Impact du réchauffement climatique sur le krill en milieux polaires : thermotolérance et réponse Hsp70

Kévin Cascella

▶ **To cite this version:**

Kévin Cascella. Impact du réchauffement climatique sur le krill en milieux polaires : thermotolérance et réponse Hsp70. Ecologie, Environnement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066646 . tel-01151589

HAL Id: tel-01151589

https://theses.hal.science/tel-01151589

Submitted on 13 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Science de la Nature et de l'Homme

Laboratoire Adaptation et Biologie des Invertébrés en Conditions Extrêmes (ABICE)

Impact du réchauffement climatique sur le krill en milieux polaires : Thermotolérance et réponse *Hsp70*

Par Kévin Cascella

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Jean-Yves Toullec

Présentée et soutenue publiquement le 17.10.2014

Devant un jury composé de :

M. Chevaldonné Pierre, Directeur de Recherche CNRS, Rapporteur

Mme. Clark Melody, Project Leader, British Antarctic Survey, Examinatrice

M. Cormier Patrick, Professeur Station Biologique de Roscoff, Examinateur

M. Pichereau Vianney, Professeur CNRS/UBO/IRD/IFREMER, Rapporteur

Mme. Ravaux Juliette, HDR, Université Pierre et Marie Curie, Examinatrice

M. Toullec Jean-Yves, HDR, Station biologique de Roscoff, Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

“It's just a fork in the road. You've got to go one way or the other, and you're always going to regret what the other one looked like.”

Remerciements :

A toutes celles et ceux, qui de près ou de loin, m'ont encadré, supporté et conforté, durant ces 4 années passées à la Station Biologique de Roscoff, je leur dis :

MERCI !

La liste serait trop longue à établir mais ces personnes se reconnaîtront car grâce à elles j'ai pu arriver au terme de ma thèse.

Sans leur soutien et leurs conseils éclairés, rien n'aurait pu être fait, et je tenais à leur témoigner mon amitié et ma profonde reconnaissance.

Et finalement je remercie ma mère, cette femme exceptionnelle…

Sommaire

Remerciements : 2
Sommaire 4
1. Introduction 7
1.1. Le réchauffement climatique 7
1.2. L'Antarctique 9
1.3. L'Arctique 11
1.4. Le krill 13
1.4.1. Les Euphausiacés 13
1.4.2. Le krill d'Antarctique 16
1.4.3. Le krill d' « Arctique » 18
1.5. Effets de la température sur les espèces et adaptations thermiques 19
1.6. Le stress thermique 21
1.7. Les protéines de choc thermique (HSP) 24
1.8. Objectifs de la thèse 27
2. Détermination de la limite supérieure de la résistance thermique : CTmax et CT_{50} 30
2.1. Introduction 30
2.2. Matériels et Méthodes 32
2.2.1. Récoltes des animaux 32
2.2.2. CTmax et CT_{50} 33
2.3.1. CT_{50} à 0,1°C.min^{-1} 34
2.3.1.1. Espèces d'Antarctique 34
2.3.1.2. Espèce d'Arctique 37
2.3.2. CT_{50} : 1°C.$jour^{-1}$ & 0,33°C.$jour^{-1}$ 39
2.3.2.1. Euphausia superba 40
2.3.2.2. *Chorismus antarcticus* 41
2.4. Conclusion 42
3. Caractérisation moléculaire et phylogénie des Hsp70 44
3.1. Introduction 44
3.2. Matériels et Méthodes 45
3.2.1. PCR interne 45
3.2.2. Extraction ADN et purification 46
3.2.3. Ligation des produits PCR 46
3.2.4. Transformation de bactéries compétentes DH5α 46
3.2.5. PCR sur Clones 47
3.2.6. Purification ExoSap 47
3.2.7. Réaction de séquence et séquençage 47
3.2.8. Analyse phylogénétique 48
3.3. Caractérisation des Hsp70 48
3.4. Phylogénie moléculaire des Hsp70 54
4. Suivi de l'expression des *Hsp70* en réponse à une augmentation de la température du milieu 58
4.1. Introduction 58
4.2. Matériels et Méthodes 59
4.2.1. Protocoles expérimentaux des chocs thermiques 59
4.2.2. La PCR quantitative (qPCR) 60
4.2.2.1. Principe 60
4.2.2.2. Extraction d'ARN totaux 62

4.2.2.3. Rétro-transcription 64
4.2.2.4. Conception des amorces 66
4.2.2.5. Efficacité de qPCR 67
4.2.2.6. Quantification relative 68
4.2.2.7. Protocole 70
4.2.2.8. Statistiques 71
4.3. Résultats 71
4.3.1. Cinétiques d'expression de *E. superba* et *E. crystallorophias* 71
4.3.1.1. Choc thermique de 3°C 71
4.3.1.1.1. Choc thermique de 3h à 3°C et post-chocs à 0°C (figure 4-6) 73
4.3.1.1.2. Choc thermique de 6h à 3°C et post-chocs à 0°C (figure 4-6) 74
4.3.1.1.3. Observations Générales (3°C) 75
4.3.1.2. Choc thermique de 6°C 78
4.3.1.2.1. Choc thermique de 3h à 6°C et post-chocs à 0°C (figure 4-7) 79
4.3.1.2.2. Choc thermique de 6h à 6°C et post-chocs à 0°C (figure 4-7) 80
4.3.1.2.3. Observations Générales (6°C). 81
4.3.2. Cinétique d'expression chez *T. inermis* 82
4.3.2.1. Choc thermique de 6°C 83
4.3.2.1.1. Choc thermique de 3h à 6°C et post-chocs à 4°C (figure 4-8) 84
4.3.2.1.2. Choc thermique de 6h à 6°C et post-chocs à 4°C (figure 4-8) 85
4.3.2.1.3. Observations générales (6°C) 86
4.3.2.2. Choc thermique de 10°C 88
4.3.2.2.1. Choc thermique de 3h à 10°C et post-chocs à 4°C (figure 4-9) 89
4.3.2.2.2. Choc thermique de 6h à 10°C et post-chocs à 4°C (figure 4-9) 90
4.3.2.2.3. Observations générales (10°C) 91
4.4. Discussion 92
5. Cinétique d'expression des Hsp70 en réponse a divers chocs thermiques chez *Euphausia superba* 102
5.1. Introduction 102
5.2. Matériels et méthodes 103
5.3. Résultats 104
5.3.1. Chocs courts de 1h et 2h à 3°C et 6°C 104
5.3.1.1. Choc court 3°C (figure 5-1) 104
5.3.1.2. Choc court 6°C (figure 5-2) 106
5.3.1.3. Observations générales. 107
5.3.2. Choc thermique pendant 3h à 9°C et 12°C (figure 5-3) 107
5.3.3. Choc long (6 semaines) à 3°C (figure 5-4) 110
5.4. Discussion 113
6. Conclusion et perspectives 116
Bibliographie 121
Annexes - Amorces PCR *E. superba* et *E. crystallorophias* 130
Annexes - Amorces PCR *T. inermis* 131
Annexes – Articles soumis 132
Diversification , evolution and sub-functionalization of 70kDa heat-shock proteins in two sister species of Antarctic krill : Differences in thermal habitats, responses and implication under climate change. 132
Gene expression and physiological changes of the Antarctic krill *Euphausia superba* under different hypoxia intensities 187
Transcriptome and peptidome characterisation of the main neuropeptides and peptidic hormones of a Euphausiid: the ice krill, Euphausia crystallorophias. 218

Contrasting patterns of selection across duplicates shaped gene diversity of heat shock proteins in two species of Antarctic krill and their potential to adapt global warming 239
Table des illustrations..... 278
Tables des tableaux 281

1. Introduction

1.1. Le réchauffement climatique

Le réchauffement climatique est un phénomène qui entraine une augmentation progressive de la température du globe. Plusieurs fois observé au cours des temps géologiques par la succession de périodes dites glaciaire et interglaciaire, ce réchauffement peut survenir de manière cyclique et peut avoir plusieurs origines. Une origine astronomique (cycles de Milanković), dépendant de l'excentricité (trajectoire elliptique autour du soleil), obliquité (inclinaison terrestre), et précession (rotation terrestre). Une origine géologique comme par exemple la suractivité de super volcans telle qu'elle a été observée lors de la crise Permien-Trias. Ou encore une origine anthropique comme celle que nous vivons actuellement. Dans les trois derniers cas, le réchauffement global terrestre est provoqué par une accumulation de gaz à effet de serre dans l'atmosphère, emprisonnant le rayonnement solaire supposé être reflété dans l'espace. C'est l'accumulation anormale de ces rayonnements qui est à l'origine de l'augmentation de température (figure 1-1).

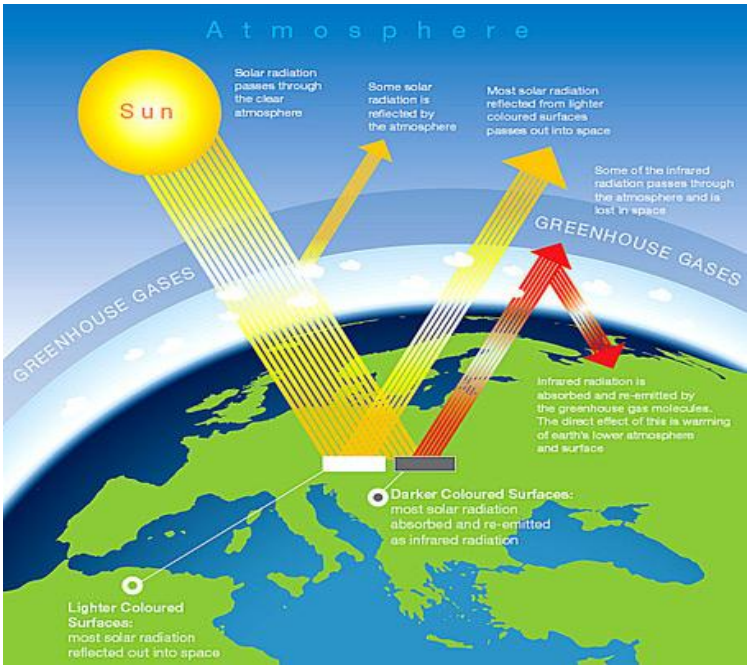

Figure 1-1 : Schéma représentant le réchauffement climatique par accumulation de gaz à effet de serre. Le rayonnement solaire reste emprisonné par l'atmosphère (flèche rouge). Est aussi représenté la meilleure capacité de réflexion des rayons lumineux par des surfaces blanches (albédo fort).

Dans le cas du changement climatique à origine anthropique, l'accumulation de gaz à effet de serre est provoquée par l'activité industrielle accrue lors du dernier siècle. La combustion de matériaux fossiles, la surexploitation de certaines ressources, et l'agriculture intensive amènent à une émission anormalement élevée de gaz à effet de serre. Les gaz du type CO2, Méthane, ou encore CFC, ont la propriété, à trop grande concentration dans l'atmosphère, de retenir le rayonnement solaire parvenant sur la terre. Ce rayonnement est généralement en grande partie réfléchi par la surface du globe avec différentes efficacités. Cette propriété de réflexion, appelé albédo, va dépendre du type de surface. Ainsi, la neige et la glace ont un fort albédo, les forêts ont un albédo moins grand, et les déserts et zones urbaines ont un albédo très faible (figure 1-1). La fonte des glaces, la déforestation, et l'industrialisation croissante diminuent l'albédo terrestre et sont autant de phénomènes s'ajoutant à l'accumulation de gaz à effet de serre, qui agissent en synergie pour l'augmentation de la température terrestre. L'origine anthropique du réchauffement climatique actuel est admise par la plus grande majorité de la communauté scientifique. Le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) prévoit une augmentation de la température moyenne du globe de 1,8°C à 4°C d'ici 2100 (Solomon *et al.*, 2007 IPCC). De plus, les dynamiques observées penchent plus en faveur d'une augmentation de 4°C, et ont tendance à démontrer que les prévisions du GIEC sont des sous estimations de la réalité. Lors de la dernière « crise climatique » majeure, il y a 251 Ma (fin du Permien), une accumulation trop grande de quantité de CO_2 dans l'atmosphère causée par une forte activité volcanique pendant plusieurs centaines d'années a provoqué une augmentation de la température moyenne du globe de 6°C. Cette hausse de température a été à l'origine de la plus grande crise biologique connue, avec 95% d'extinction des espèces terrestres et marines (Benton & Twitchett, 2003).
Une simple augmentation de la température peut avoir de tels effets sur la biosphère car elle est à l'origine d'une cascade de retombées environnementales qui amplifie le phénomène, notamment sur le milieu marin. Outre la température des océans, les changements vont impacter aussi la salinité de l'eau, les courants marins, les vents, induire une élévation du niveau des océans, diminuer la formation de la banquise, réduire l'oxygénation du milieu marin et acidifier les océans. L'acidification océanique est en effet directement liée à la quantité de CO_2 émise par l'activité industrielle. L'augmentation de la pression en CO_2 dans l'atmosphère induit alors une augmentation de la concentration en CO2 marin déplaçant les équilibres acido-basiques océaniques (figure 1-2) qui vont affecter directement le premier maillon de la chaine alimentaire que sont les producteurs primaires, soit les micro-algues.

