is for the heat wave condition), and the results from the warming scenario are in orange (light shade is for warming alone, dark shade is for the warm heat wave condition).

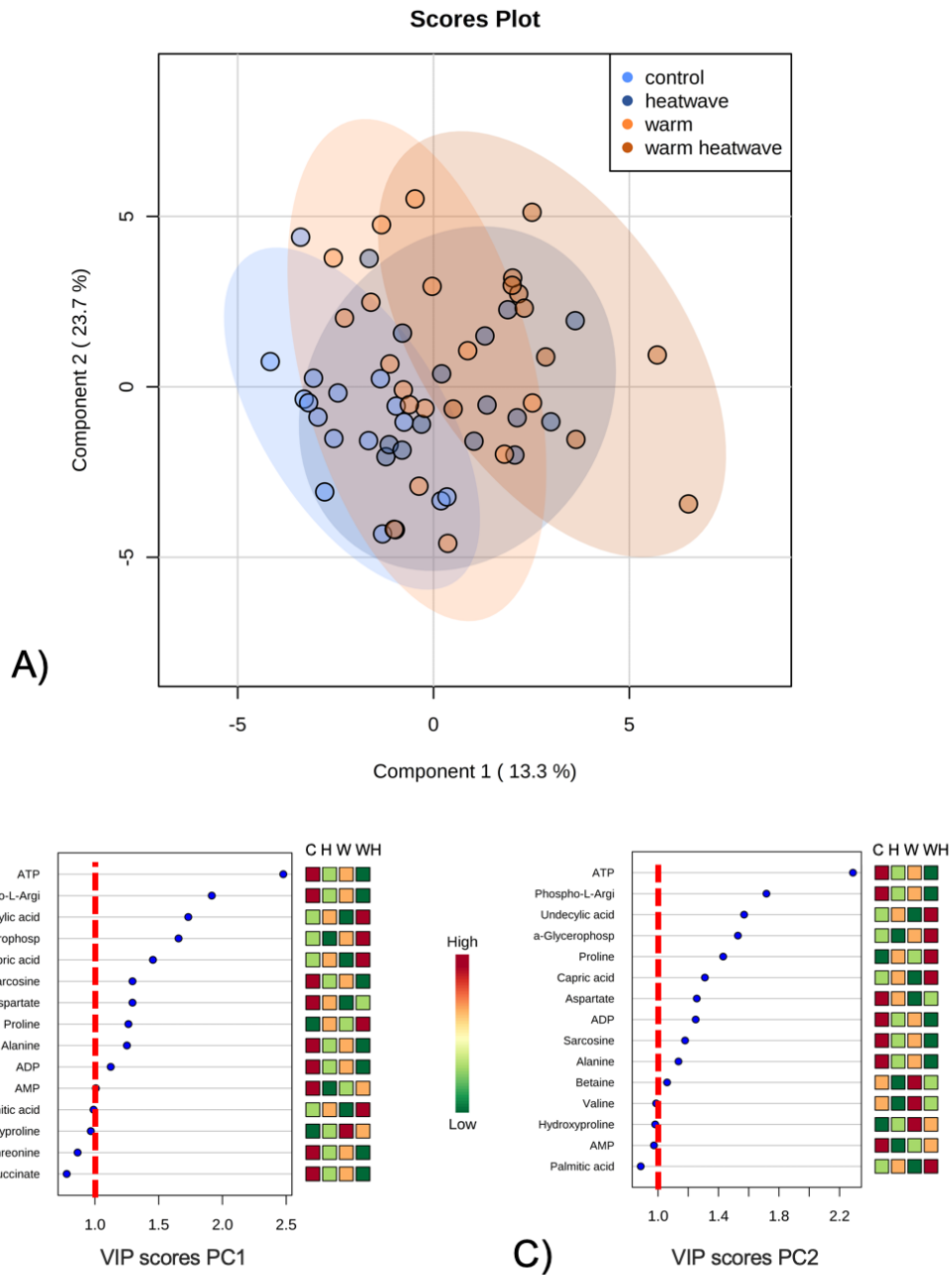


Figure 9. Multivariate analysis of metabolites based on  $\text{Log}_{10}$  normalized concentrations in adult females of *C. glacialis*, (A) showing PLS-DA score plot for the first two principal components and (B, C) showing variable importance in projection (VIP) scores, also for the first two principal components. Color legend is the same as in Figure 8, acronyms are the same as in the text.

Hierarchical clustering of the groups formed two distinct clusters, one containing both long-term treatments (C and W), while the second included the two heatwave conditions (H and WH) (Figure 10). Control and warm heat wave groups displayed almost perfectly opposite expression profiles, while the warming group resembled the control group but at a lower intensity, as did the control heat wave group compared to the warm heat wave. When considering the top 15 important features determined by ANOVA, energy related molecules, such as ATP and Succinate were found in highest concentrations in the control group, closely followed by the warming group, while molecules related to the turnover of energy, such as ADP, AMP and Aspartate were lower in the warming than in the control group. In contrast, the warm heat wave group displayed the highest concentrations of free short-chain fatty acids, such as Capric acid and Undecylic acid, both also slightly over-expressed in the control heat wave group. Interestingly,  $\alpha$ -Glycerophosphate was slightly over-expressed in the warming group, and even more so in the warm heat wave group, while it remained at low levels in both control and control heat wave.

Based on the compiled metabolites profiles, a total of 67 pathways differed in expression between the control and warm heat wave individuals (Table 5), including 26 also different between the control and control heat wave individuals and seven between the warming and warm heat wave individuals. No significant difference was detected between the control and warming groups. Amongst the variety of represented pathways, we could distinguish a few broad categories such as mitochondria related energy metabolism, lipid metabolism, as well as amino acid and ammonia metabolism. The first category includes for instance mitochondrial beta-oxidation of long-, medium-, and short-chain fatty acids, all different in C-WH and W-WH comparisons. Mitochondrial electron transport chain and the citric acid cycle, both apparently more active in C individuals than in WH individuals. Relevant pathways from general lipid metabolism included: (i) fatty acid metabolism, which differed in C-H, in C-WH and in W-WH comparisons; (ii) glycerolipid metabolism, differing in C-WH and W-WH comparisons; (iii) steroid biosynthesis, different in both C-HW and W-WH comparisons; (iv) fatty acid

biosynthesis, different in both C-WH and W-WH comparisons; (v) phospholipid biosynthesis, different between C-WH groups. Nitrogen related pathways involved various amino acids, most notably Arginine and Proline metabolism in C-WH and C-H comparisons; Glutamate metabolism in C-WH and C-H comparisons; Aspartate metabolism in C-WH and C-H comparisons; in addition to disturbance of the urea cycle in C-WH and C-H comparisons.

The metabolic pathway analysis combines information from the level of significance of the representation of the different pathways with the information on impact of the metabolites according to their position in these pathways and their related network. Because many of the significant metabolites were not central to pathways using the *Drosophila* system library, very few pathways were reported as impacted by changes in metabolites' concentrations. Only the Arginine and Proline metabolism pathway differed in the comparison between C-WH (Figure 11, raw  $p = 0.0006$ , impact = 0.262).