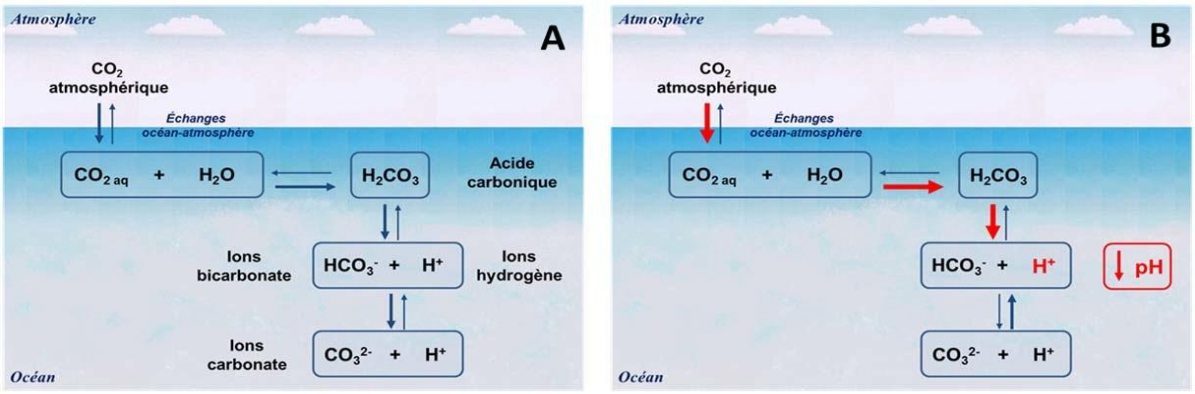

Figure 1-2 : Système du carbone et des carbonates**.** A : avant l'augmentation massive de la pCO2. B : dans un contexte d'acidification des océans. Les flèches rouges montrent le déplacement de l'équilibre et la diminution de pH induite par l'augmentation des ions H^+. (Noisette, 2014)

Il y a une augmentation des HCO^{3-} et H^+ et moins de disponibilité de CO_3^{2-}. L'augmentation de H^+ (diminuant le pH) agit en synergie avec la réduction de la disponibilité de CO_3^{2-} qui réduit la capacité de calcification. Cette calcification est surtout utilisée pour la formation des organismes photosynthétiques, qui de ce fait ne peuvent plus proliférer. L'impact direct est une diminution de la production primaire, une diminution de l'oxygénation des océans, et de la quantité de nutriments, avec bien sur des effets néfastes sur l'ensemble de la chaine alimentaire (Doney *et al.*, 2012).

En somme, l'augmentation de la température va générer des effets négatifs multiples sur les facteurs abiotiques et biotiques régissant la pérennité des espèces terrestres et marines. La modification de l'environnement est en cours et poursuit une dynamique rapide. Cette dynamique n'a pas la même vitesse à toutes les latitudes. Elle apparait plus rapide au niveau des pôles qui subissent d'ores et déjà de fortes modifications des conditions climatiques.

1.2. L'Antarctique

Le pôle sud abrite le quatrième plus grand continent de la planète. D'une superficie de 14 millions de mètres carrés et recouvert à 98% de glace, l'Antarctique est le continent le plus froid, le plus sec et le plus venteux, de la planète. Il est entouré d'un vaste océan, l'Océan Austral (ou Antarctique). Ce dernier est délimité par un courant marin appelé « courant circumpolaire » (figure 1-3), qui, comme son nom l'indique, est un courant ceinturant le continent antarctique et lui conférant des particularités, notamment thermiques.

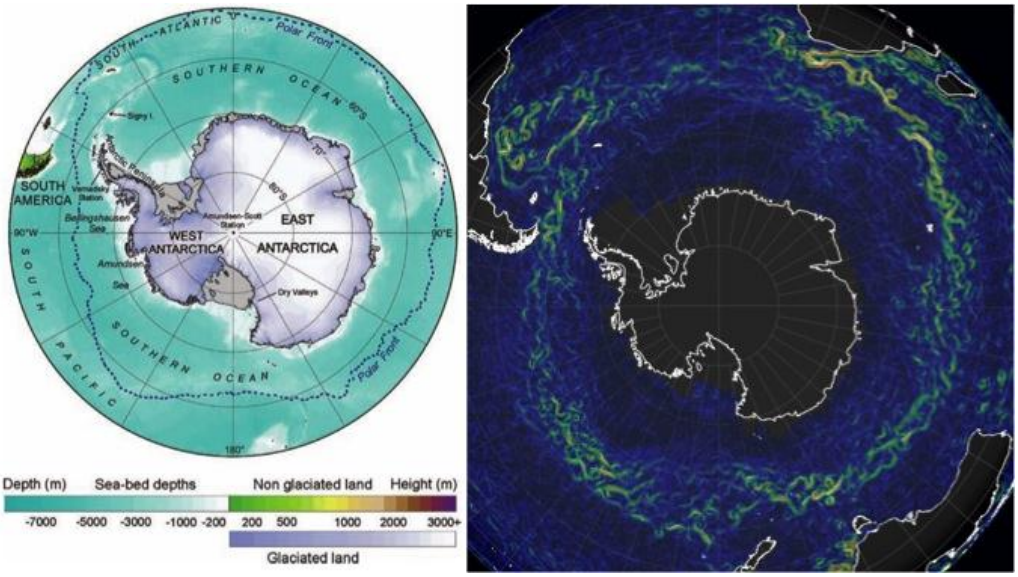

Figure 1-3 : Représentation du courant circum polaire, schématique (à droite) (Anisimov *et al.*, 2007), et par satellite (à gauche)(source : *earth wind map*)

En effet, l'océan Austral est l'océan le plus froid, grâce à ce courant qui empêche son brassage avec des eaux plus chaudes provenant des océans Indien, Pacifique, et Atlantique. Cet isolement explique qu'il existe, à l'échelle globale de cet océan, peu de variations de température (température moyenne 1°C), en faisant ainsi un environnement très particulier, pour la faune et la flore. Ces conditions uniques remontent à des temps géologiques, lors de la formation du continent. L'Antarctique faisait partie il y a 200Ma du Gondwana. Il y a 160Ma ce super continent se scinde, donnant naissance à l'Afrique et l'Inde. Plus tard, il y a 50Ma, c'est l'Océanie qui se sépare du continent Antarctique. À cette période (Eocène/Oligocène), une diminution du CO2 atmosphérique déclenche le début de la glaciation antarctique. Puis, à l'ouverture du passage de Drake (25Ma), cette tendance a été renforcée par l'établissement du courant circumpolaire qui isole thermiquement cette région (Lefebvre & Donnadieu, 2012). On peut donc considérer que l'océan austral est froid et stable depuis 25Ma.

Cette histoire géologique a des conséquences sur le biome d'Antarctique. Il présente un fort taux d'endémisme avec de nombreuses espèces sténothermes. Les animaux sténothermes antarctiques ont évolué sous de longues contraintes thermiques stables, et devraient avoir de faibles capacités d'acclimatation à des variations de températures. Cette « adaptation au froid » aurait mené à une perte de plasticité pour certains mécanismes physiologiques liés aux variations de température. A l'inverse, ces animaux ont développé des traits augmentant leur capacité à survivre à hautes latitudes (Peck *et al.*, 2010).

Or, en Antarctique, le réchauffement climatique a déjà des répercussions. La région de la Péninsule Antarctique a déjà subi lors des dernières décennies une augmentation de 3°C de la température de l'air et 1°C de la température de l'eau (Gille, 2002; Clarke *et al.*, 2007). De plus, la dynamique de recul récente de nombreux glaciers terrestres est inquiétante, et positionne à la hausse les prévisions sur la vitesse d'élévation du niveau la mer (Rignot *et al.*, 2014). Cette fonte massive aura donc pour effet la diminution de la salinité et l'augmentation de la température des eaux antarctiques. Les espèces antarctiques vivant dans cette région sont donc confrontées à des modifications hors normes de leur milieu. Ces modifications de l'environnement si elles perdurent ou pire s'amplifient, auront à n'en pas douter des conséquences graves sur la survie d'organismes clefs dans les réseaux trophiques de cette région du globe, et ainsi impacteront la productivité des océans à l'échelle du globe.

1.3. L'Arctique

Le pôle Nord, contrairement à l'Antarctique, est un océan (Océan Arctique), entouré de plusieurs continents (figure 1-4). C'est une région géographiquement définie par le cercle Arctique (66°33'N). Elle possède en son centre une large superficie de banquise, qui varie au cours de l'année en fonction des saisons. L'océan Arctique est le plus petit océan du monde (14 MKm2). C'est aussi un océan froid qui a un rôle primordial dans la régulation du climat mondial. En effet, cet océan froid semi-fermé a deux « ouvertures » : une sur le Pacifique et une sur l'Atlantique Nord. Cette géographie est à l'origine du principal moteur des courants océaniques. Les incursions d'eaux chaudes (figure 1-4), principalement atlantiques mais aussi pacifiques, sont refroidies au niveau du pôle, libèrent leur chaleur dans l'atmosphère, et une fois refroidies plongent par différentiel thermique et salin. C'est le moteur de la circulation thermo-haline qui alimente les courants océaniques mondiaux. Ce courant sous boréal fait que l'Océan Arctique bien que globalement froid, est sujet localement à des variations thermiques. La faune et la flore arctiques, comme en Antarctique, sont soumises à des conditions environnementales extrêmes, notamment en terme de température. Cependant, l'isolement à des températures basses, est plus récent (Dunton, 1992), et n'est pas aussi marqué que dans l'océan Austral. En Arctique, chaque année la fonte de la calotte polaire bat des records, et l'Océan Arctique s'est lui aussi réchauffé, en raison du réchauffement des eaux atlantiques. Cette augmentation de 1°C observée lors des 50 dernières années contribue à la fonte

anormale de la banquise, réduisant l'albédo, et par rétrocontrôle négatif favorise la fonte de la calotte polaire (Polyakov *et al.*, 2010).

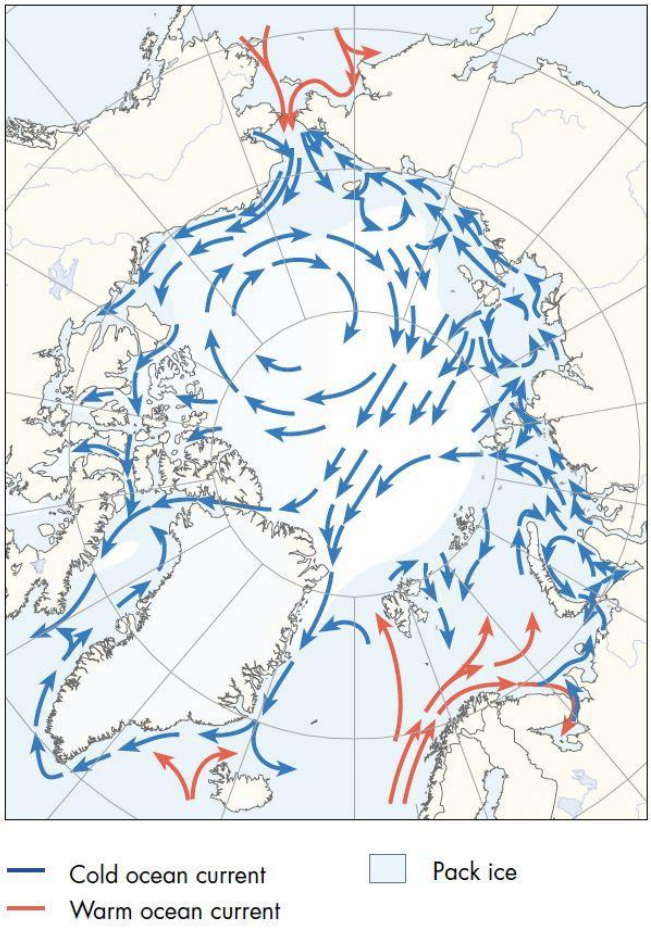

Figure 1-4 : Carte des courants marins froids (bleu) et chauds (rouge) de l'océan Arctique

Le taux d'endémisme des espèces arctiques est bien moins grand que celui des espèces antarctiques. Les espèces présentes dans ces eaux sont des espèces originaires du Pacifique et de l'Atlantique possédant une forte tolérance au froid. Le réchauffement de cette région et le recul croissant de la banquise peuvent être à l'origine de modifications des communautés animales et végétales. Les organismes vivant dans ces régions auraient des capacités de réponse à l'augmentation de température plus importantes que leurs congénères antarctiques en raison d'un passé évolutif différent et plus fluctuant, qui aurait permis une conservation de leur plasticité physiologique.

Chaque pôle a sa propre histoire qui impacte les capacités d'adaptation des espèces animales comme végétales dans chaque région. Néanmoins les modifications environnementales observées durant les dernières décennies ne peuvent être sans conséquences sur les équilibres trophiques. Il est donc primordial de pouvoir prédire l'évolution possible des biotopes arctique et antarctique face au réchauffement climatique.

Les pôles ont un point commun en terme de communauté animale. Le nombre de maillons de ces chaines est réduit en comparaison à d'autres écosystèmes, et ces chaines comportent toutes un maillon essentiel : Le krill. Son importance clé réside dans sa position de consommateur primaire qui lie la production primaire aux consommateurs secondaires. Ainsi, il est à la base des réseaux trophiques de ces deux régions en alimentant les petits comme les grands prédateurs polaires.

1.4. Le krill

1.4.1. Les Euphausiacés

Les Euphausiacés sont des petits crustacés ressemblant à des crevettes. Ils appartiennent àau superordre des Eucarides, et comme tout eucaride, ils ont des yeux pédonculés et une carapace soudée à l'ensemble des segments thoraciques.

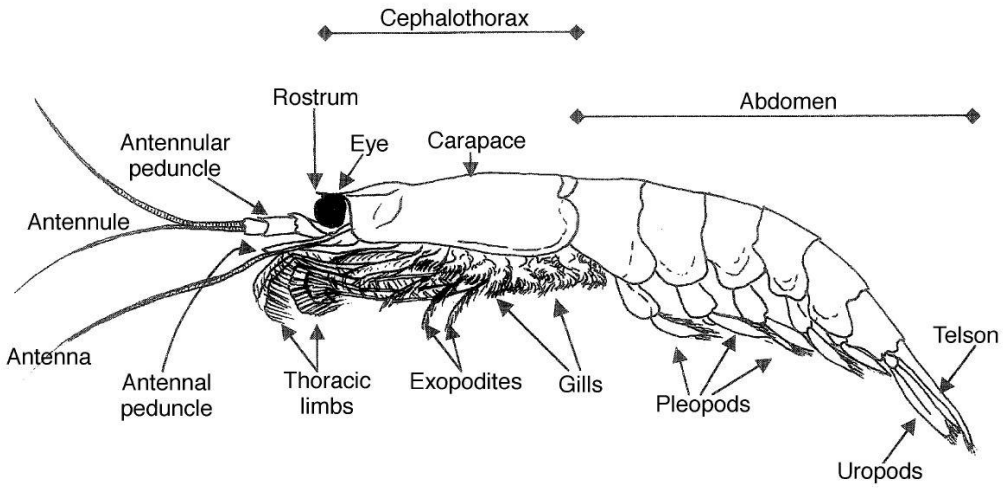

Figure 1-5 : Schéma général d'un euphausiacé montrant les caractères morphologiques principaux. (Baker *et al.*, 1990)

Elle ne recouvre pas les branchies. Leur plan d'organisation comprend 6 segments céphaliques, 8 thoraciques, et 6 abdominaux comme tout Malacostracé, et les parties céphalique et thoracique sont fusionnées en un céphalothorax.

Les appendices céphaliques sont composés de deux paires d'antennes (dont la seconde paire est biramée), de mandibules, des maxillules et des maxilles. En partie thoracique se trouvent 8 paires péréiopodes biramés, spécialisés dans la filtration de l'eau permettant la nutrition. La partie thoracique porte des branchies externes plumeuses. En partie abdominale, les 5 premiers segments comportent des pléopodes permettant une partie de la fonction de locomotion et le dernier segment porte les uropodes et le telson qui constituent la palette natatoire (figure 1-5). La plupart des espèces d'euphausiacés ont des photophores qui se trouvent derrière les yeux pédonculés et en partie sous-abdominale entre les paires de pléopodes au niveau des segments 1 à 4.

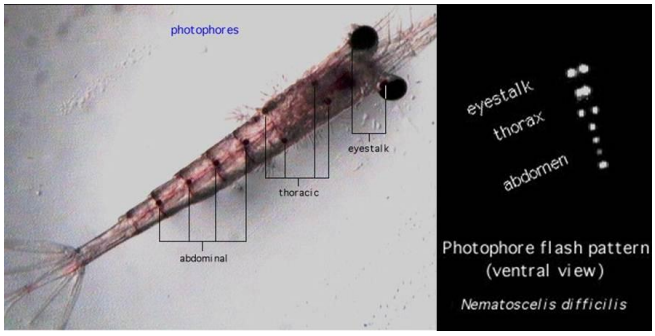

Figure 1-6 : vue ventrale de krill mettant en évidence les photophores à la lumière (à droite) et dans l'obscurité.

(Source : Euphausiids of the World Ocean)

Le terme d'euphausiacé provient du grec *eu-* signifiant « vrai » *et –phausia* pour « brillant », ce qui fait référence à ces photophores qui peuvent émettre de la lumière (figure 1-6). Cette émission de lumière bleutée n'est actuellement pas totalement comprise mais pourrait s'apparenter à une forme de communication. Un synonyme dans la langue courante des euphausiacés est le terme de « Krill ». Il était utilisé par les baleiniers norvégiens qui décrivaient ces essaims de petits crustacés comme des « bancs de petits poissons », et est désormais employé communément en référence aux euphausiacés.

Le krill vit dans la colonne d'eau, généralement dans la zone supérieure à 400m (sauf *Euphausia superba* qui a été observée jusqu'à 3000 mètres) (Clarke & Tyler, 2008). Il est filtreur et se nourrit principalement de phytoplancton. Il peut mesurer en moyenne de 10 à 60 mm de long, et se déplace pour certaines espèces en bancs compacts de plusieurs millions

d'individus. Ils effectuent alors des migrations nycthémérales, se nourrissant du phytoplancton la nuit à la surface et retournant dans les profondeurs pendant la journée, diminuant ainsi les risques de prédation.

Le krill occupe une place primordiale dans les chaines trophiques océaniques mondiales. En effet, en tant que consommateur primaire c'est la proie privilégiée de tous les types de prédateurs, des poissons aux baleines, en passant par les oiseaux marins. Les euphausiacés ont une longévité variable en fonction de l'espèce allant de un à sept ans. La maturité sexuelle est atteinte lorsque les individus atteignent 60% de leur taille adulte. Chaque femelle peut pondre jusqu'à plusieurs milliers d'individus, et la ponte se fait dans la colonne d'eau, du printemps à l'été selon les espèces. Ainsi le développement des larves se fait sans soins parentaux (sauf le genre *Nyctiphanes*). Le développement des larves est indirect : la larve éclot au stade Nauplius, puis évolue en Metanauplius, Calyptosis, Furcilia, et finalement juvénile où l'animal acquiert la morphologie de l'adulte. La forte capacité reproductrice de ces espèces, ainsi que leur mode de vie, est à l'origine de leur forte abondance. En effet, leur biomasse est très élevée à l'échelle de la planète (200 millions de tonnes Hill *et al.*, 2013) ce qui en fait une cible privilégiée pour la pêche.

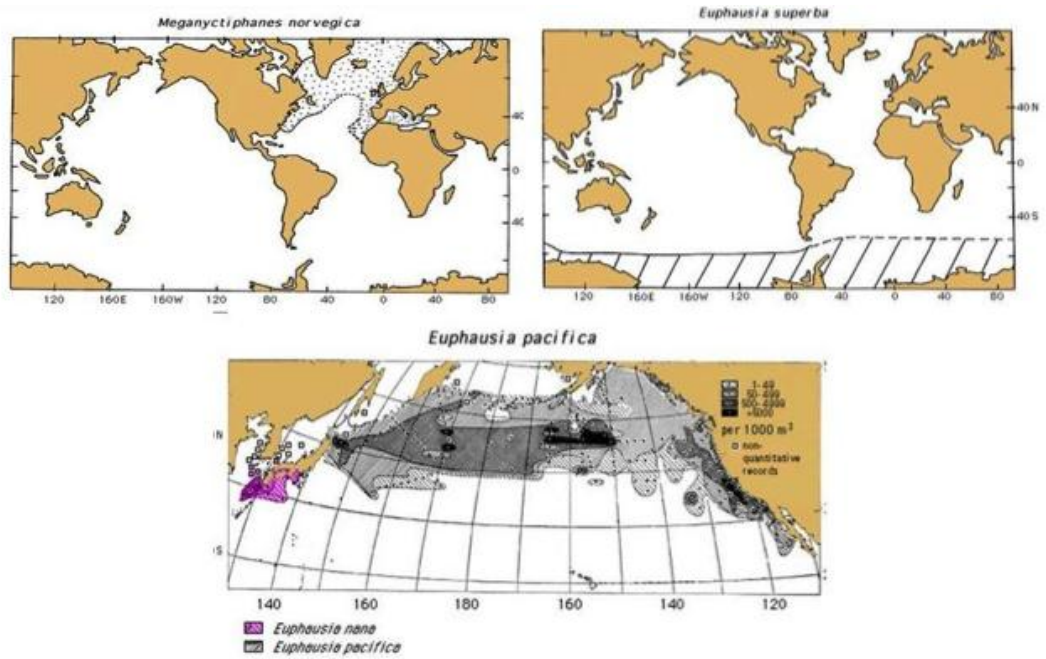

Figure 1-7 : Cartes montrant la répartition des espèces de krill les plus abondantes.

(Source : Euphausiids of the World Ocean)

Il existe à ce jour 86 espèces d'euphausiacés recensées. Ces espèces sont réparties sur la totalité des océans du globe, d'un pôle à l'autre en passant par les tropiques. Cette diversité d'habitats marins, montre la capacité de l'ordre à coloniser avec succès les différentes niches. Ainsi, on retrouve différentes espèces de krill pour tous les types de climats. Cependant les plus fortes biomasses rencontrées sont constituées en Atlantique Nord par l'espèce *Meganyctiphanes norvegica*, dans le Pacifique nord par *Euphausia pacifica* et dans l'Océan Austral par *Euphausia superba* (figure 1-7). Toutes ces espèces, de par leur abondance, représentent les cibles privilégiées de la pêche industrielle. La plus forte biomasse revient à *E. superba* qui représenterait plus de 200 millions de tonnes dont 200 000 tonnes sont exploitées intensivement dans l'océan austral (Atkinson *et al.*, 2009).

Les euphausiacés sont donc présents dans toutes les niches thermiques océaniques qu'ils ont colonisées via des épisodes distincts et des histoires évolutives bien différentes, avec potentiellement des réponses différentes face à une élévation de températures. Leur survie dans un environnement changeant gouverné par le réchauffement climatique est capitale pour l'équilibre des chaines trophiques terrestres. Au niveau des pôles, le krill occupe une position trophique encore plus vitale, et représente une biomasse encore plus grande qu'ailleurs sur terre.
Leur capacité d'acclimatation et d'adaptation à un environnement changeant impactera nécessairement l'ensemble des écosystèmes Arctiques et Antarctiques.

Dans le cadre de notre étude nous focaliserons sur 3 espèces : 2 antarctiques ayant des répartitions légèrement différentes et une espèce arctique.

1.4.2. Le krill d'Antarctique

En Antarctique, le froid constant et le courant circumpolaire, ont été des moteurs de la spéciation à l'origine d'un fort taux d'endémisme. C'est le cas des 2 espèces étudiées, *Euphausia superba* (krill antarctique *stricto sensu*) et *Euphausia crystallorophias* (appelé aussi krill des glaces) sont deux espèces sœurs issues d'une spéciation allopatrique (*i.e* dont le moteur a été une séparation géographique entre les espèces), datée d'il y a 20Ma, et générée par l'établissement du courant circumpolaire qui a isolé géographiquement des populations d'un ancêtre commun subantarctique dans la zone antarctique (Patarnello *et al.*, 1996a). *E.*

superba et *E. crystallorophias* sont donc deux espèces isolées géographiquement dans un environnement thermiquement très stable, ne subissant rarement plus d'1°C de variation, et avec une température moyenne de 0°C. Elles sont considérées de ce fait comme sténothermes. Bien que très proches phylogénétiquement, *E. superba* et *E. crystallorophias* ont des aires de répartition distinctes voire exclusives (figure 1-8). *E. crystallorophias* est épipélagique avec une distribution néritique. On la retrouve au large du continent au dessus du plateau continental et à faible profondeur (<500m). C'est une espèce très inféodée à la glace. Son cycle de vie est en effet dépendant de la formation de la banquise. *E. crystallorophias* vit pendant la plus grande partie de sa vie sous la banquise où les œufs éclosent et où les larves croissent en se nourrissant des algues poussant sous la glace, ce qui en fait une espèce herbivore exclusive.