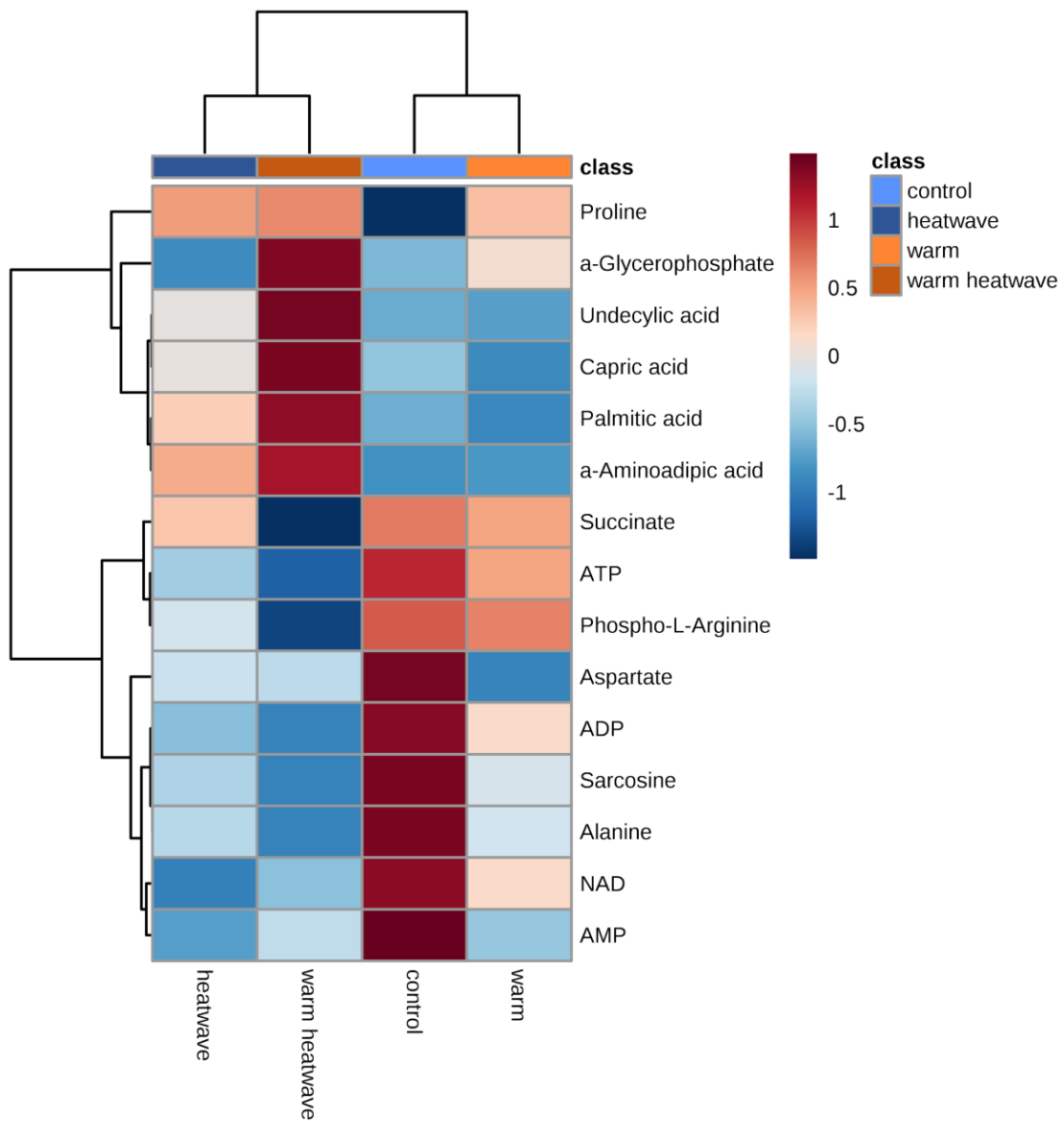


Figure 10. Heatmap and hierarchical clustering provided by MetbaoAnalyst 4.0 of relative  $\text{Log}_{10}$  normalized concentrations ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) in the top 15 metabolites, as detected by ANOVA in adult females of *C. glacialis*, by experimental conditions (i.e. control, chronic warming, control heat wave, combined warm heat wave) according to Pearson's  $r$  distance measurement. Treatments are summarized here as 'class', color legend is the same as in Figure 9.

Table 5. List of significant pathways detected by Quantitative Enrichment Analysis (QEA) in adult females of *C. glacialis* exposed to control (C), heat wave (H), chronic warming (W), or warm heat wave (WH). There was no significant difference between control and warming groups.

Pathways	Total Cmpd	Hits	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison
Butyrate Metabolism	19	4	0.0034825	C-H	-	-	0.00037551	C-WH
Phenylacetate Metabolism	9	2	0.0045478	C-H	-	-	0.00040203	C-WH
Aspartate Metabolism	35	6	0.0078116	C-H	-	-	0.00041226	C-WH
Ethanol Degradation	19	3	0.0033108	C-H	-	-	0.00060169	C-WH
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	3	0.0033108	C-H	-	-	0.00060169	C-WH
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	3	0.0033108	C-H	-	-	0.00060169	C-WH
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	3	0.0033108	C-H	-	-	0.00060169	C-WH
Tryptophan Metabolism	60	5	0.0082284	C-H	-	-	0.00076968	C-WH
Pantothenate and CoA Biosynthesis	21	3	0.0071723	C-H	-	-	0.0008814	C-WH
Pentose Phosphate Pathway	29	3	0.0071723	C-H	-	-	0.0008814	C-WH
Riboflavin Metabolism	20	3	0.0071723	C-H	-	-	0.0008814	C-WH
Thiamine Metabolism	9	3	0.0071723	C-H	-	-	0.0008814	C-WH
Arginine and Proline Metabolism	53	10	0.0040796	C-H	-	-	0.00088285	C-WH
Pyruvate Metabolism	48	5	0.0066906	C-H	-	-	0.00096894	C-WH
Purine Metabolism	74	7	0.0050787	C-H	-	-	0.001001	C-WH
Fructose and Mannose Degradation	32	3	0.0083106	C-H	-	-	0.0010423	C-WH
Inositol Metabolism	33	3	0.0083106	C-H	-	-	0.0010423	C-WH

Pathways	Total Cmpd	Hits	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison
Inositol Phosphate Metabolism	26	3	0.0083106	C-H	-	-	0.0010423	C-WH
Nucleotide Sugars Metabolism	20	3	0.0083106	C-H	-	-	0.0010423	C-WH
Starch and Sucrose Metabolism	31	3	0.0083106	C-H	-	-	0.0010423	C-WH
Histidine Metabolism	43	5	0.0073181	C-H	-	-	0.0013553	C-WH
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	5	0.0073181	C-H	-	-	0.0013553	C-WH
Glutamate Metabolism	49	9	0.0057727	C-H	-	-	0.0013741	C-WH
Urea Cycle	29	9	0.0057905	C-H	-	-	0.0019772	C-WH
Selenoamino Acid Metabolism	28	6	0.0080595	C-H	-	-	0.0028777	C-WH
Fatty acid Metabolism	43	4	0.0040635	C-H	0.0025298	W-WH	0.000097812	C-WH
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	3	-	-	0.00015958	W-WH	0.000018727	C-WH
Glycerolipid Metabolism	25	5	-	-	0.0023386	W-WH	0.000088792	C-WH
Steroid Biosynthesis	48	3	-	-	0.0025304	W-WH	0.00015882	C-WH
Fatty Acid Biosynthesis	35	2	-	-	0.0000049897	W-WH	0.00016302	C-WH
Bile Acid Biosynthesis	65	4	-	-	0.0040324	W-WH	0.00022575	C-WH
Biotin Metabolism	8	1	-	-	0.004766	W-WH	0.00057866	C-WH
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	2	-	-	0.0061396	W-WH	0.00074543	C-WH
Mitochondrial Electron Transport Chain	19	6	-	-	-	-	0.00033792	C-WH
Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	4	-	-	-	-	0.00065279	C-WH
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	2	-	-	-	-	0.0008472	C-WH

Pathways	Total Cmpd	Hits	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison
Phosphatidylinositol Phosphate Metabolism	17	2	-	-	-	-	0.0008472	C-WH
Pyrimidine Metabolism	59	2	-	-	-	-	0.0008472	C-WH
Sulfate/Sulfite Metabolism	22	2	-	-	-	-	0.0008472	C-WH
Trehalose Degradation	11	2	-	-	-	-	0.0008472	C-WH
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	5	-	-	-	-	0.00085279	C-WH
Amino Sugar Metabolism	33	3	-	-	-	-	0.00088531	<b>C-WH</b>
Citric Acid Cycle	32	7	-	-	-	-	0.00098623	C-WH
Lactose Degradation	9	3	-	-	-	-	0.0010173	C-WH
Lactose Synthesis	20	3	-	-	-	-	0.0010173	C-WH
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	5	-	-	-	-	0.0010689	C-WH
Glutathione Metabolism	21	4	-	-	-	-	0.0010751	C-WH
Folate Metabolism	29	4	-	-	-	-	0.001115	C-WH
Galactose Metabolism	38	4	-	-	-	-	0.0012329	C-WH
Glycolysis	25	4	-	-	-	-	0.0012329	C-WH
Warburg Effect	58	9	-	-	-	-	0.0013362	C-WH
Threonine and 2-Oxobutanoate Degradation	20	4	-	-	-	-	0.0014192	C-WH
Gluconeogenesis	35	5	-	-	-	-	0.001537	C-WH
Cysteine Metabolism	26	6	-	-	-	-	0.0016635	C-WH
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	28	6	-	-	-	-	0.0020633	C-WH



Pathways	Total Cmpd	Hits	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison	Raw p	Comparison
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis	12	3	-	-	-	-	0.0020693	C-WH
Ammonia Recycling	32	8	-	-	-	-	0.0020784	C-WH
Alanine Metabolism	17	6	-	-	-	-	0.0023123	C-WH
Sphingolipid Metabolism	40	4	-	-	-	-	0.0025037	C-WH
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	7	-	-	-	-	0.0033133	C-WH
Cardiolipin Biosynthesis	11	2	-	-	-	-	0.0035409	C-WH
De Novo Triacylglycerol Biosynthesis	9	2	-	-	-	-	0.0035409	C-WH
Glycerol Phosphate Shuttle	11	2	-	-	-	-	0.0035409	C-WH
Phospholipid Biosynthesis	29	2	-	-	-	-	0.0035409	C-WH
Fatty Acid Elongation In Mitochondria	35	2	-	-	-	-	0.0052787	C-WH
Betaine Metabolism	21	4	-	-	-	-	0.0055254	C-WH
Propanoate Metabolism	42	7	-	-	-	-	0.0067165	C-WH