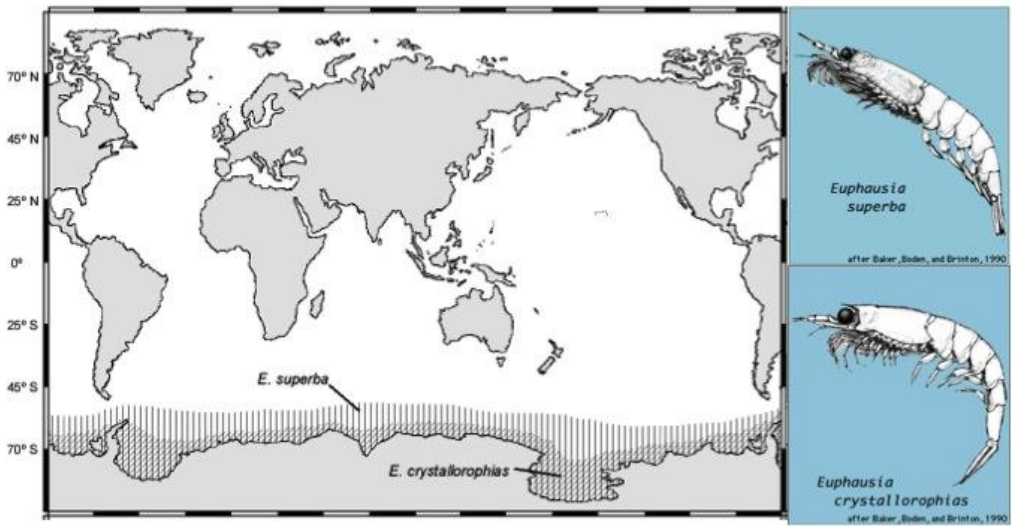

Figure 1-8 : répartition de deux espèces de Krill d'Antarctique (à gauche) et leur morphologie (à droite), *Euphausia superba* et *Euphausia crystallorophias* (Jarman et al., 2000)

De plus, *E. crystallorophias* a une période de ponte qui survient avant le bloom estival austral. Cette stratégie reproductrice montre que *E. crystallorophias* se sert de ses réserves hivernales pour se reproduire, et n'est donc pas dépendante de la période de bloom (Falk-Petersen *et al.*, 2000). En revanche, *E. superba* est une espèce pélagique, qui se retrouve aussi parfois au niveau du plateau continental, mais essentiellement au large de celui-ci (figure 1-8). Son cycle de vie diffère légèrement car contrairement à *E. crystallorophias*, les œufs d'*E. superba* coulent au fond de l'océan (1000 m). Une fois éclos, la maturation de la larve se fait lors de la remontée à la surface où, une fois le stade juvénile atteint, ils se nourrissent et se protègent des prédateurs sous la glace (Nicol, 2006). *E. superba* est aussi une espèce ayant un régime

alimentaire plus opportuniste et pouvant se nourrir de zooplancton en l'absence de bloom phytoplanctonique. Cependant, sa période de reproduction est dépendante des blooms de diatomées estivaux australs.

Dans la région de la Péninsule Antarctique qui est déjà la plus impactée par la hausse de température, on observe un effet de la modification de l'environnement sur les densités de krill. La densité d'*E. superba* dans cette région diminuerait sous l'effet d'une hausse de température, et sous la pression de la pêche, libérant de plus en plus des niches colonisées par des salpes plus thermotolérantes (Atkinson *et al.*, 2004a; Murphy *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2013). Peu de choses sont connues sur l'impact de ces changements sur *E. crystallorophias*, et il est donc difficile de prédire la tolérance de cette espèce à des variations de son environnement. Cependant la différence de répartition entre *E. superba* et *E. crystallorophias* peut être à l'origine d'une variation de la réponse physiologique à ces nouvelles contraintes, car les niches occupées par chaque espèce ne sont pas soumises aux mêmes contraintes environnementales.

1.4.3. Le krill d' « Arctique »

En Arctique, ainsi que dans l'Atlantique Nord l'espèce prédominante est *Meganyctyphanes norvegica*. On la retrouve de la Méditerranée au cercle arctique (figure 1-9). Cette vaste distribution ne fait pas d'elle une « vraie » espèce polaire. En revanche, on trouve l'espèce *Thysanoessa inermis* uniquement à de hautes latitudes (figure 1-9). Bien qu'elle ne soit pas strictement polaire non plus, elle est tout de même inféodée à des eaux plus froides. Lors de cette étude nous nous focaliserons sur cette espèce plus boréale.

Cette espèce, comparable à *E. crystallorophias*, est elle aussi herbivore, et accumule des réserves sous forme de lipides qui lui serviront, après la période hivernale, à se reproduire (Falk-Petersen *et al.*, 2000; Siegel, 2000). Cependant, bien que ces 2 espèces soient dites « polaires », *T. inermis* vit dans un environnement plus variant que *E. crystallorophias.* Les eaux arctiques ont une température moyenne de 4°C et peuvent subir des variations plus grandes. Au sein de la colonne d'eau la température peut varier de 2 à 6°C, et s'ajoutant à cela, certains courants marins plus chauds provenant de l'Atlantique Nord peuvent créer des incursions de masses d'eaux plus chaudes, à 10-12°C.

T. inermis serait, à cause de son environnement, beaucoup plus amené à subir des variations de températures relativement plus importantes que les espèces australes, suggérant le maintien d'adaptations aux variations thermiques, contrairement aux espèces Antarctiques. Ainsi, cette espèce permettra une comparaison des capacités de résistance thermique et d'estimer l'influence de l'histoire évolutive sur la capacité de réponse à une modification de la température dans les environnements polaires.

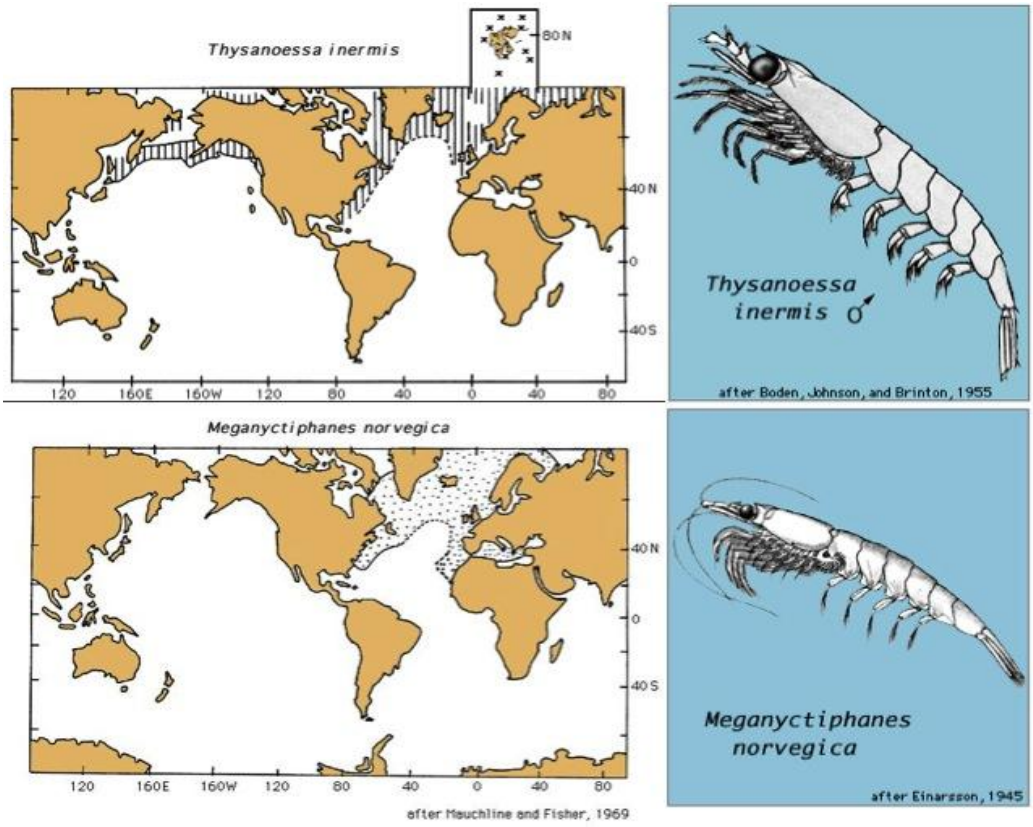

Figure 1-9 : Répartition de deux espèces de krill d'Arctique (à gauche) et leur morphologie, (à droite) *Meganyctiphanes* norvégica et *Thysanoessa inermis*.

(Source : Euphausiids of the World Ocean)

1.5. Effets de la température sur les espèces et adaptations thermiques

La température est un des paramètres primordiaux régissant la vie d'un organisme, car elle est à l'origine de grands changements dans les systèmes biologiques. De plus, dans ce contexte de changement climatique global, l'étude de la réponse à un stress thermique est devenue une priorité en prévision des changements des écosystèmes mondiaux. La compréhension des mécanismes physiologiques en réponse à un stress thermique permet d'établir les limites de

tolérance des animaux (figure 1-10), et ainsi de comprendre leur répartition et survie (fitness). En effet, au delà d'une certaine température la vie est impossible, et bien que certains organismes dit extrêmophiles remettent en question la capacité de tolérance thermique, il est néanmoins très rare d'observer un cycle de vie complet à des températures très chaudes (>50°C) comme très froides (<-2°C). Cette incapacité est principalement due à l'effet de la température sur les processus biologiques de base à l'échelle moléculaire qui influe sur l'activité cellulaire, des organes et de l'organisme. En effet, la température gouverne l'activité métabolique en influant sur les réactions biochimiques. Les cinétiques des réactions vont varier en fonction de la température selon le facteur de Boltzmann ($e^{-E_i/kT}$) (Gillooly *et al.*, 2001). Ces processus biologiques ont un fonctionnement optimal à certaines températures. Or, quand la température varie, l'activité métabolique varie aussi mais n'est plus à son efficacité optimale. Dans le cas d'une augmentation de cette activité cette dernière ne peut durer car le coût de production d'autant d'énergie est trop grand. En revanche, lorsque que l'activité métabolique diminue, c'est la production en énergie qui est insuffisante. Il existe toutefois un ensemble de processus moléculaire et physiologique, acquis au cours de l'évolution par sélection naturelle, qui vise à maintenir le taux métabolique malgré les variations de température (Clarke, 2003). C'est l'ensemble de ces mécanismes qui confère aux organismes leur gamme de tolérance à la température.

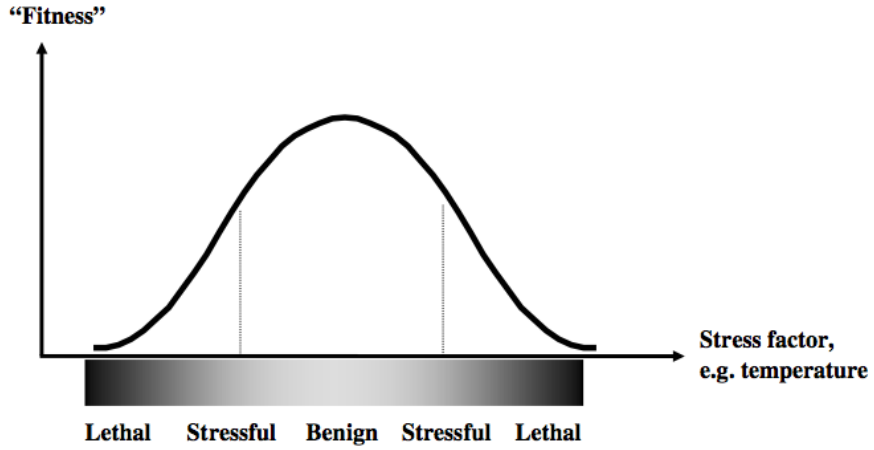

Figure 1-10 : Relation hypothétique entre la fitness et la quantité de stress appliquée a un organisme. Lorsque le niveau de stress atteint un certain seuil, l'organisme devient stressé. Le niveau de stress est le produit de la quantité, du temps d'exposition et de la sensibilité des espèces et du stade de vie. (Sørensen & Loeschcke, 2007)

Le coût de la production métabolique va donc varier en fonction de la température. Cependant, la différence de coût en terme de quantité ne va pas varier de la même manière selon que les organismes sont adaptés ou non à un environnement. Le coût du maintien va donc être le principal facteur influençant la fitness d'un organisme. En effet, la production de facteurs (tels que des molécules chaperonnes ou des variants plus résistants aux changements de température) en faveur de ce maintien va induire un coût de production au détriment d'autres caractères tels que la reproduction et la croissance.

Ainsi les organismes polaires présentent théoriquement des variations plus grandes de maintien, comparés à des organismes vivant dans des environnements variant, dues aux pressions évolutives caractérisant les milieux polaires.

Un bon exemple caractérisant les capacités de résistance aux variations de températures va être la respiration. Le taux de respiration, qui caractérise le métabolisme, va varier en fonction de la température et aura tendance à augmenter avec la température. Cependant le taux respiratoire ne peut continuellement augmenter, il existe un seuil à partir duquel le taux n'augmente pas, et est régulé pour être maintenu à une valeur maximale. Cette valeur seuil atteinte, le coût de la respiration reste très élevé, et va engendrer un stress oxydatif, voire un arrêt de la respiration et un changement vers un métabolisme anaérobique. Cela est du principalement au fait que la concentration en oxygène diminue dans l'eau avec l'augmentation de la température, et que l'effort de respiration est trop grand et insuffisant pour palier à la demande énergétique.

Ainsi la capacité respiratoire, et ses adaptations, va être un paramètre primordial régissant la distribution des espèces et la tolérance à la hausse de température dans l'environnement.

Ce stress va engendrer l'accumulation de molécules et métabolites ayant un effet délétère sur la cellule.

1.6. Le stress thermique

Il est difficile de définir correctement ce qu'est un stress thermique. Car le terme de stress est souvent utilisé à mauvais escient. On considère que le stress est un stimulus (quel qu'il soit) inhabituel infligé à un organisme. Ainsi, on pourrait dire que le stress thermique est une température anormale infligée à un organisme. Or, la définition de stress au sens biologique et médical va être l'ensemble des réponses physiologiques provoqué par un facteur qu'il soit biotique ou abiotique. Le stress thermique peut donc être considéré comme l'ensemble des

réactions physiologiques et moléculaires liées à une modification de la température, que ce soit une augmentation ou une diminution. La température a des effets multiples sur la biologie, et l'influence sur les réactions enzymatiques va à elle seule engendrer une cascade de conséquences pouvant être considérée comme un stress.

Au niveau de la respiration, l'augmentation de l'activité de la chaine respiratoire va engendrer la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), c'est à dire à forte capacité oxydante. La plupart du temps, la production de ROS augmente avec la respiration et augmente encore plus lorsque le métabolisme anaérobique est déclenché. L'oxydation de manière générale créera des dommages cellulaires au niveau des protéines comme des lipides, avec la peroxydation des membranes sous l'action des ROS qui entrainera la rupture des membranes. Il existe des mécanismes de défense aux ROS. Ces mécanismes ont pour rôle de réduire voir supprimer leur pouvoir oxydant.

La production de ROS indicateur de stress va être dépendante de la capacité d'oxygénation des organismes. De plus, la concentration en oxygène dans le milieu marin va être, entre autre, dépendante de la température. Ainsi, plus la température augmente plus l'oxygène dissous diminue. Chez les Euphausiacés, il est intéressant d'observer que *Euphausia superba,* (qui est une espèce antarctique), à un seuil critique de respiration, a une pression partielle en oxygène (pO2) élevée comparée à d'autres espèces non polaires (figure 1-11). *E. superba* déclencherait donc son métabolisme anaérobique à une pO2 plus élevée que des espèces non polaires (Tremblay, 2014). Si on relie ces données à la température la respiration de cette espèce sera plus affectée qu'une autre suite à une faible augmentation de température, et la production de ROS engendrera des dommages cellulaires plus grands.

La température génère des dommages cellulaires, et ne le fait pas uniquement via la production de ROS. Elle agit aussi directement sur la stabilité des protéines. Les protéines ont toutes une conformation tridimensionnelle leur conférant une spécificité d'action. Cette structure 3D est dépendante des liaisons peptidiques au sein de la protéine (structure primaire et secondaire) et des interactions électrostatiques et covalentes qui permettent d'autres repliements participant à la structuration de la protéine (structure tertiaire et quaternaire). Les interactions électrostatiques dépendent de l'énergie d'activation des molécules qui est elle même dépendante de la température (constante de Boltzmann). Ainsi, l'augmentation de la température va avoir tendance à rompre ces liaisons faibles, modifiant ainsi la structure 3D des protéines qui vont perdre leur spécificité d'action. Un ensemble de protéines nécessaire au

bon fonctionnement de la cellule peut donc être sous l'influence de la température et être inactivé voire complètement dénaturé créant des agrégats nocifs pour la cellule. Il existe chez quasiment tous les organismes, des mécanismes de protection à ce type de dénaturation, acquis et très conservé au cours de l'évolution.

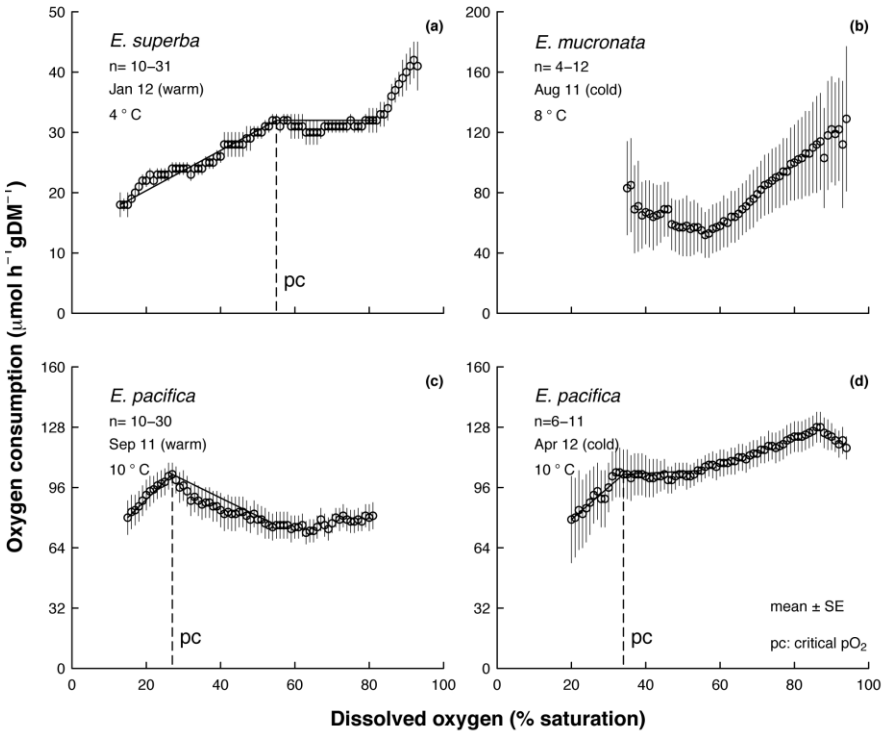

Figure 1-11 : Consommation d'oxygène (µmol O2 h-1 g DM-1) en chambre de respiration, avec une saturation en oxygène contrôlée (% saturation) d'*Euphausia superba* (a), *Euphausia mucronata* (b), and *Euphausia pacifica* (de courants chaud : c, et froid: d); moyenne ± erreur standard. (Tremblay, 2014)

Les molécules impliquées dans ces mécanismes sont principalement des protéines appelées « Protéines de choc thermique » (heat shock proteins ; HSP). Ces protéines ont une activité dite chaperonne, c'est à dire que leur rôle est d'aider les protéines dénaturées par la température à réacquérir leur conformation originelle. Découvertes dans les années 1960, elles ont été mises en évidence suite à un choc thermique qui déclenchait une transcription accrue dans les cellules (Ritossa, 1962). Depuis, ces molécules ont été le sujet d'un nombre pléthorique d'études et ont été retrouvées dans tous les phylums. Cette haute conservation au cours de l'évolution démontre l'importance de leur rôle au sein du vivant. De plus, leur activité a été démontrée comme étant un des mécanismes essentiels à la résistance d'un organisme aux changements de températures (Bettencourt *et al.*, 1999a).

Il existe toutefois des exceptions. Il a été en effet démontré que certains organismes avaient perdu ces protéines au cours de l'évolution et avec elle la capacité de réparation des protéines suite à un choc thermique. C'est le cas notamment de certains organismes antarctiques, qui en raison d'un environnement froid et particulièrement stable depuis des millions d'années, auraient contre sélectionné la réponse HSP (Clark & Peck, 2009). Elles constituent par conséquent un champ d'étude pertinent dans le cadre de l'étude de la réponse du krill à un stress thermique.

1.7. Les protéines de choc thermique (HSP)

Les HSP sont des molécules dites chaperonnes qui vont avoir pour rôle de prévenir les agrégats de protéines, renaturer les protéines dénaturées, et solubiliser les agrégats (Mayer & Bukau, 2005).

Elles doivent leur nom au fait que ces protéines ont été caractérisées après des augmentations de température. Présentes dans presque tous les organismes, elles confèrent des capacités de résistance à la température, mais aussi à d'autres inducteurs de stress tels que les polluants, le pH, ou la pression osmotique. Les HSP sont une famille de protéines qui vont toutes participer et coordonner la réponse au choc thermique afin d'éviter l'apoptose d'une cellule face à un facteur dénaturant. Elles sont classées en fonction de leur masse moléculaire. Ainsi, il existe des HSP de tailles diverses, des plus grosses d'une centaine de kilo-daltons jusqu'aux plus petites de 10 kilo-daltons (Lindquist, 1986). Bien que le rôle de chaque type d'HSP ne soit pas encore clairement défini, elles auraient toutes une fonction bien spécifique agissant en synergie dans la réponse à un stress.

Au sein de cette famille, les Hsp70 (pour 70kDa) sont certainement les HSP les plus étudiées et les mieux connues. En effet, cette Hsp70 apparait comme la plus réactive dans le processus de réponse à un choc thermique. Elle est activée et synthétisée en réponse directe à une augmentation de température. De plus, elle est au cœur de la régulation puisqu'une fois activée par la présence de protéines dénaturées, elle libère un facteur de transcription du gène codant pour la transcription d'autres Hsp70 de la même famille (Morimoto, 1998). Ainsi elle autorégule son expression afin de fournir une réponse proportionnelle à la dénaturation infligée à la cellule (figure 1-12).

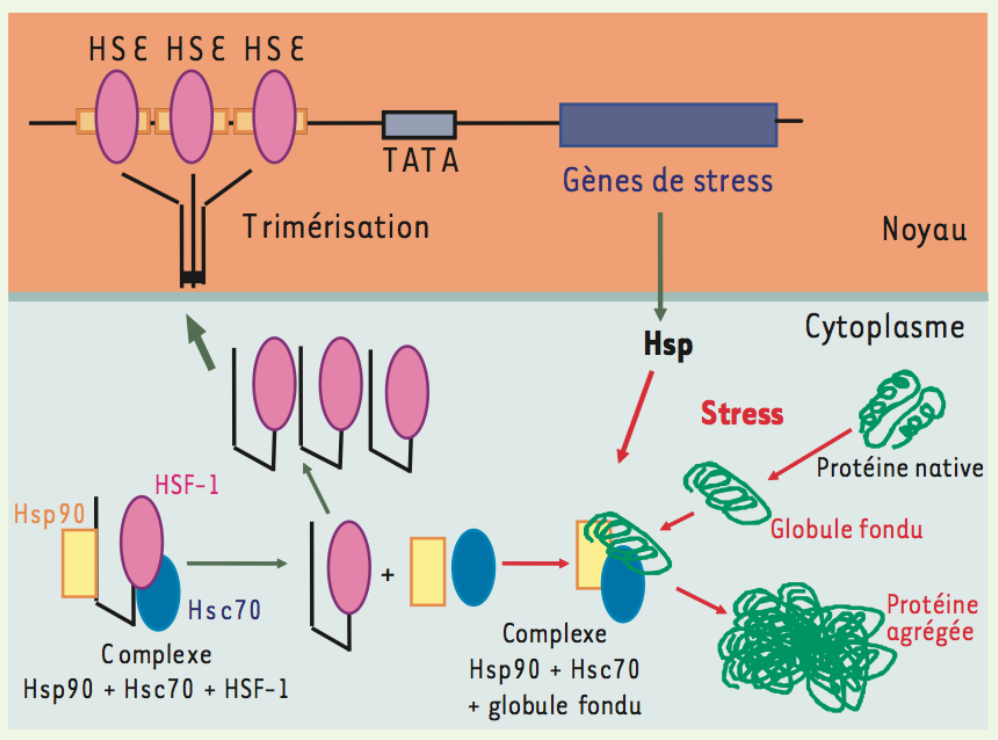

Figure 1-12 : Activation transcriptionnelle des gènes codant pour les HSP. Les protéines présentent plusieurs états de repliement. Entre la forme native et l'état agrégé, il existe des états intermédiaires comme les structures du type globule fondu. Dans des conditions de choc thermique, la concentration en globules fondus augmente de manière significative. Les globules fondus sont reconnus par Hsc70 et Hsp90, des protéines chaperons résidentes de la cellule non stressée ; le complexe formé entre Hsp90, Hsc70 et les globules fondus est plus stable que celui que formaient dans la cellule non stressée ces Hsp avec le facteur de transcription HSF-1. Celui-ci est alors modifié (phosphorylation, trimérisation) et migre dans le noyau où il interagit avec les motifs HSE (heat shock element) localisés dans les promoteurs des gènes codant pour les *Hsp*. La grande quantité de Hsp produite permet de replier les globules fondus, et d'agir négativement sur HSF-1 (heat shock transcription factor-1) en le maintenant à nouveau inactif dans le cytoplasme, ce qui explique la réversibilité du phénomène. (Arrigo, 2005)

La synthèse d'Hsp70 va donc être un élément essentiel de la réponse au choc thermique. De plus, l'activation de l'Hsp70 ne se fait pas à n'importe quelle température. Il semblerait que les Hsp70 soient activées et transcrites massivement lorsqu'un organisme atteint son seuil de tolérance pour un facteur abiotique donné (température, oxygène, polluants…etc) (Sørensen & Loeschcke, 2007) c'est à dire lorsque les dégâts cellulaires sont importants (figure 1-13).

Cette particularité fait de l'Hsp70 une molécule très informative sur l'état de stress cellulaire. Dans un contexte de réchauffement climatique où de nombreux paramètres sont amenés à subir des variations, l'Hsp70 contribue à la mesure fine de la résistance d'un organisme à une

contrainte. Ceci positionne cette molécule comme un potentiel bio-marqueur de stress visant à prédire les effets du réchauffement climatique sur les communautés animales marines (Colson-Proch *et al.*, 2010).