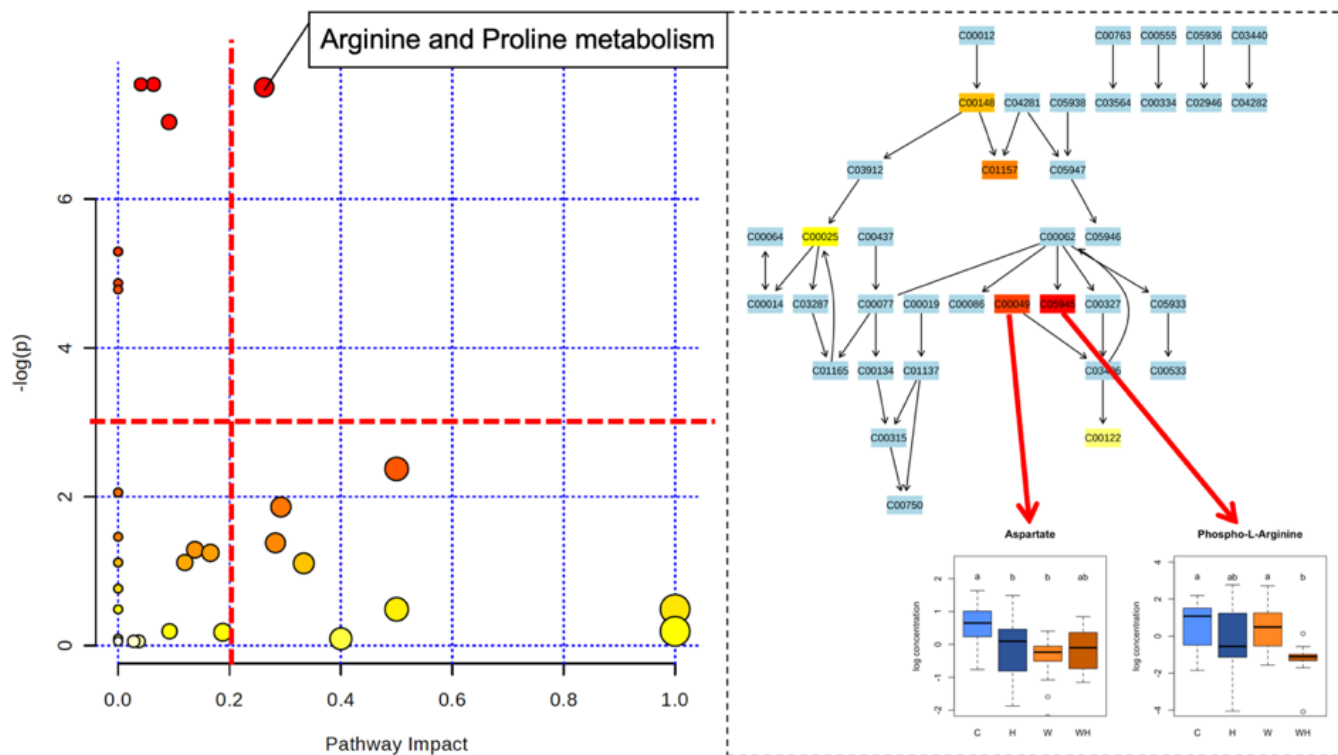


Figure 11. Metabolic Pathway Analysis result for the comparison between adult females of *C. glacialis* exposed to control and warm heat wave conditions, using the *Drosophila melanogaster* metabolome library and ‘out degree centrality’ parameter. The significant pathway is illustrated on the right-hand side, with significant feature boxplot. Numbers in the right refer to KEGG ID of the metabolites involved in the represented pathway. The red dotted lines delimit the important section of the left-hand figure and the shades yellow to red indicate levels of significance of either a pathway (left-hand figure) or the metabolite (right-hand figure)

## DISCUSSION

Our study shows that acclimation to chronic warming provides no protection to adult females of the Arctic copepod *Calanus glacialis* from the negative impacts of marine heat waves. In fact, the combined exposure to chronic warming and heat wave exerts the greatest negative effects observed overall. In addition, through metabolomic profiling, we report evidence for a temperature-induced metabolic depression in copepods exposed to chronic warming, a metabolic condition which appears to impair their capacity to face marine heat waves. Considering the keystone position of *C. glacialis* in the Arctic marine shelf system (Arnkvaern *et al.* 2005, Bandara *et al.* 2016), our results foretell important negative consequences under predicted climate change trends in this ecosystem.

### Survival

The survival of *C. glacialis* is reduced by 19 % under chronic warming (6.5 °C) compared to control conditions, which is at a temperature already experienced by a few populations in surface water masses (Niehoff & Hirche 2005, Rabindranath *et al.* 2011, Weydmann *et al.* 2016). This result is consistent with the observations of adult individuals of *C. glacialis* avoiding temperature higher than 5 °C by migrating, usually downward, towards cooler water masses (Niehoff & Hirche 2005, Rabindranath *et al.* 2011), and confirms their physiological sensitivity to elevated temperatures (Tande 1988, Alcaraz *et al.* 2013). Survival of calanoid copepods during experiments seems to vary considerably across life stages (Garzke *et al.* 2015) and experiments (Hildebrandt *et al.* 2014). Our results yield somewhat low control survival percentage, but the effect of elevated temperature is evident, as it was reported for other calanoid copepods (Garzke *et al.* 2015).

Likewise, exposure to control heat wave and warming heat wave conditions caused a survival reduction of 25 and 40-% compared to the control condition, respectively. Exposure to the control heat wave resulted in similar survival probability to that observed under the

chronic warming condition despite the marked difference in duration of exposure between these two: one vs four weeks, respectively. Overall, the exposure to combined chronic warming and heat wave conditions resulted in the lowest survival probability. Interestingly, the difference in survivorship under chronic warming and warming heat wave condition was slightly lower than an additive model with chronic warming suggesting that chronic and acute thermal stress together may act in an antagonistic but positive way: 44 % vs 40 % reduction in survival probability in the control scenario and the warming scenario, respectively (Côté *et al.* 2016).

### **Metabolic rates**

Mean metabolic rates were negatively affected by chronic warming and heat waves, both in isolation and combined. Exposure to elevated temperatures induced very low metabolic rates, which is in contradiction with previous measurements in *C. glacialis* (Tande 1988, Alcaraz *et al.* 2013) and the commonly accepted idea that elevated temperatures trigger an acceleration of biochemical rates (Gillooly *et al.* 2001, Brown *et al.* 2004; but see *pejus* point concept by Pörtner 2002). However, previous data of *C. glacialis*'s metabolic rates were obtained using group measurements, up to three indiv. in Tande (1988), undescribed in Alcaraz *et al.* (2013). Differently, we conducted individual measurements to avoid the confounding effect of density and interactions among individuals within respirometric chambers (MacDonald 1988) and to take into account inter-individual variability (Calosi *et al.* 2013b, Guscelli *et al.* 2019). Moreover, our exposure period to elevated temperatures lasted four weeks before metabolic rates were determined, in order to guarantee individuals had the opportunity to physiologically acclimate to the exposure conditions (Mayzaud *et al.* 1992, Rohr *et al.* 2018). For instance, *C. hyperboreus* adult females exposed to both ocean acidification and elevated temperature displayed very high metabolic rates in the first three days of experiment, before reverting to rates similar to those measured under control conditions (Hildebrandt *et al.* 2014).

Nonetheless, the metabolic depression we report in our study appears to support the hypothesis for temperature-induced dormancy in *C. glacialis* females, which was suggested based on the synchrony between increasing surface temperature and downward migration of adult females to undergo diapause in the White Sea (Kosobokova 1999), and the complete stop of gonadal and egg development in adult females from the Lurefjord (Norway) sampled at 5 °C and warmer (Niehoff & Hirche 2005). The metabolic rates' response a heat wave appears different in terms of processes, but similar in terms of outcomes. Indeed, mean metabolic rates in individuals exposed to chronic warming were 78 % lower when compared to those of individuals from the control condition, a reduction that can be classified as metabolic depression (Guppy & Withers 1999, Reipschläger *et al.* 1998), whilst under heat wave and warm heat wave conditions metabolic rates reduction was of 56 and 48 %, respectively. No difference among mean metabolic rates for warming, control heat wave and warm heat wave was found. Considering our survival results, the metabolic response of *C. glacialis* to temperature appears to be modulated by the duration of exposure, and involves more profound mechanisms better investigated through the copepods' metabolomic profiles (Bundy *et al.* 2009).

#### Metabolomic profiles

Despite exposure to very different temperatures, individuals from the four conditions displayed quite similar metabolic profiles, where only six of the original thirty-four metabolites differed between treatments. Whilst the metabolomics approach we employed specifically targeted compounds involved in the aerobic and anaerobic metabolism to provide a cellular mechanistic understanding of changes in metabolic rates (Hochachka & Somero 2002), the subtle differences in metabolites' concentrations between individuals from the four experimental conditions also hint to other pathways involved in the observed metabolic depression.

Pathways related to ammonia metabolism were mostly impacted when comparing control and heat wave individuals, whilst lipid metabolism appeared to differ between chronic warming and warm heat wave individuals. Most differences were however observed between control and warm heat wave individuals, which included all the pathways detected in the other comparisons in addition to other pathways from similar metabolic processes. Interestingly, control and chronic warming individuals did not show any differences in pathway expression, despite the marked metabolic depression we observed under chronic warming. This may suggest that the metabolic depression induced by warming is intricate to *C. glacialis*'s life strategy by limiting cellular damages caused by temperature whilst providing internal cues for seasonal migrations (Varpe 2017). Moreover, the two heat wave conditions did not differ either, although their response appears modulated by their respective chronic condition. This result highlights the distinctive response of *C. glacialis* to longer *versus* shorter term thermal stress and the influence of chronic conditions on the species capacity to cope with additional alterations to their environment. The intensity of the metabolic depression coupled with the dissimilar underlying pathway expression patterns recall the different phenomena resulting in dormancy from exposure to elevated temperature (Hand & Podrabsky 2000, Baumgartner & Tarrant 2017).

Dormancy is a state of reduced metabolic activity, which can be either facultative, i.e. quiescence, or obligatory and controlled, i.e. diapause (Hand & Podrabsky 2000). Distinctive characteristics between quiescence and diapause rely on the metabolic state of organisms, which includes higher aerobic metabolic rate and level of activity of basal energy-consuming pathways during quiescence (Hand & Podrabsky 2000). The lack of differences in metabolomic profiles between control and chronic warming conditions, despite the considerable level of metabolic depression observed suggests that the individuals under chronic warming had entered a diapause-like physiological state. This result further supports the idea of a temperature-induced dormancy based on the observation of adult females seemingly initiating a diapause from the White Sea and Lurefjord (Kosobokova 1999,

Niehoff & Hirche 2005). In contrast, the differences observed between the two heat wave conditions and their respective control conditions (i.e. control and chronic warming) suggest a response closer to that of quiescence. More specifically, the alteration of amino acid and ammonia metabolism in control heat wave individuals suggests a higher rate of protein catabolism, likely due to depleted food income (Helland *et al.* 2003, Mayor *et al.* 2009, 2015). Moreover, the decreased beta-oxidation activity in the same individuals may be due to depleted triacylglycerol (TAG) reserves, also known to be caused by a mismatch between high metabolic demand and limited food availability (Sargent & Falk-Petersen 1988, Lee *et al.* 2006). Indeed, elevated temperature is documented to decrease *C. glacialis* efficiency to absorb carbon from food particles, and the copepods might have been unable to satisfy their energy demand from the microalgae they ingested throughout the experiment (Alcaraz *et al.* 2013, Grote *et al.* 2015).

### **Ecological consequences**

Altogether, the metabolic rates and metabolomic profiles observed here in response to exposure to elevated temperature conditions suggest that at least a fraction of the population of the *C. glacialis* females is capable to respond through limited phenotypic plastic, as can be deduced from their survival when exposed to either or both chronic warming and marine heat waves. Another evidence of the phenotypic variation in this species is provided by the variability of its life-cycle throughout its distribution (Daase *et al.* 2013). For instance, the strong Atlantic influence in the Kongsfjord exposes the Arctic-located community to conditions similar to lower latitude systems, such as the Lurefjord. This reflects on the reproductive strategy of *C. glacialis*, as these populations share the capacity for capital breeding (Niehoff & Hirche 2005, Daase *et al.* 2013). This strategy allows these populations to complete their reproductive cycle and accumulate lipid reserves earlier than elsewhere in the Arctic (Daase *et al.* 2013), which in turn prevents them from exposure to high predation

risk and deleterious environmental conditions: i.e. elevated temperatures in late summer and abundant predators (Varpe *et al.* 2007, 2009, Bandara *et al.* 2016).

The diapause behavior and physiology of calanoid copepods have been thoroughly investigated (see for a review Baumgartner & Tarrant 2017), yet the triggering cues and underlying mechanisms remain unclear. As lipids play a key role in providing sufficient energy during the long period of limiting feeding activity (Lee *et al.* 2006), they are thus thought to act as internal cues to initiate the physiological preparation for extended overwintering dormancy (Pond 2012, Schmid *et al.* 2018). Preparation for diapause involves important metabolic restructuring, often similar to responses induced by thermal stress, such as an increased expression of HSPs (Tarrant *et al.* 2008, Hand *et al.* 2016). Our results, together with the observations of Niehoff & Hirche (2005), suggest that exposure to elevated temperature, especially over long exposure periods, may shunt the normal pre-diapause process of *C. glacialis*, and trigger dormancy, potentially by inducing HSPs, before sufficient lipid reserves are accumulated. Thus, chronic warming will likely exacerbate the trade-off effect between feeding and survival in capital breeding *C. glacialis* (Varpe & Ejsmond 2018), while limiting the acclimation capacity of dormant females to cope with more frequent and intense marine heat waves inducing a shift from diapause-like dormancy to a deleterious quiescent state. As the thermal landscape of the Arctic will keep rapidly changing in the coming decades, *C. glacialis* will face considerable physiological challenges that will likely elicit behavioral and ecological mitigation processes, these potentially affecting the ecology and energetics of higher consumers, and ultimately ecosystem level processes such as it they have been observed in the North Sea (Beaugrand 2004).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to acknowledge the funding agencies who supported this project: MHC received scholarships from NSERC and FRQNT for graduate studies and an Arctic Field Grant from the SSF, and UQAR foundation and Northern Scientific Training Program



provided travelling funds. PT was supported by the NPI and PC was supported by the NSERC Discovery Grant, FRQNT New Researcher Grant, UQAR, FIR and FCI. We would like to thank Cynthia Thibault and Mathilde Chemel for their technical support during field work and the experiment, as well as Fanny Vermandele and Diana Madeira for their precious advice for the manuscript.

## **SUPPLEMENTARY MATERIALS**

As shown in the correlative table (Supplementary table 6), Undecylic acid concentration was only correlated negatively with Succinate concentrations. Aspartate was positively correlated with Glutamate,  $\alpha$ -Ketoglutaric acid, NAD and Succinate concentrations, while negatively correlated with Methionine, Tyrosine, and  $\alpha$ -Glycerophosphate concentrations.  $\alpha$ -Glycerophosphate was positively correlated with Valine, Glucose, Methionine, Linolelaidic acid, Eicosapentaenoic acid, Docosahexaenoic acid, Elaidic acid, and Margoric acid concentrations.  $\alpha$ -Glycerophosphate was also negatively correlated with Aspartate,  $\alpha$ -Ketoglutaric acid, ATP, Phospho-L-Arginine, and Succinate concentrations. ATP was positively correlated with ADP, Phospho-L-Arginine, and NAD, while negatively correlated with Palmitic acid and  $\alpha$ -Glycerophosphate. Capric acid was positively correlated with Elaidic acid, Margoric acid,  $\alpha$ -Aminoadipic acid, and  $\alpha$ -aminobutyric acid concentrations. Finally, Phospho-L-Arginine was positively correlated with  $\alpha$ -aminobutyric acid and ATP, while negatively correlated with Palmitic acid,  $\alpha$ -Glycerophosphate and Docosahexaenoic acid concentrations. These correlations were further depicted in multivariate analyses principal components composition.

Supplementary table 6. Correlation between metabolites detected in *Calanus glacialis* exposed to either control, chronic warming, control heat wave, or warm heat wave condition, with special consideration for compounds changing significantly between at least two experimental treatments (determined by ANOVA), using Pearson's r method

Correlated compounds	Significant compounds					
	a-Glycerophosphate	Capric acid	Undecylic acid	Aspartate	ATP	Phospho-L-Arginine
Glutamate	-	-	-	0.47	-	-
p-value				0.0002		
ADP	-	-	-	-	0.60	-
p-value					1.05 e-06	
Valine	0.26	-	-	-	-	-
p-value	0.05					
Glucose	0.33	-	-	-	-	-
p-value	0.01					
Methionine	0.32	-	-	-0.30	-	-
p-value	0.02			0.02		
Tyrosine	-	-	-	-0.34	-	-
p-value				0.009		
Palmitic acid	-	-	-	-	-0.34	-0.33
p-value					0.009	0.01
a-Glycerophosphate	-	-	-	-0.31	-0.36	-0.34
p-value				0.02	0.006	0.01
Linolelaidic acid	0.27	-	-	-	-	-
p-value	0.04					
Eicosapentaenoic a	0.50	-	-	-	-	-
p-value	6.65 e-05					
Docosahexaenoic ac	0.46	-	-	-	-	-0.27
p-value	0.0003					0.05
Elaidic acid	0.36	0.26	-	-	-	-
p-value	0.006	0.05				

Correlated compounds	Significant compounds					
	a-Glycerophosphate	Capric acid	Undecylic acid	Aspartate	ATP	Phospho-L-Arginine
Margaric acid	0.37	0.27	-	-	-	-
p-value	0.004	0.04				
a-Aminoadipic acid	-	0.50	-	-	-	-
p-value		5.69e-05				
Aspartate	-0.31	-	-	-	-	-
p-value	0.02					
a-ketoglutaric_aci	-0.42	-	-	0.30	-	-
p-value	0.001			0.03		
a-aminobutyricb-am	-	0.33	-	-	-	0.29
p-value		0.01				0.03
ATP	-0.36	-	-	-	-	0.56
p-value	0.006					6.01 e-06
Phospho-L-Arginine	-0.34	-	-	-	0.56	-
p-value	0.01				6.01e-06	
NAD	-	-	-	0.49	0.38	-
p-value				0.0001	0.003	
Succinate	-0.37	-0.39	-0.42	0.41	-	-
p-value	0.004	0.002	0.001	0.002		

## CONCLUSION GÉNÉRALE

En outre, le bénéfice d'une réponse plastique s'avère limité dans le cas du copépode arctique *Calanus glacialis*, puisque la combinaison des conditions de réchauffement chronique et de canicule s'est révélée la plus nocive, suivie de la canicule simple et du réchauffement respectivement. L'ampleur des effets néfastes causés par les canicules s'avère importante. Le taux de mortalité croissant avec la température suggère qu'une proportion décroissante de la population possède la capacité de compenser partiellement en conditions thermales problématiques, qui augmenteront en intensité et en fréquence dans les décennies à venir (IPCC 2013, Frölicher *et al.* 2018). Dans la présente étude, l'intégration des observations aux niveaux individuel et métabolique a permis de définir pour la première fois chez *C. glacialis* la transition entre un état de dormance moins dommageable (i.e. qui s'apparente à une diapause) dans la condition de réchauffement, de celle plus dommageable (i.e. quiescence) dans les conditions de canicules. Tous deux peuvent entraîner des impacts importants sur les plans démographique et écologique pour *C. glacialis*, mais également au niveau du fonctionnement des écosystèmes côtiers arctiques dépendant grandement de cette espèce et des espèces comparables.

Bien que la stratégie de dépression métabolique observée chez les individus en condition de réchauffement s'avère relativement bénéfique à court terme, elle pourrait encourir des compromis importants à plus long terme. En réduisant leur demande d'énergie (Hand 1996, Reipschläger & Pörtner 1996), les organismes diminuent par le fait même leur investissement dans les fonctions accessoires comme la croissance, la reproduction et les processus de synthèse (Guppy & Withers 1999, Calosi *et al.* 2013b). À l'échelle physiologique, un ralentissement métabolique limite la capacité des individus à tolérer des stress supplémentaires comme une diminution de pH et une diminution de saturation d'oxygène environnemental (Rosa & Seibel 2008), ou une canicule dans le cas présent. À l'échelle démographique, suspendre la reproduction représente une conséquence néfaste considérable

pour la préservation des populations dans le temps. La température de la condition de réchauffement de la présente expérience correspond d'ailleurs à la température où l'abondance de *C. glacialis* diminue rapidement en milieu naturel, indiquant potentiellement la limite d'acclimatation de *C. glacialis* au réchauffement chronique.