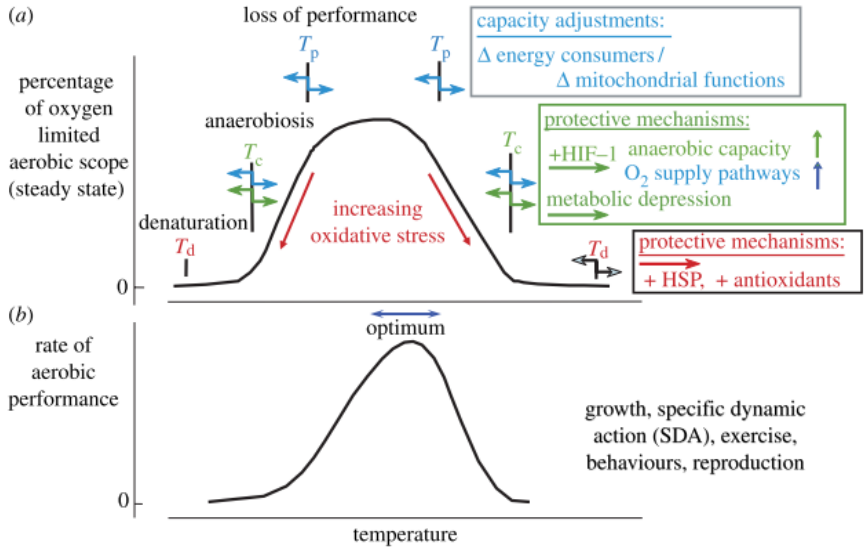

Figure 1-13 : Modèle de la limitation thermique et du fonctionnement optimale d'une espèce (Pörtner *et al.*, 2007a)

Chez les organismes polaires l'utilisation de l'Hsp70 comme bio-marqueur du réchauffement climatique est de plus en plus répandue, cependant elle est soumise à discussion. La réponse HSP chez ce type d'organisme n'est pas similaire à celle d'autres organismes non polaires. En effet, l'histoire évolutive des espèces polaires risque d'avoir une influence directe sur la présence et l'intensité de cette réponse. Bien que la réponse HSP semble être un mécanisme très conservé évolutivement, il s'avère que chez certains organismes adaptés au froid celui-ci ait disparu, ou qu'il ait perdu sa plasticité. Par exemple (Clark *et al.*, 2008a) mettent en évidence l'absence d'expression d'*Hsp70* lors d'un choc thermique expérimental chez *Odonaster validus* (l'étoile de mer antarctique) et *Paraceradocus gibber* (un amphipode antarctique), contrairement à d'autres organismes comme *Laternulla elliptica* et *Nacella concinna (respectivement bivalve et gastéropode Antarctiques)* (Clark *et al.*, 2008b). Dans ce cas l'absence de réponse au choc thermique n'est donc pas un indicateur fiable de l'état de stress d'un organisme.

1.8. Objectifs de la thèse

Les conséquences physiologiques sur les organismes, notamment leurs performances reproductrices, la survie de leurs larves ou leur capacité de résistance peuvent être directement liées à la température. Elles seront d'autant plus importantes que les organismes, en particulier les ectothermes, sont susceptibles d'avoir perdu, pendant ce long isolement, leur capacité à gérer des variations élevées de la température dans leur milieu. Mais les changements indirectement liés aux fluctuations de la température tels que l'abondance, la nature des composants de la chaine alimentaire ou encore l'arrivée d'espèces exotiques peuvent aussi influer notablement sur le recrutement des espèces dans une région impactée et ainsi masquer les effets directs de la température (Pörtner *et al.*, 2007b). S'il apparait alors évident que le réchauffement global est un stress environnemental plurifactoriel, il est cependant nécessaire, dans le cadre d'une compréhension globale des espèces étudiées, de discriminer l'impact des facteurs biotiques et abiotiques afin de constituer un « background » de connaissances sur l'effet d'une élévation de la température. La première étape consiste en l'étude de « l'effet direct de la température » sur l'organisme. Elle doit être menée de la façon la plus intégrée possible c'est à dire en multipliant au maximum les niveaux d'étude permettant d'estimer les capacités de réponse de l'organisme à un choc thermique mais aussi les mécanismes physiologiques associés.

D'autre part, la distribution géographique des espèces ectothermes est déterminée en partie par la température comme semble l'attester la répartition des espèces en fonction du gradient thermique latitudinal et, de l'enfoncement bathymétrique des espèces marines boréales le long de ce gradient. Outre l'histoire évolutive propre à chaque espèce, la compréhension des mécanismes physiologiques qui sous-tendent cette répartition température-dépendante doit permettre d'expliquer la distribution actuelle des espèces mais également de prédire comment le réchauffement global est susceptible d'impacter les espèces là où elles se trouvent et comment elles seront capables d'y faire face (Somero, 2010). Il importe dans ce cadre de choisir des écotypes d'une espèce cosmopolite et/ou un complexe d'espèces phylogénétiquement proches, mais présentant des aires de distribution bien démarquées ayant des propriétés thermiques différentes.

Aussi, dans un souci de prédiction de l'évolution des écosystèmes polaires dans un environnement changeant il a été choisi d'étudier, par une approche comparative, la tolérance thermique du krill d'Antarctique et d'Arctique. Ces espèces clés ont été choisies en raison de leur importance dans les chaines trophique polaires. Leur survie et leur densité est primordiale

pour la conservation des équilibres biologiques dans ces régions déjà impactées par le réchauffement climatique. Trois espèces de krill ont été choisies.

Deux espèces sœurs d'Antarctique : *Euphausia superba* ou krill Antarctique *sensu stricto,* vivant au delà du plateau continental, qui constitue la proie bien connue des baleines dans la région circumpolaire australe (Hill *et al.,* 2012, 2013; Smith *et al.,* 2014) et *Euphausia crystallorophias* ou krill des glaces, qui vit sur le plateau continental, avec un cycle de vie reposant sur la présence de glace des mers (Pakhomov & Perissinotto, 1996). Les aires de répartition qui ne se chevauchent pas, les profondeurs des migrations (Clarke & Tyler, 2008) et les interactions avec la glace montrent qu'il existe pour les deux espèces des différences importantes voire exclusives de comportement et d'écologie. Ces caractéristiques sous-tendent des adaptations différentes parmi lesquelles la tolérance aux variations températures pourrait être déterminante.

Une espèce d'Arctique : *Thysanoessa inermis.* Cette espèce a elle aussi un rôle trophique majeur, et dans les mers du nord, elle est la principale source de nourriture pour des espèces d'intérêt économique comme le capelan et la morue (Dalpadado & Skjoldal, 1996). Cette espèce a une large répartition dans l'hémisphère nord mais n'est pas strictement polaire. Cependant on la retrouve préférentiellement sur les plateaux continentaux et dans des environnements froids. Elle est soumise à plus de modifications de température, en raison de sa répartition, ce qui fait d'elle un bon modèle pour étudier les modifications en cours des communautés zoo-planctoniques de l'Arctique et de la boréalisation de ses eaux (Buchholz *et al.,* 2009, 2012). Pour les mêmes raisons la réponse physiologique et moléculaire à des variations thermiques de cette espèce est un bon élément de comparaison avec les observations faites sur les krills antarctiques.

Dans le cadre de ce travail comparatif, deux niveaux d'étude complémentaires ont été abordés :

- Le premier niveau a eu pour objectif de déterminer *in vivo* les limites supérieures de tolérance (CTmax) de l'organisme à une augmentation de la température selon des critères reproductibles autorisant la comparaison des espèces entre elles.
- Le second niveau, moléculaire, a eu pour ambition d'estimer la limite inférieure d'apparition d'un stress thermique, que ce soit du point de vue de son amplitude ou de sa durée afin d'estimer les capacités de réponse de chacune des espèces. La réponse au moyen des Hsp70 (Parsell & Lindquist, 1993) qui constitue, en condition de stress, la réponse la plus conservée

et la mieux étudiée a été choisie. Le suivi et la compréhension de cette réponse au niveau moléculaire constituent la partie essentielle de ce travail.

-Dans ce but, un certain nombre d'isoformes d'Hsp70 présentes dans chaque espèce ont été préalablement caractérisées et les relations phylogénétiques entre elles et au sein des crustacés ont été analysées.

-Finalement, l'expression de chaque isoforme caractérisée dans chacune des espèces de krill choisies a été analysée différentiellement lors de chocs thermiques de différentes intensités et de différentes durées afin de cadrer les réponses et renseigner les limites inférieures de sensibilité thermique.

2. Détermination de la limite supérieure de la résistance thermique : CTmax et CT_{50}

2.1. Introduction

Tout organisme vit dans une gamme de température donnée qui est plus ou moins large et encadre ce que l'on nomme la température optimale (T_{opt}). Cette T_{opt} est définie par la fourchette de température dans laquelle un organisme équilibre taux métabolique et énergie dépensée (Pörtner *et al.*, 2007b). Au delà de cette température optimale, l'énergie dépensée pour maintenir les fonctions métaboliques va augmenter. Ainsi, les limites de températures critiques inférieure et supérieure qui encadrent la gamme d'optimum thermique d'un organisme représentent les températures à partir desquelles l'animal ne pourra plus assurer ses fonctions essentielles. La tolérance thermique représente alors l'écart en température entre les limites inférieure et supérieure qui existent pour une espèce donnée. Afin de comprendre l'écologie d'un organisme, il est nécessaire de connaître ses limites de vie, et, en ce qui concerne la température, de déterminer expérimentalement ses températures critiques (T_C) inférieures comme supérieures. Elles sont définies par la température à laquelle la température induit des dommages cellulaires (Pörtner *et al.*, 2007b). Elles détermineront en partie son aire de répartition dans un écosystème, et aussi sa distribution géographique.

Dans le contexte actuel de réchauffement climatique, les températures sont destinées à augmenter sur l'ensemble de la planète dans l'air comme dans les océans. La connaissance de la température critique supérieure permettra de prédire si l'augmentation de la température liée au réchauffement climatique aura un impact sur les communautés animales. En effet, les espèces ont des gammes d'optima thermiques différentes en fonction de leur environnement et de leur histoire évolutive. Ainsi, il existe des animaux qui possèdent de larges gammes de tolérance thermique (eurythermes), leur permettant de supporter de larges variations de température autour de leur température optimale. A contrario, il existe des organismes avec une faible tolérance aux variations du milieu (sténothermes). Ils vivent dans des environnements où la température du milieu est non seulement très proche de leur optimum thermique mais surtout ne subit pas ou peu de fluctuations importantes. C'est notamment le cas des organismes tropicaux et polaires. Ces organismes seront par conséquent les plus

impactés par une variation positive ou négative de la température de leur milieu. La température de l'environnement ne sera plus en accord avec leurs optima thermiques.

L'anticipation des réelles capacités de résistance d'un organisme face à un potentiel changement de température de son milieu est impossible à réaliser par sa simple observation dans son milieu naturel. Seule la mise en conditions de température contrôlées sur des temps longs et l'étude de l'impact de ces températures sur l'ensemble des étapes du cycle biologique devraient pouvoir apporter des informations susceptibles de répondre à la question posée. Ainsi, la mesure de la survie à un choc thermique brusque, même si l'information fournie est limitée, constitue une première étape dans l'étude des mécanismes de résistance présents chez les espèces étudiées, tout en excluant les mécanismes liés aux phénomènes d'acclimatation résultant plutôt de chocs modérés appliqués sur des longues durées. Elle constitue aussi une alternative techniquement plus aisée à mettre en œuvre.

Afin d'estimer cette limite supérieure, il existe une méthode expérimentale permettant une estimation de la température critique supérieure : c'est la CTmax (critical thermal maximum *ie* Température critique maximale). La CTmax consiste à mesurer la température à laquelle un organisme subit les premiers effets comportementaux de la température, c'est à dire lorsqu'il y a perte de la locomotion (Hutchison, 1961). Cette perte de locomotion est décrite comme la LRR (loss of righting response *ie* perte de réponse par redressement) (Brattstrom, 1968).
D'un point de vue expérimental la CTmax consiste à placer plusieurs individus d'une même espèce dans un aquarium et à augmenter graduellement la température à vitesse régulière, jusqu'à apparition des premiers dysfonctionnements moteurs qui seront à fixer en fonction des espèces étudiées.
En outre, ce type d'expérience ne peut pas ne pas prendre en compte une autre variable, le facteur temporel. En effet, la CTmax obtenue est dépendante de la vitesse d'incrémentation. Plus la vitesse d'incrémentation est faible (c'est à dire plus le temps écoulé entre chaque augmentation de température est important), plus la CTmax aura tendance à diminuer (Terblanche *et al.,* 2007). Cet effet est aussi observable dans l'environnement, les CTmax sont différentes en fonction des saisons, et ont tendance à diminuer quand la mesure est effectuée en hiver (Cuculescu *et al.*, 1998).
Dans le cadre de cette étude des expériences de CTmax ont été effectuées sur différents organismes polaires. Deux espèces de krill antarctique ayant une légère différence de répartition géographique : *Euphausia superba* et *Euphausia crystallorophias.* Et une troisième

espèce Antarctique : une crevette benthique *Chorismus antarcticus,* se trouvant principalement près des cotes. Et finalement une espèce de krill d'Arctique : *Thysanoessa inermis.* La comparaison de ces données nous renseignera sur la limite de tolérance thermique des krills étudiés.

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Récoltes des animaux

Les deux espèces de krill d'Antarctique ont été pêchées aux abords de la base française Dumont d'Urville (DDU) en Terre Adélie, soit au niveau du plateau continental (*Euphausia crystallorophias*) soit au-delà de ce même plateau (*E. superba*) sans recouvrement de leurs aires de distribution (figure 2-1). La pêche a été réalisée à l'aide d'un filet IKMT tiré par le navire « L'Astrolabe » à une vitesse de deux nœuds maximum pendant 10 à 15 min. La profondeur d'échantillonnage est préalablement déterminée par l'observation au sondeur d'essaims suffisamment denses. Elle est généralement comprise entre 20 et 50 mètres. Après la pêche les animaux sont conservés dans un bac d'un m^3 alimenté en eau courante à une température comprise entre -0.5-0.5°C. Une pompe en circuit fermé permet de créer un courant ascensionnel vertical constant afin de faciliter le maintien des animaux dans la couche d'eau.