## **L'importance de l'échelle temporelle**

Un élément particulier des résultats obtenus ici réside en la différence marquée entre ceux-ci et les résultats rapportés dans les études antérieures sur les réponses aux conditions de réchauffement du taux métabolique chez *C. glacialis* (Tande 1988, Alcaraz *et al.* 2013). Les études antérieures ont observé une augmentation de la consommation d'oxygène en augmentant la température jusqu'à 10 °C, alors que dans notre expérience, ce sont les individus exposés à 3,5 °C qui consommaient le plus d'oxygène. Une échelle de temps plus longue nous a permis de faire ressortir certaines réponses issues de mécanismes plastiques, bénéfiques ou non, qui prennent plus de temps à s'établir, mais qui sont d'autant plus pertinents pour lier la présente étude expérimentale au contexte écologique de l'espèce. La sensibilité thermique des espèces ectothermes dépend également de leur échelle temporelle, puisque cette dernière définit notamment le type et la fréquence des variations de température vécus par les organismes (Angilletta *et al.* 2006). Dans le cas de *C. glacialis*, un cycle de vie d'un an et plus signifie que les individus seront exposés à des variations saisonnières et des épisodes de température extrême qui se différencient par leur intensité et leur durée. La capacité d'ajuster ses processus métaboliques par plasticité phénotypique à l'un ou l'autre type de stress permet alors d'opter pour une stratégie potentiellement plus avantageuse pour préserver la population dans le temps.

## **Tenir compte de la diversité métabolique**

Les analyses de réseaux effectuées dans le cadre de la présente étude utilisent les banques de données métaboliques publiques pour établir les voies affectées. Ces banques de données

sont montées principalement sur la base des études effectuées sur quelques espèces modèles, dont aucune n'est marine et une seule fait partie des arthropodes, soit *Drosophila melanogaster* (Xia & Wishart 2010). Alors que certaines voies métaboliques sont reconnues comme très conservées et stables entre les groupes et espèces, e.g. le métabolisme énergétique, des glucides et des acides aminés (Peregrín-Alvarez et al. 2009), le simple fait d'ignorer la diversité de voies métaboliques spécialisées pour la majorité des espèces peut ultimement cacher d'autres résultats pertinents. Dans le cas de *C. glacialis*, la synthèse des esters cireux pour leur gouttelette lipidique représente une caractéristique spécialisée et cruciale dans le réseau trophique marin arctique (Sargent & Falk-Petersen 1988, Lee et al. 2006, Falk-Petersen et al. 2009), puisque ces réserves sont également consommées en grande quantité par ses prédateurs (Berge *et al.* 2012). D'une perspective plus fondamentale, ces réseaux de métabolites pourraient être modélisés à l'avenir par l'entremise de méthodes avancées qui construiraient des réseaux basés non pas sur les connaissances actuelles, mais sur les données mesurées (Bartel *et al.* 2013). Par exemple, l'analyse par graphes Gaussiens permet d'explorer les réseaux métaboliques en faisant abstraction des connaissances *a priori* sur les réseaux et voies métaboliques (Bartel *et al.* 2013). En utilisant ces méthodes plus sophistiquées de modélisation qui sont encore en développement, il sera alors possible de détecter les métabolites dont le comportement est semblable face au stress thermique du réchauffement et des canicules, qui pourront ensuite être comparés aux voies métaboliques connues et permettre d'associer certains groupes de voies entre elles.

## **Hétérogénéité spatiale et homogénéité génétique**

Les espèces dont la distribution occupe une grande région géographique sont sujettes à rencontrer des conditions environnementales variées. Il s'agit alors d'une situation propice à l'évolution d'adaptations locales par l'assimilation génétique de phénotypes plastiques (Pigliucci & Mullen 2003) ou simplement par plasticité phénotypique suffisamment compensatoire (Ghalambor et al. 2007, Somero 2010, Calosi et al. 2017). Or, la connectivité

entre les sites où se retrouve *C. glacialis* est suffisante pour assurer des échanges importants de matériel génétique selon des analyses de loci microsatellites polymorphiques (Weydmann *et al.* 2016) et du gène mitochondrial *ND5* (Weydmann *et al.* 2018). Ces échanges suggèrent que les frontières entre les populations est peu définies, voire absentes. Une telle homogénéité génétique entre les régions pourrait avoir un effet positif pour les groupes situés en milieu typiquement polaire, mais se traduire en une capacité limitée à tolérer les conditions de plus en plus chaudes dans les régions de transition comme le Kongsfjorden. Ceci étant dit, quelques études ont observé des différences morphologiques et physiologiques entre les populations des différentes régions de l'Arctique (Gabrielsen *et al.* 2012, Thor *et al.* 2017). Celles-ci pourraient en fait être attribuées à la plasticité développementale exprimée à cause des différences environnementales entre les régions, mais qui contrainst par la suite la morphologie ou la réponse physiologique à un stress standardisé lors d'expériences (Woods & Harrison 2002). La capacité limitée de *C. glacialis* de s'ajuster à des conditions atlantiques pourraient être alternativement compensée par son hybridation avec sa contrepartie atlantique (Parent *et al.* 2015), *C. finmarchicus* qui est adaptée à des températures plus chaudes (Kjellerup *et al.* 2012).

### **À chacun son Arctique**

À l'échelle pan-Arctique, le type de réponse qui a été observé dans le cadre de la présente expérience laisse entrevoir des effets importants au niveau de l'espèce, mais également au niveau écosystémique étant donné son rôle essentiel dans les réseaux trophiques et les cycles biogéochimiques (Falk-Petersen *et al.* 2007, Berge *et al.* 2012, Jónasdóttir *et al.* 2015). En assumant que la réponse des autres populations est semblable à celle obtenue ici (mais voir Thor *et al.* (2017) pour la réponse des différentes populations à une augmentation de la pression partielle de CO<sub>2</sub>) le réchauffement et les canicules pourraient perturber le cycle normal de migration verticale pour éviter les températures problématiques. Éviter les eaux de surface chaudes pourrait alors limiter l'accès de cette espèce au phytoplancton et forcer



les individus à se tourner vers une alimentation moins optimale pour l'accumulation de réserve lipidique, ou encore entraîner des mortalités de masse et donc une perte de proies considérable pour les prédateurs qui en dépendent, comme plusieurs espèces de baleines, poissons et d'oiseaux (Falk-Petersen *et al.* 2007, Berge *et al.* 2012). En parallèle, si une hausse de température déclenche une diapause prématurée, non seulement ne seront-ils plus accessibles à leurs prédateurs, mais ils pourraient ne pas avoir eu l'occasion d'accumuler suffisamment de lipides pour supporter leur faible activité métabolique pendant leur dormance (Schmid *et al.* 2018). Raccourcir la période de diapause peut mener à une hausse de la mortalité, mais aussi à la perturbation du transport direct de carbone occasionné par les migrations et le métabolisme de diapause (Jónasdóttir *et al.* 2015). Finalement, la niche écologique des organismes n'est pas uniquement dictée par les conditions abiotiques, elle dépend également des autres espèces avec qui ils interagissent et comment elles répondent à leur tour aux différents filtres abiotiques (Angilletta *et al.* 2006). De nouvelles expériences et l'intégration d'approches complémentaires prenant en considération ces niveaux supérieurs d'organisation biologique permettront de mieux définir les effets directs et indirects (voir l'exemple sur l'acidification des océans de Hammill *et al.* 2017) de la température sur l'écologie du zooplancton arctique dans les prochaines décennies.

## LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abele D, Philipp A, Gonzalez PM, & Puntarulo S, 2007. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Front. Biosci.* 12: 933–946. hdl:10013/epic.24770
- Alcaraz M, Felipe J, Grote U, Arashkevich E, & Nikishina A, 2013. Life in a warming ocean: thermal thresholds and metabolic balance of arctic zooplankton. *J. Plankton Res.* 36: 3–10. DOI:10.1093/plankt/fbt111
- Angilletta MJ 2009. Thermal Adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press. 302 pp. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570875.001.1>
- Angilletta MJ, Bennett AF, Guderley H, Navas CA, Seebacher F, & Wilson RS, 2006. Coadaptation: a unifying principle in evolutionary thermal biology. *Physiol. Biochem. Zool.* 79: 282–294. DOI: 10.1086/499990
- Angilletta MJ, Wilson RS, Navas CA, & James RS, 2003. Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms. *Trends Ecol. Evol.* 18: 234–240. DOI: 10.1016/S0169-5347(03)00087-9
- Arnkvaern G, Daase M, & Eiane K, 2005. Dynamics of coexisting *Calanus finmarchicus*, *Calanus glacialis* and *Calanus hyperboreus* populations in a high-Arctic fjord. *Polar Biol.* 28: 528–538. DOI 10.1007/s00300-005-0715-8
- Bandara K, Varpe Ø, Søreide JE, Wallenschus J, Berge J, & Eiane K, 2016. Seasonal vertical strategies in a high-Arctic coastal zooplankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 555: 49–64. DOI: 10.3354/meps11831
- Bartel J, Krumsiek J, & Theis FJ, 2013. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 4: e201301009. <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201301009>
- Baumgartner MF & Tarrant AM, 2017. The Physiology and Ecology of Diapause in Marine Copepods. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 9: 387-411. DOI:10.1146/annurev-marine-010816-060505
- Beaugrand G, 2004. The North Sea regime shift: Evidence, causes, mechanisms and consequences. *Prog. Oceanogr.* 60: 245–262. DOI: 10.1016/j.pocean.2004.02.018
- Bennett AF, 1987. Interindividual variability: An underutilized resource. Dans ME Feder, AF Bennett, WW Burggren, & RB Huey (eds), *New Direction in Ecological Physiology*, pp. 147–169. Cambridge University Press.
- Benthuyzen JA, Oliver ECJ, Feng M, & Marshall AG, 2018. Extreme marine warming across tropical Australia during austral summer 2015-16. *J. Geophys. Res.* 123: 1301–1326. DOI: 10.1002/2017JC013326
- Berge J, Gabrielsen TM, Moline M, & Renaud PE, 2012. Evolution of the Arctic Calanus complex: An Arctic marine avocado? *J. Plankton Res.* 34: 191–195. DOI:10.1093/plankt/fbr103

- Blier PU, Lemieux H, & Pichaud N, 2014. Holding our breath in our modern world: will mitochondria keep the pace with climate changes? *Can. J. Zool.* 92: 591–601. [dx.doi.org/10.1139/cjz-2013-0183](https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0183)
- Bluhm BA, Kosobokova KN, & Carmack EC, 2015. A tale of two basins: An integrated physical and biological perspective of the deep Arctic Ocean. *Prog. Oceanogr.* 139: 89–121. DOI: 10.1016/j.pocean.2015.07.011
- Bolnick DI, Amarasekare P, Araújo MS, Bürger R, Levine JM, Novak M, Rudolf VHW, Schreiber SJ, Urban MC, & Vasseur D, 2011. Why intraspecific trait variation matters in community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 26: 183–192. DOI: 10.1016/j.tree.2011.01.009
- Bozinovic F, Calosi P, & Spicer JI, 2011. Physiological Correlates of Geographic Range in Animals. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42: 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145055>
- Brown JH, Gillooly JF, Allen AP, Savage VM, & West GB, 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85: 1771–1789. <https://doi.org/10.1890/03-9000>
- Bundy JG, Davey MP, & Viant MR, 2009. Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5: 3–21. DOI: 10.1007/s11306-008-0152-0
- Calosi P, Melatunan S, Turner LM, Artioli Y, Davidson RL, Byrne JJ, Viant MR, Widdicombe S, & Rundle SD, 2017. Regional adaptation defines sensitivity to future ocean acidification. *Nat. Commun.* 8: 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms13994>
- Calosi P, Rastrick SPS, Lombardi C, de Guzman HJ, Davidson L, Jahnke M, Giangrande A, Hardege JD, Schulze A, Spicer JI, & Gambi MC, 2013a. Adaptation and acclimatization to ocean acidification in marine ectotherms: an *in situ* transplant experiment with polychaetes at a shallow CO<sub>2</sub> vent system. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 368: 1–15. DOI: 10.1098/rstb.2012.0444
- Calosi P, Turner LM, Hawkins M, Bertolini C, Nightingale G, Truebano M, & Spicer JI, 2013b. Integrative and Comparative Biology Multiple Physiological Responses to Multiple Environmental Challenges: An Individual Approach. *Integr. Comp. Biol.* 53: 660–670. DOI:10.1093/icb/ict041
- Carstensen J, Weydmann A, Olszewska A, & Kwaśniewski S, 2012. Effects of environmental conditions on the biomass of *Calanus spp.* in the Nordic Seas. *J. Plankton Res.* 34: 951–966. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs059>
- Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, & Xia J, 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 46: 486–494. DOI: 10.1093/nar/gky310

- Chown SL, Hoffmann AA, Kristensen TN, Angilletta MJ, Stenseth NC, & Pertoldi C, 2010. Adapting to climate change: A perspective from evolutionary physiology. *Clim. Res.* 43: 3–15. <https://doi.org/10.3354/cr00879>
- Clarke A, 1980. A reappraisal of the concept of metabolic cold adaptation in polar marine invertebrates. *Biol. J. Linn. Soc.* 14: 77–92. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1980.tb00099.x>
- Clarke A, 1993. Seasonal Acclimatization and Latitudinal Compensation in Metabolism: do they exist? *Funct. Ecol.* 7: 139–149. DOI: 10.2307/2389880
- Clarke A, 2004. Is there a Universal Temperature Dependence of metabolism? *Funct. Ecol.* 18: 252–256. <https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2004.00842.x>
- Cleary AC, Søreide JE, Freese D, Niehoff B, & Gabrielsen TM, 2017. Feeding by *Calanus glacialis* in a high arctic fjord: Potential seasonal importance of alternative prey. *ICES J. Mar. Sci.* 74: 1937–1946. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsx106>
- Côté IM, Darling ES, & Brown CJ, 2016. Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283: 20152592. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2592>
- Cottier F, Tverberg V, Inall M, Svendsen H, Nilsen F, & Griffiths C, 2005. Water mass modification in an Arctic fjord through cross-shelf exchange: The seasonal hydrography of Kongsfjorden, Svalbard. *J. Geophys. Res.* 110: 1–18. DOI:10.1029/2004JC002757
- Daase M, Falk-Petersen S, Varpe Ø, Darnis G, Søreide JE, Wold A, Leu E, Berge J, Philippe B, & Fortier L, 2013. Timing of reproductive events in the marine copepod *Calanus glacialis*: a pan-Arctic perspective. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70: 871–884. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2012-0401>
- Daase M, Vik JO, Bagøien E, Stenseth NC, & Eiane K, 2007. The influence of advection on *Calanus* near Svalbard: Statistical relations between salinity, temperature and copepod abundance. *J. Plankton Res.* 29: 903–911. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbm068>
- Darwin C, 1859. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. John Murray, London.
- Daugaard M, Rohde M, & Jäättelä M, 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 581: 3702–3710. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039
- De la Fuente IM, Cortés JM, Valero E, Desroches M, Rodrigues S, Malaina I, & Martínez L 2014. On the dynamics of the adenylate energy system: Homeorhesis vs homeostasis. *PLoS One* 9: e108676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108676>

- Dillon ME, Wang G, & Huey RB, 2010. Global metabolic impacts of recent climate warming. *Nature* 467: 704–706. <https://doi.org/10.1038/nature09407>
- Divya DT & Krishnan KP, 2017. Recent variability in the Atlantic water intrusion and water masses in Kongsfjorden, an Arctic fjord. *Polar Sci.* 11: 30–41. DOI: 10.1016/j.polar.2016.11.004
- Dowd WW, King FA, & Denny MW, 2015. Thermal variation, thermal extremes and the physiological performance of individuals. *J. Exp. Biol.* 218: 1956–1967. DOI: 10.1242/jeb.114926
- Elliott JM & Davison W, 1975. Energy Equivalents of Oxygen Consumption in Animal Energetics. *Oecologia*, 19: 195–201. <https://doi.org/10.1007/BF00345305>
- Falk-Petersen S, Mayzaud P, Kattner G, & Sargent JR, 2009. Lipids and life strategy of Arctic *Calanus*. *Mar. Biol. Res.* 5: 18–39. <https://doi.org/10.1080/17451000802512267>
- Falk-Petersen S, Timofeev S, Pavlov V, & Sargent JR, 2007. Climate variability and the effect on arctic food chains: The role of *Calanus*. Dans Ørbæk J.B., Kallenborn R., Tombre I., Hegseth E.N., Falk-Petersen S., Hoel A.H. (eds), Arctic-alpine Ecosystem and people in a Changing Environment, pp 147-166.
- Frölicher TL, Fischer EM, & Gruber N, 2018. Marine heatwaves under global warming. *Nature* 560: 360–364. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0383-9>
- Frost B, 1972. Effects on size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.* 17: 805–815. <https://doi.org/10.4319/lo.1972.17.6.0805>
- Gabrielsen TM, Merkel B, Søreide JE, Johansson-Karlsson E, Bailey A, Vogedes D, Nygård H, Varpe, & Berge J, 2012. Potential misidentifications of two climate indicator species of the marine arctic ecosystem: *Calanus glacialis* and *C. finmarchicus*. *Polar Biol.* 35: 1621–1628. <https://doi.org/10.1007/s00300-012-1202-7>
- Garzke J, Ismar SMH, & Sommer U, 2015. Climate change affects low trophic level marine consumers: warming decreases copepod size and abundance. *Oecologia*, 177: 849–860. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3130-4>
- Ghalambor CK, Hoke KL, Ruell EW, Fischer EK, Reznick DN, & Hughes KA, 2015. Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, 525: 372–375. DOI: 10.1038/nature15256
- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, & Reznick DN, 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21: 394–407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x>

- Gillooly JF, Brown JH, & West GB, 2001. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science* 293: 2248–2251. DOI: 10.1126/science.1061967
- Grenvald JC, Nielsen TG, & Hjorth M, 2013. Effects of pyrene exposure and temperature on early development of two co-existing Arctic copepods. *Ecotoxicology* 22: 184–198. DOI: 10.1007/s10646-012-1016-y
- Grote U, Pasternak A, Arashkevich E, Halvorsen E, & Nikishina A, 2015. Thermal response of ingestion and egestion rates in the Arctic copepod *Calanus glacialis* and possible metabolic consequences in a warming ocean. *Polar Biol.* 38: 1025–1033. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1664-5>
- Gunderson AR & Stillman JH, 2015. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282: 20150401. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0401>
- Guppy M & Withers P, 1999. Metabolic reduction in animals: physiological perspectives and biochemical generalisations. *Biol. Rev.* 74: 1–40. DOI: 10.1017/s0006323198005258
- Guscelli E, Spicer JJ, & Calosi P, 2019. The importance of inter-individual variation in predicting species' responses to global change drivers. *Ecol. Evol.* 9: 4327–4339. <https://doi.org/10.1002/ece3.4810>
- Hammill E, Johnson E, Atwood TB, Harianto J, Hinchliffe C, Calosi P, & Byrne M, 2017. Ocean acidification alters zooplankton communities and increases top-down pressure of a cubozoan predator. *Glob. Chang. Biol.* 24: e128–e138. DOI: 10.1111/gcb.13849
- Hand SC, 1996. Downregulation of Cellular Metabolism During Environmental Stress: Mechanisms and Implications. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 539–563. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.002543>
- Hand SC, Denlinger DL, Podrabsky JE, & Roy R, 2016. Mechanisms of animal diapause: recent developments from nematodes, crustaceans, insects, and fish. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 310: R1193–R1211. DOI: 10.1152/ajpregu.00250.2015
- Hand SC & Podrabsky JE, 2000. Bioenergetics of diapause and quiescence in aquatic animals. *Thermochim. Acta* 349: 31–42. DOI: 10.1016/S0040-6031(99)00511-0
- Hardie DG, 2011. Signal transduction: How cells sense energy. *Nature*, 472: 176–177. DOI: 10.1038/472176a
- Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, & Buchner J, 2005. Some like it hot: The structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 842–846. DOI: 10.1038/nsmb993
- Hazel J 1995. Thermal Adaptations in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57: 19–42. DOI: 10.1146/annurev.ph.57.030195.000315
- Helland S, Christian Nejstgaard J, Jørgen Fyhn H, Egge JK, & Båmstedt U, 2003. Effects of starvation, season, and diet on the free amino acid and protein content of *Calanus finmarchicus* females. *Mar. Biol.* 143: 297–306. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1092-x>