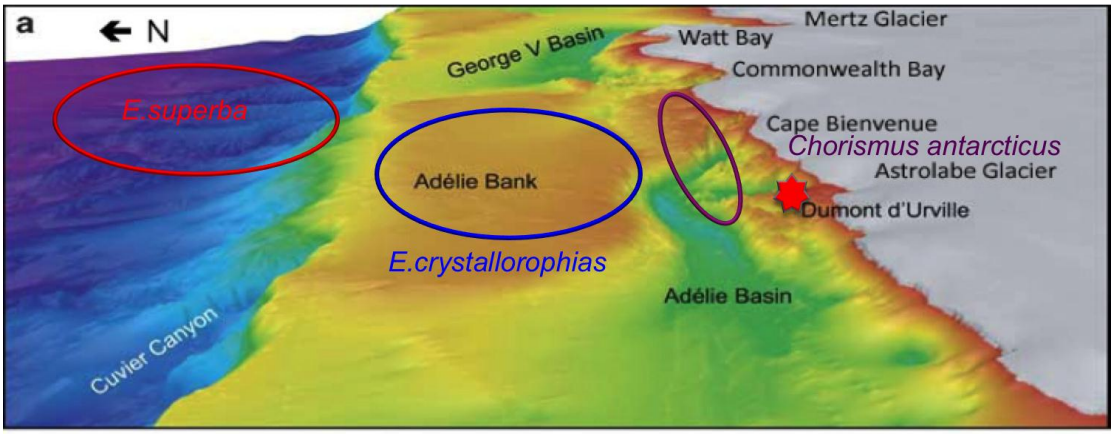

Figure 2-1 : Bathymétrie de la mer Dumont d'Urville et de la côte Adélie. Les zones de pêche approximatives sont représentées par des cercles : *E. superba* (rouge) *E. crystallorophias* (bleu) *C .antarcticus* (violet) (D'après la thèse de L. Hemery, 2011)

La crevette antarctique *Chorismus antarcticus* est pêchée à l'aide d'un chalut à perche tracté par un sea-truck pendant 5min à une vitesse de 2 nœuds. Les crevettes sont triées après chaque trait de chalut et conservées de la même manière que le krill.

L'espèce d'Arctique a été pêchée dans un fjord du Spitzberg dans l'archipel du Svalbard, le Kongsfjorden, près de la base scientifique de Ny-Alesund (79°N). La pêche a été réalisée à l'aide d'un filet rectangulaire à zooplancton conçu pour être déployé depuis des petits bateaux (Buchholz *et al.*, 2009). Le filet est plongé à une profondeur d'environ 100 mètres et ouvert une fois à cette profondeur à l'aide d'un « messager » envoyé depuis la surface. Le filet reste ouvert et tracté pendant 20 à 30 min à une vitesse de 2 nœuds. Après la pêche, les krills sont séparés des autres espèces se retrouvant dans le filet. Une fois à terre, ils sont transférés au Marin lab, dans des aquariums alimentés en eau de mer filtrée à 4°C.

2.2.2. CTmax et CT_{50}

Le protocole est strictement identique pour toutes les espèces. Après environ 24h de stabulation dans le bac, des animaux bien mobiles sont préférentiellement prélevés, sans distinction de taille ni de sexe. Ils sont disposés dans deux aquariums contenant de l'eau de mer à 0°C (pour les espèces Antarctique) et 4°C (pour l'espèce Arctique). Ces aquariums sont eux-mêmes plongés dans un bac contenant de l'eau douce. Un serpentin en cuivre relié à une cuve thermostatée équipée d'une pompe en parcourt les parois. Dans ce serpentin circule une eau plus ou moins chaude dont la fonction est de réchauffer l'eau du bac puis celle des aquariums. Afin de faciliter les échanges caloriques, des pompes assurent un mouvement continu de l'eau dans le bac. L'eau des aquariums est oxygénée grâce à des bulleurs et agitée en permanence par de petites pompes afin de conserver une oxygénation maximale, mais aussi permettre une augmentation de la température optimale et continue dans le temps. La mise en œuvre des expériences a été réalisée à bord du Navire l'Astrolabe pour les deux espèces de krill d'Antarctique et sur la station Dumont d'Urville pour la crevette. *Thysanoessa inermis* a été conditionnée dans le Marin Lab de Ny-Alesund.
L'incrémentation de température utilisée en un premier temps pour cette expérience est de 1°C toutes les 10 minutes (soit 0,1°C.min^{-1}). Les animaux sont maintenus dans le bac jusqu'à ce qu'ils ne présentent plus de réaction à un stimulus tactile lorsqu'ils sont couchés sur le fond, ce qui correspond dans le cas de ces organismes au LLR (Loss of Righting response *ie*

perte de réponse par redressement). A ce moment là, la température limite est considérée comme atteinte et l'animal est retiré de l'aquarium. Le test est effectué sur les animaux à chaque augmentation de température d'un degré. Les animaux éliminés sont mesurés et congelés dans l'azote liquide.

D'autres types d'incrémentations on été testés dans les mêmes conditions expérimentales. Dans le cas de *E. superba* une incrémentation de 1°C par jour et de 1°C tout les 3 jours a été testée. Ces incrémentations étant impossibles à mettre en œuvre sur le navire l'Astrolabe, elles ont été réalisées dans des aquariums dédiés dans le laboratoire de l'Australian Antarctic Division (AAD) à Kingston (Tasmanie). Dans le cas de *C. antarcticus*, l'incrémentation de 1°C par jour a aussi été testée sur Dumont d'Urville.

Calcul de « CT_{50} »

Lors de cette étude nous n'exprimeront pas les résultats selon la règle de la CT_{max} qui consiste à relever la température à laquelle il y a apparition de la LRR, car cette méthode a tendance à sous évaluer la température critique. En revanche, ici nous détermineront une CT_{50}. Inspirés de la méthode de LT_{50} de Somero et Stillman (Stillman & Somero, 2000), qui au lieu de mesurer la température où 50% des individus meurent lors de l'expérimentation, nous déterminerons ici la température à laquelle 50% des individus présentent une perte de réponse par mobilité. Les données de perte de réaction sont exprimées en pourcentage en fonction de la température. Puis, une courbe de tendance sigmoïde théorique est tracée en fonction des points expérimentaux, et permet d'estimer la valeur de CT_{50}.

Son équation est :

$$f(T) = \frac{C}{1 + (\frac{T}{CT_{50}})^b}$$

Où C est la valeur du plateau théorique ; T la température en degré Celsius, et *b* le coefficient de sigmoïcité (calculé avec le logiciel JMP10©)

2.3. Résultats & Discussion

2.3.1. CT_{50} à 0,1°C.min^{-1}

2.3.1.1. Espèces d'Antarctique

Trois espèces sont comparées lors de cette expérience suivant strictement le même protocole d'une incrémentation de température de 1°C toute les 10min. Deux espèces de krill et une de

crevette. Ces 3 organismes ont la particularité de vivre dans le même environnement froid qu'est l'océan Austral, mais elles ont des aires de répartition, bien que proches, sont assez distinctes. *E. superba* vit dans la zone pélagique et est essentiellement retrouvée au large. *E. crystallorophias* est plus côtière, et se retrouve uniquement sur le plateau continental, car le cycle de vie de cette espèce est très inféodé à la glace. Et finalement *C. antarcticus*, la crevette benthique, est essentiellement côtière.

Ces trois organismes vivent à une température voisine voire inférieure à 0°C. C'est à cette température que les animaux sont conservés lors de la stabulation et c'est à cette température que l'expérience débute, puis augmente progressivement de 0,1°C.min^{-1}.

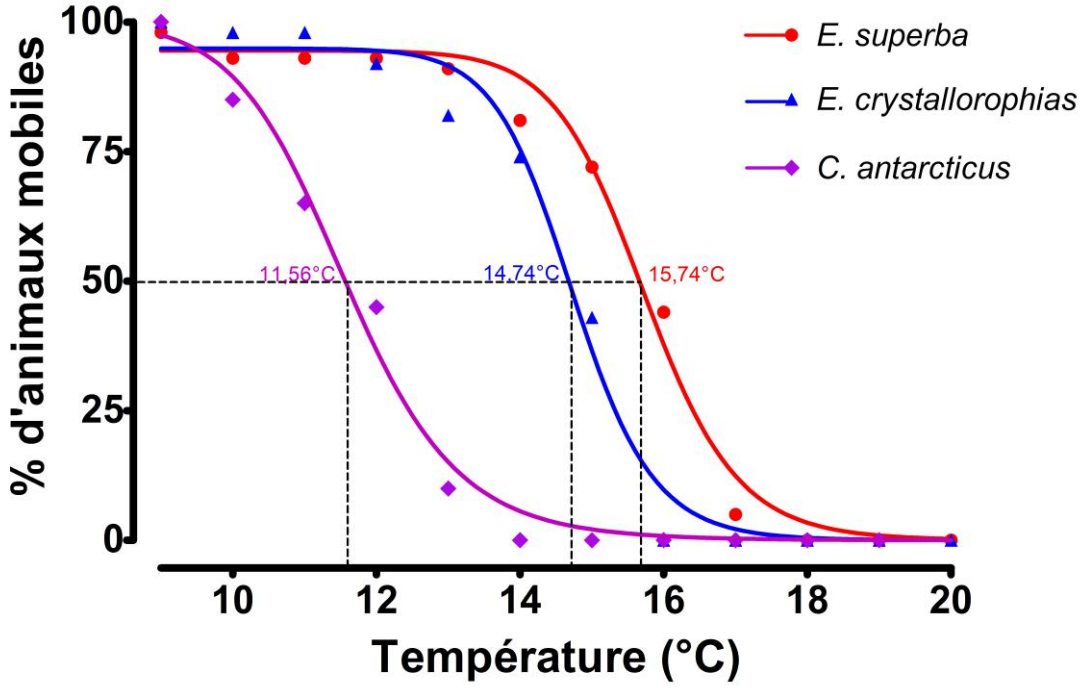

Figure 2-2 : Détermination de la CT_{50} de *C. antarcticus* (losanges violets) *E. crystallorophias* (triangles bleu) et *E. superba* (ronds rouge) lors d'une incrémentation en température de 1°C/10min. Les points représentent les données expérimentales, et les courbes la tendance théorique. On relève la CT_{50} lorsque 50% des individus perdent leur mobilité lors de l'augmentation de la température.

Le krill apparait beaucoup moins sensible à l'augmentation de la température que la crevette benthique *C. antarcticus*. *E. crystallorophias* présente une perte de mobilité aux alentours des 13°C ce qui est légèrement inférieur à *E. superba* qui perd de la mobilité à partir de 14°C. L'interprétation des courbes de CT_{50} des deux espèces, conserve ce décalage thermique, et attribue des valeurs de CT_{50} pour *E. superba* et *E. crystallorophias* de 15,74 ± 0,10°C et 14,74

± 0,11°C respectivement (figure 2-2). L'apparition de la LRR chez ces deux espèces est certes plus tardive que la crevette antarctique mais, un plus grand nombre d'individus perdent leur mobilité en même temps comme en témoignent les pentes des courbes théoriques pour chaque espèce. Ces deux températures positionnent ces deux espèces de krill dans les ectothermes les plus thermotolérants de la faune de l'Océan Antarctique (Peck *et al.*, 2007, 2009; Pörtner *et al.*, 2007a). Ce sont des animaux particulièrement mobiles, pélagiques ou épipélagiques alors que l'ensemble des mesures réalisées ont plutôt porté sur des animaux benthiques. Ces résultats seraient en accord avec l'existence d'une corrélation entre la capacité de mobilité et la valeur de CT comme en témoigne l'écart de 3°C de CT_{50} entre la crevette et le krill. La crevette *C. antarcticus* vit dans la zone côtière en milieu benthique et a une capacité de nage très réduite. En revanche, le krill vivant en zone epipélagique et pélagique a une capacité de nage supérieure et vit pendant l'intégralité de son cycle de vie dans la colonne d'eau.

En ce qui concerne le krill, la faible différence de CT_{50} (1°C) entre les deux espèces, montre une thermotolérance très similaire. En revanche l'observation du comportement des deux espèces pendant l'expérimentation met également en évidence un maintien de la capacité de nage très supérieure chez *E. superba*. Il y a dès le début de l'expérience (2°C) une diminution importante de cette capacité chez *E. crystallorophias* qui se caractérise par un maintien sur le fond des animaux, même si une certaine activité perdure (nage sur le fond, mouvement des pléopodes). Une autre explication possible serait, non pas une perte des capacités de nage, mais simplement une réponse comportementale du krill des glaces caractérisée par une fuite vers le fond. Du fait que cette espèce néritique a une localisation au dessus du plateau continental exclusivement, il est raisonnable de penser que sous ces latitudes, seule la zone proche de la surface est susceptible de présenter une hausse significative de sa température. La solution d'évitement consiste donc à rejoindre la couche d'eau plus froide en profondeur.