- Hildebrandt N, Niehoff B, & Sartoris FJ, 2014. Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on the Arctic calanoid copepods *Calanus glacialis* and *C. hyperboreus*. *Mar. Pollut. Bull.* 80: 59–70. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.050
- Hirche HJ & Kosobokova K, 2007. Distribution of *Calanus finmarchicus* in the northern North Atlantic and Arctic Ocean — Expatriation and potential colonization. *Deep. Res. II.* 54: 2729–2747. doi:10.1016/j.dsr2.2007.08.006
- Hobday AJ, Alexander L V., Perkins SE, Smale DA, Straub SC, Oliver ECJ, Benthuyssen JA, Burrows MT, Donat MG, Feng M, Holbrook NJ, Moore PJ, Scannell HA, Gupta A Sen, & Wernberg T, 2016. A hierarchical approach to defining marine heatwaves. *Prog. Oceanogr.* 141: 227–238. DOI:10.1016/j.pocean.2015.12.014
- Hochachka PW & Somero GN, 2002. Bio-Chemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press. 480 pp.
- Hop H, Pearson T, Hegseth EN, Kovacs KM, Wiencke C, Kwasniewski S, Eiane K, Mehlum F, Gulliksen B, Wlodarska-Kowalczyk M, Lydersen C, Weslawski JM, Cochrane S, Gabrielsen GW, Leakey RJG, Lønne OJ, Zajaczkowski M, Falk-Petersen S, Kendall M, Wängberg SÅ, Bischof K, Voronkov AY, Kovaltchouk NA, Wiktor J, Poltermann M, Prisco G Di, Papucci C, & Gerland S, 2002. The marine ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard. *Polar Res.* 21: 167–208.
- Huey RB & Kingsolver JB, 1993. Evolution of Resistance to High Temperature in Ectotherms. *Am. Nat.* 142: S21–S46. <https://www.jstor.org/stable/2462707>
- IPCC 2013. Annex I: Atlas of Global and Regional Climate Projections. 1311–1394 pp.
- Jónasdóttir SH, Visser AW, Richardson K, & Heath MR 2015. Seasonal copepod lipid pump promotes carbon sequestration in the deep North Atlantic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 12122–12126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512110112>
- Kjellerup S, Dünweber M, Swalethorp R, Nielsen TG, Møller EF, Markager S, & Hansen BW, 2012. Effects of a future warmer ocean on the coexisting copepods *Calanus finmarchicus* and *C. glacialis* in Disko Bay, western Greenland. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 447: 87–108. DOI: 10.3354/meps09551
- Kooijman SALM, 2010. Dynamic Energy Budget Theory for metabolic organisation. Cambridge University Press. 532 pp.
- Kosobokova KN, 1999. The reproductive cycle and life history of the Arctic copepod *Calanus glacialis* in the White Sea. *Polar Biol.* 22: 254–263. <https://doi.org/10.1007/s003000050418>
- Kwasniewski S, Hop H, Falk-Petersen S, & Pedersen G, 2003. Distribution of *Calanus* species in Kongsfjorden, a glacial fjord in Svalbard. *J. Plankton Res.* 25: 1–20. <https://doi.org/10.1093/plankt/25.1.1>

- Larsen JN, Anisimov OA, Constable A, Hollowed AB, Maynard N, Prestrud P, Prowse TD, & Stone JMR, 2014. Polar Regions. In: Clim. Chang. 2014 Impacts, Adapt. Vulnerability. Part B Reg. Asp. Contrib. Work. Gr. II to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. Barros VR, Field CB, Dokken DJ, Mastrandrea MD, Mach KJ, Bilir TE, Chatterjee M, Ebi KL, Estrada YO, Genova RC, Girma B, Kissel ES, Levy AN, MacCracken S, Mastrandrea PR, & White LL, eds., pp. 1567–1612. Cambridge University Press.
- Lee RF, Hagen W, & Kattner G 2006. Lipid storage in marine zooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 307: 273–306. [hdl:10013/epic.23456](https://doi.org/10.10013/epic.23456)
- Leiva FP, Calosi P, & Verberk WCEP, 2019. Scaling of thermal tolerance with body mass and genome size in ectotherms: A comparison between water-and air-breathers. *Philos. Trans. R Soc* 374: 20190035. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0035>
- Lu W, Kimball E, & Rabinowitz JD, 2006. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17: 37–50. DOI: 10.1016/j.jasms.2005.09.001
- MacDonald BA, 1988. Physiological energetics of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* larvae. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 120: 155–170. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90086-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90086-X)
- Madsen SD, Nielsen TG, & Hansen BW, 2001. Annual population development and production by *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* in Disko Bay, western Greenland. *Mar. Biol.* 139: 75–93. <https://doi.org/10.1007/s002270100552>
- Makarieva AM, Gorshkov VG, Li BL, & Chown SL, 2006. Size- and temperature-independence of minimum life-supporting metabolic rates. *Funct. Ecol.* 20: 83–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01070.x>
- Mayor DJ, Anderson TR, Pond DW, & Irigoien X, 2009. Egg production and associated losses of carbon, nitrogen and fatty acids from maternal biomass in *Calanus finmarchicus* before the spring bloom. *J. Mar. Syst.* 78: 505–510. DOI: 10.1016/j.jmarsys.2008.12.019
- Mayor DJ, Sommer U, Cook KB, & Viant MR 2015. The metabolic response of marine copepods to environmental warming and ocean acidification in the absence of food. *Sci. Rep.* 5: 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep13690>
- Mayzaud P, Roche-Mayzaud O, & Razouls S, 1992. Medium term time acclimation of feeding and digestive enzyme activity in marine copepods: influence of food concentration and copepod species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 89: 197–212.
- Moller EF, Thor P, & Nielsen TG, 2003. Production of DOC by *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* through sloppy feeding and leakage from fecal pellets. *Mar. Ecol. Ser.* 262: 185–191.



- Muller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu RY, van der Giezen M, Tielens AGM, & Martin WF, 2012. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76: 444–496. DOI: 10.1128/MMBR.05024-11
- Nelson DL & Cox MM, 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman and Company. 1216 pp.
- Niehoff B & Hirche HJ, 2005. Reproduction of *Calanus glacialis* in the Lurefjord (western Norway): Indication for temperature-induced female dormancy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 285: 107–115. DOI: 10.3354/meps285107
- Nielsen TG, Kjellerup S, Smolina I, Hoarau G, & Lindeque P, 2014. Live discrimination of *Calanus glacialis* and *C. finmarchicus* females: Can we trust phenological differences? *Mar. Biol.* 161: 1299–1306. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2419-5>
- Oliver ECJ, 2019. Mean warming not variability drives marine heatwave trends. *Clim. Dyn.* 53: 1653–1659. DOI: 10.1007/s00382-019-04707-2
- Oliver ECJ, Donat MG, Burrows MT, Moore PJ, Smale DA, Alexander L V, Benthuyssen JA, Feng M, Gupta A Sen, Hobday AJ, Holbrook NJ, Perkins-Kirkpatrick SE, Scannell HA, Straub SC, & Wernberg T, 2018. Longer and more frequent marine heatwaves over the past century. *Nat. Commun.* 9: 1–12. DOI: 10.1038/s41467-018-03732-9.
- Parent GJ, Plourde S, Joly P, & Turgeon J, 2015. Phenology and fitness of *Calanus glacialis*, *C. finmarchicus* (Copepoda), and their hybrids in the St. Lawrence Estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 524: 1–9. DOI: 10.3354/meps11240
- Pavlov AK, Tverberg V, Ivanov B V., Nilsen F, Falk-Petersen S, & Granskog MA, 2013. Warming of Atlantic water in two west Spitsbergen fjords over the last century (1912-2009). *Polar Res.* 32: 11206. <http://dx.doi.org/10.3402/polar.v32i0.11206>
- Pawar S, Dell AI, Savage VM, & Knies JL, 2016. Real versus Artificial Variation in the Thermal Sensitivity of Biological Traits. *Am. Nat.* 187: E41–E52. DOI: 10.1086/684590
- Peck LS, 2016. A Cold Limit to Adaptation in the Sea. *Trends Ecol. Evol.* 31: 13–26. DOI: 10.1016/j.tree.2015.09.014
- Peregrín-Alvarez JM, Sanford C, & Parkinson J, 2009. The conservation and evolutionary modularity of metabolism. *Genome Biol.* 10: 1–17. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r63>
- Pigliucci M & Mullen CJ, 2003. Perspective: Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? *Evolution*, 57: 1455–1464. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00354.x>

- Pond DW, 2012. The physical properties of lipids and their role in controlling the distribution of zooplankton in the oceans. *J. Plankton Res.* 34: 443–453. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs027>
- Pörtner H 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88: 137–146. <https://doi.org/10.1007/s001140100216>
- Pörtner H-O, 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213: 881–893. DOI: 10.1242/jeb.037523
- Pörtner HO & Farrell AP, 2008. Physiology and Climate Change. *Science*, 322: 690–692. DOI: 10.1126/science.1163156
- Pörtner HO & Knust R, 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315: 95–97. DOI: 10.1126/science.1135471
- R Core Team 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rabindranath A, Daase M, Falk-Petersen S, Wold A, Wallace MI, Berge J, & Brierley AS, 2011. Seasonal and diel vertical migration of zooplankton in the High Arctic during the autumn midnight sun of 2008. *Mar. Biodivers.* 41: 365–382. <https://doi.org/10.1007/s12526-010-0067-7>
- sschläger A & Pörtner HO, 1996. Metabolic depression during environmental stress: the role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *J. Exp. Biol.* 199: 1801–1807.
- Rohr JR, Civitello DJ, Cohen JM, Roznik EA, Sinervo B, & Dell AI, 2018. The complex drivers of thermal acclimation and breadth in ectotherms. *Ecol. Lett.* 21: 1425–1439. DOI: 10.1111/ele.13107
- Rosa R & Seibel BA, 2008. Synergistic effects of climate-related variables suggest future physiological impairment in a top oceanic predator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 20776–20780. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806886105>
- Sargent JR & Falk-Petersen S, 1988. The lipid biochemistry of calanoid copepods. *Hydrobiologia* 167–168: 101–114. DOI: 10.1007/BF00026297
- Schmid MS, Maps F, & Fortier L, 2018. Lipid load triggers migration to diapause in Arctic *Calanus* copepods - Insights from underwater imaging. *J. Plankton Res.* 40: 311–325. <https://doi.org/10.1093/plankt/fby012>
- Schulte PM, 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *J. Exp. Biol.* 218: 1856–1866. DOI: 10.1242/jeb.118851
- Schulte PM, Healy TM, & Fangue NA, 2011. Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. *Integr. Comp. Biol.* 51: 691–702. DOI: 10.1093/icb/icr097

- Sibly RM, Brown JH, & Kodric-Brown A, 2012. *Metabolic Ecology: a scaling approach*. John Wiley & Sons, Ltd. 392 pp.
- Smale DA, Wernberg T, Oliver ECJ, Thomsen M, Harvey BP, Straub SC, Burrows MT, Alexander L V, Benthuyzen JA, Donat MG, Feng M, Hobday AJ, Holbrook NJ, Perkins-Kirkpatrick SE, Scannell HA, Gupta A Sen, Payne BL, & Moore PJ, 2019. Marine heatwaves threaten global biodiversity and the provision of ecosystem services. *Nat. Clim. Chang.* 9: 306–312. DOI: 10.1038/s41558-019-0412-1.
- Sokolova IM, 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53: 597–608. DOI: 10.1093/icb/ict028
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, & Sukhotin AA, 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79: 1–15. DOI: 10.1016/j.marenvres.2012.04.003
- Somero GN, 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers.” *J. Exp. Biol.* 213: 912–920. DOI: 10.1242/jeb.037473
- Somero GN, 2020. The cellular stress response and temperature: Function, regulation, and evolution. *J Exp Zool.* 333: 379–397. DOI: 10.1002/jez.2344
- Sørensen JG, Kristensen TN, & Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6: 1025–1037. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>
- Stillman JH, 2019. Heat Waves, the New Normal: Summertime Temperature Extremes Will Impact Animals, Ecosystems, and Human Communities. *Physiology* 34: 86–100. <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2018>
- Svendsen H, Beszczynska-Møller A, Hagen JO, Lefauconnier B, Tverberg V, Gerland S, Ørbæk JB, Bischof K, Papucci C, Zajaczkowski M, Azzolini R, Bruland O, Wiencke C, Winther J-G, & Dallmann W, 2002. The physical environment of Kongsfjorden – Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard. *Polar Res.* 21: 133–166. <https://doi.org/10.1111/j.1751-8369.2002.tb00072.x>
- Tande KS, 1988. The effects of temperature on metabolic rates of different life stages of *Calanus glacialis* in the Barents Sea. *Polar Biol.* 8: 457–461. <https://doi.org/10.1007/BF00264722>
- Tarrant AM, Baumgartner MF, Verslycke T, & Johnson CL, 2008. Differential gene expression in diapausing and active *Calanus finmarchicus* (Copepoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 355: 193–207. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps07207>
- Thor P, 2000. Relationship between specific dynamic action and protein deposition in calanoid copepods. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 245: 171–182. DOI: 10.1016/s0022-0981(99)00159-8

- Thor P, Bailey A, Dupont S, Calosi P, Sørdeide JE, de Wit P, Guscelli E, Loubet-Sartrou L, Deichmann IM, Candee MM, Svensen C, King AL, & Bellerby RG, 2017. Contrasting physiological responses to future ocean acidification among Arctic copepod populations. *Glob. Chang. Biol.* 12: 3218–3221. DOI: 10.1111/gcb.13870
- van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, & van der Werf MJ, 2006. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7: 1–15. DOI:10.1186/1471-2164-7-142
- Varpe Ø, 2017. Life history adaptations to seasonality. *Integr. Comp. Biol.*, 57: 943–960. <https://doi.org/10.1093/icb/ix123>
- Varpe Ø & Ejsmond MJ, 2018. Trade-offs between storage and survival affect diapause timing in capital breeders. *Evol. Ecol.* 32: 623–641. <https://doi.org/10.1007/s10682-018-9961-4>
- Varpe Ø, Jørgensen C, Tarling GA, & Fiksen Ø, 2007. Early is better: Seasonal egg fitness and timing of reproduction in a zooplankton life-history model. *Oikos* 116: 1331–1342. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15893.x>
- Varpe Ø, Jørgensen C, Tarling GA, & Fiksen Ø, 2009. The adaptive value of energy storage and capital breeding in seasonal environments. *Oikos* 118: 363–370. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17036.x>
- Vasseur DA, Gilbert B, Greig HS, McCann KS, O'Connor MI, DeLong JP, Harley CDG, Savage V, & Tunney TD, 2014. Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281: 20132612. DOI: 10.1098/rspb.2013.2612
- Vermandele F, 2019. Quels sont les compartiments biologiques les plus affectés par l'exposition à une température élevée durant l'ontogénie? Une étude de cas sur le vers marin *Ophryotrocha labronica*. Rimouski, Université du Québec à Rimouski.
- Viant MR, Kurland IJ, Jones MR, & Dunn WB, 2017. How close are we to complete annotation of metabolomes? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 36: 64–69. DOI: 10.1016/j.cbpa.2017.01.001
- Voznesensky M, Lenz PH, Spanings-Pierrot C, & Towle DW, 2004. Genomic approaches to detecting thermal stress in *Calanus finmarchicus* (Copepoda: Calanoida). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 311: 37–46. DOI: 10.1016/j.jembe.2004.04.017
- Wassmann P, 2011. Arctic marine ecosystems in an era of rapid climate change. *Prog. Oceanogr.* 90: 1–17. DOI: 10.1016/j.pocean.2011.02.002
- Wei R, Wang J, Jia E, Chen T, Ni Y, & Jia W, 2018a. GSimp: A Gibbs sampler based left-censored missing value imputation approach for metabolomics studies. *PLoS Comput. Biol.* 14: 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005973>

- Wei R, Wang J, Su M, Jia E, Chen S, Chen T, & Ni Y, 2018b. Missing Value Imputation Approach for Mass Spectrometry-based Metabolomics Data. *Sci. Rep.* 8: 663. DOI: 10.1038/s41598-017-19120-0
- Wernberg T, Smale DA, Tuya F, Thomsen MS, Langlois TJ, Bettignies T de, Bennett S, & Rousseaux CS, 2012. An extreme climatic event alters marine ecosystem structure in a global biodiversity hotspot. *Nat. Clim. Chang.* 3: 78–82. 10.1038/NCLIMATE1627
- Weydmann A, Coelho NC, Serrão EA, Burzyński A, & Pearson GA, 2016. Pan-Arctic population of the keystone copepod *Calanus glacialis*. *Polar Biol.* 39: 2311–2318. <https://hdl.handle.net/10.1007/s00300-016-1898-x>
- Weydmann A, Przyłucka A, Lubośny M, Walczyńska KS, Serrão EA, Pearson GA, & Burzyński A, 2018. Postglacial expansion of the Arctic keystone copepod *Calanus glacialis*. *Mar. Biodivers.* 48: 1027–1035. <https://doi.org/10.1007/s12526-017-0774-4>
- Weydmann A, Zwolicki A, Muś K, & Kwaśniewski S, 2015. The effect of temperature on egg development rate and hatching success in *Calanus glacialis* and *C. finmarchicus*. *Polar Res.* 34. <https://doi.org/10.3402/polar.v34.23947>
- Woods HA & Harrison JF, 2002. Interpreting rejections of the beneficial acclimation hypothesis: when is physiological plasticity adaptive? *Evolution*, 56: 1863–1866. <https://www.jstor.org/stable/3094746>
- Worley B & Powers R, 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* 1: 92–107. DOI: 10.2174/2213235X11301010092
- Worley B & Powers R, 2016. PCA as a predictor of OPLS-DA model reliability. *Curr. Metabolomics* 4: 97–103. DOI: 10.2174/2213235X04666160613122429
- Xia J & Wishart DS, 2010. MSEA: A web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. *Nucleic Acids Res.* 38: W71–W77. DOI: 10.1093/nar/gkq329