Outre une différence des CT_{50} d'un degré, la quasi-absence du comportement de nage chez *E. crystallorophias* ainsi que le point d'inflexion plus précoce de la mortalité cumulée tendent à mettre en évidence une réponse plus rapide du krill des glaces à l'augmentation de la température. Il est clair qu'une faible augmentation de la température affecte peu *E. superba* quand à ses capacités de nage ou stimule son comportement d'échappement.

En plus de la mobilité, il est intéressant d'observer la corrélation entre CT_{50} et répartition géographique. Ainsi, *E. superba* vivant dans la zone pélagique apparait plus thermotolérant que *E. crystallorophias* vivant dans la zone épipélagique, lui même étant plus thermotolérant que *C. antarcticus* vivant en zone côtière. Chaque domaine peut être considéré comme une niche thermique particulière. Plus un organisme vit dans le milieu pélagique, plus celui ci

évolue dans un environnement variable, et est potentiellement doté d'une résistance à la température plus grande, qu'un organisme côtier évoluant dans une niche thermique bien moins variante.

En effet, *C. antarcticus* semble être beaucoup plus sensible à ce type d'élévation de température. On observe une perte de la mobilité dès 10°C alors que le krill à cette même température ne présente aucune LRR. Le pourcentage d'animaux mobiles diminue progressivement comme en témoigne la pente de la courbe théorique. L'interprétation de cette courbe donne comme valeur de CT_{50} de 11,56 ± 0,09°C (figure 2-2).

2.3.1.2. Espèce d'Arctique

Le même protocole de CT_{50} a été appliqué à l'espèce arctique *T. inermis.* Cette espèce principalement épipélagique, et bien que vivant dans un milieu principalement froid, sa large répartition boréale semble indiquer des capacités de tolérance thermique plus grandes que les espèces d'Antarctique considérées précédemment. Dans la zone où *T. inermis* a été pêché, le Kongsfjorden, le krill évolue dans des eaux à 4°C. C'est donc à cette température que les animaux sont conservés pendant 24h, et à cette température que débute l'incrémentation de 1°C/10min.

T. inermis lors de ce choc thermique, n'est pas affecté par la température jusqu'à une température de 18°C. L'interprétation de la courbe de la perte de mobilité en fonction de la température, indique une valeur de CT_{50} pour cette espèce de 19,67°C ± 0,09°C (figure 2-3).

T. inermis apparait donc comme l'espèce testée la plus thermotolérante de par sa valeur de CT_{50} la plus importante. Cependant, dans le cadre de la comparaison avec les espèces d'Antarctique, il convient de relativiser et de rapporter cette valeur à la température de l'habitat (CT_{50}- $T_{habitat}$). Une fois ramenées à la température de l'habitat, les valeurs de CT_{50} corrigées ne sont pas modifiées dans les cas des organismes antarctiques (car $T_{habitat}$= 0°C). En revanche, la prise en compte de ce facteur, dans le cas de *T. inermis* amène sa CT_{50} corrigée à la valeur de 15,79°C.

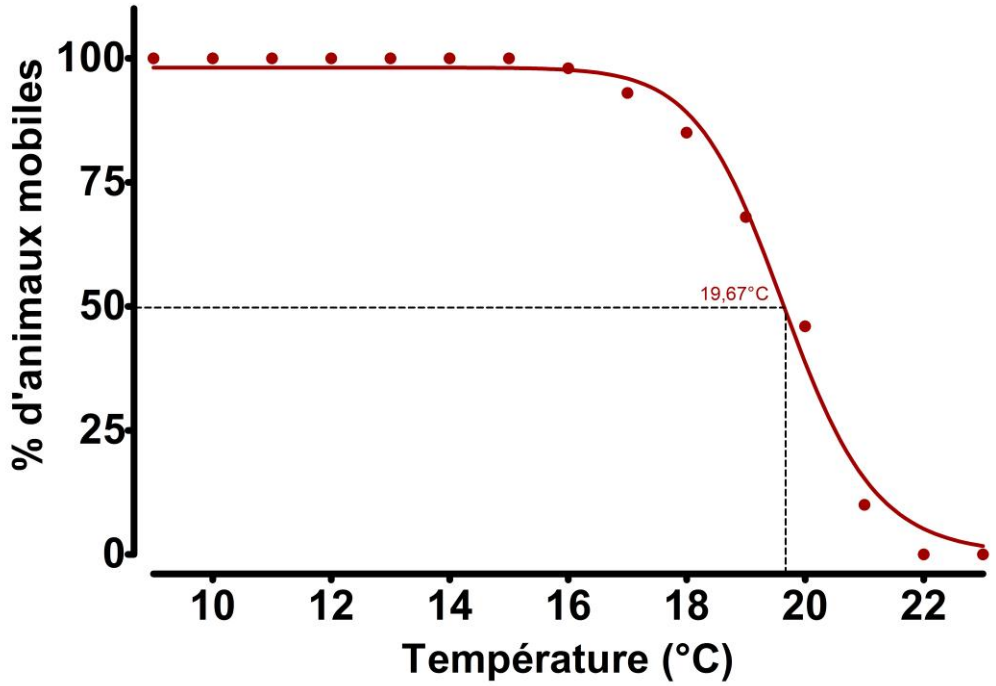

Figure 2-3 : Détermination de la CT_{50} de *T. inermis* lors d'une incrémentation en température de 1°C/10min. Les points représentent les données expérimentales, et la courbe, la tendance théorique. CT_{50} représente la température à laquelle 50% des individus ont perdu leur mobilité.

Cette valeur, similaire à celle obtenue pour *E. superba* dans les mêmes conditions (15,74°C), indiquerait une thermotolérance relative du même ordre malgré leur distance géographique et phylogénétique.

Les environnements à chaque pôle sont thermiquement bien distincts. Ils ont aussi une histoire différente influant potentiellement sur la capacité de résistance des organismes marins qui y vivent.

T. inermis vit dans les eaux froides boréales entre différents océans (Pacifique Atlantique, Arctique). La température froide semble être un facteur régissant sa répartition. Par exemple, bien que cette espèce se retrouve le long des côtes d'Amérique du Nord, elle semble être bloquée par le Gulf Stream, courant réputé pour brasser eaux chaudes et froides dans l'océan Atlantique Nord, ce qui tend à confirmer le rôle majeur de la température dans la répartition de cette espèce. Bien que globalement froid, l'ensemble des niches occupées par *T. inermis* est pourtant soumis à de grandes variations thermiques. En effet, dans la zone où les échantillons de cette étude ont été pêchés, les eaux ont une température de 4°C. Cependant, ce fjord est idéalement placé géographiquement pour subir des incursions d'eaux Atlantiques

allant jusqu'à 12°C. Sans tenir compte d'une potentielle réponse comportementale à de telles incursions d'eaux chaudes, cette espèce, pour vivre dans de telles zones, doit avoir une gamme de tolérance thermique assez élevée, ce qui apparait cohérent avec les résultats des CT_{50} obtenus.

Le fait que *E. superba* ait une CT_{50} corrigée similaire à celle de *T. inermis*, permet de considérer que leurs capacités de résistance pourraient être comparables. Or, même si *E. superba* vit dans un environnement majoritairement froid et stable depuis 25 millions d'années (Patarnello *et al.*, 1996a; Zane *et al.*, 1998), son aire de répartition est beaucoup plus large que celle d'*E. crystallorophias*, avec de nombreuses populations localisées de manière moins septentrionale à l'ouest de l'Antarctique et vivant dans des eaux jusqu'à 5°C (Atkinson *et al.*, 2004a, 2008; Mackey *et al.*, 2012), soulignant des capacités d'acclimatation réelles. Cette répartition et cette valeur de CT_{50} relativisent d'ailleurs l'idée selon laquelle les organismes vivant dans l'océan Austral seraient strictement sténothermes, particulièrement les pélagiques. La comparaison avec la crevette est à ce titre particulièrement illustrative. Il serait donc constructif, dans le cadre de la comparaison avec l'espèce d'Arctique, de conditionner des membres de ces populations et de vérifier si la CT_{50} d'*E. superba* augmente et conserve ainsi une CT_{50} corrigée constante, effaçant les différences entre les deux espèces en terme de CT_{50}.

2.3.2. CT_{50} : 1°C.jour^{-1} & 0,33°C.jour^{-1}

La valeur de CT_{50} est une mesure qui permet d'estimer la température critique d'un animal. Or, la valeur de CT_{50} est dépendante de la température d'origine avant l'expérience, mais aussi de la vitesse de l'augmentation de la température. Plus l'augmentation de température est lente et progressive plus la valeur de la CT_{50} tendra à diminuer (Terblanche *et al.*, 2007). Cette diminution sera d'autant plus importante que l'animal sera thermosensible. Il est donc important de considérer la variation de la CT_{50} en fonction de la vitesse d'incrémentation de la température, pour mieux évaluer la capacité de résistance d'un organisme à la température.

2.3.2.1. Euphausia superba

Dans le cas de *E. superba* deux vitesses d'incrémentation supplémentaires ont été testées. Celles-ci sont de 1°C tous les jours ou les 3 jours. De manière générale, une diminution de la CT50 est observée lorsque la vitesse d'incrémentation est moins grande.

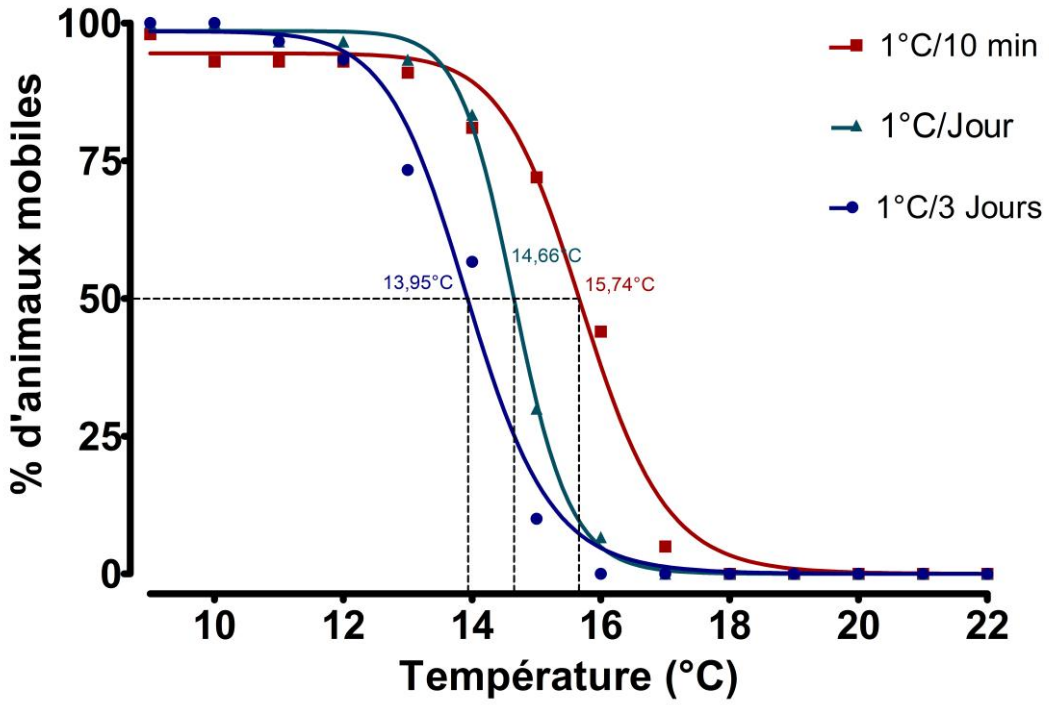

Figure 2-4 : Détermination de la CT_{50} de *E. superba* lors d'une incrémentation en température de 1°C toutes les 10min (carrés rouges) ; 1°C par jour (triangles verts) et 1°C tous les 3 jours (ronds bleus) . Les points représentent les données expérimentales, et la courbe, la tendance théorique. CT_{50} représente la température à laquelle 50% des individus ont perdu leur mobilité.

Dans le cas d'une augmentation de la température de 1°C par jour, on observe les premiers signes de LRR à 13°C, suivis d'une chute drastique du nombre d'animaux mobiles, donnant une valeur de CT_{50} de 14,66 ± 0,03°C (figure 2-4) . La CT_{50} diminue dans ce cas de 1,08°C entre les deux expériences. Lorsque la vitesse d'augmentation de la température est de 1°C tous les 3 jours, la perte de mobilité apparaît à 13°C et la CT_{50} associée est de 13,95 ± 0,09°C, marquant une différence de 0,71°C avec la condition précédente et de 1,79°C avec l'incrémentation de 1°C toutes les 10min (figure 2-4).

Ces résultats ont été obtenus avec des animaux maintenus dans des conditions optimales dans des aquariums de grand volume et avec une nourriture adaptée. Ces valeurs sont remarquables

et inattendues car elles mettent en évidence une thermotolérance et une capacité d'acclimatation exceptionnelles pour ces organismes d'eau froide. En effet, si ces valeurs sont rapportées en nombre de jours d'expérimentation, les CT_{50} avec une incrémentation de 1 et 3°C sont obtenues respectivement après environ 14 et 42 jours. Cette capacité est d'autant plus évidente lorsqu'elle est comparée avec celle de la crevette.

2.3.2.2. *Chorismus antarcticus*

En plus de l'incrémentation rapide évoquée précédemment, une seule autre incrémentation a été testée sur *C. antarcticus* (1°C par jour), sans modification de la température initiale (0°C).

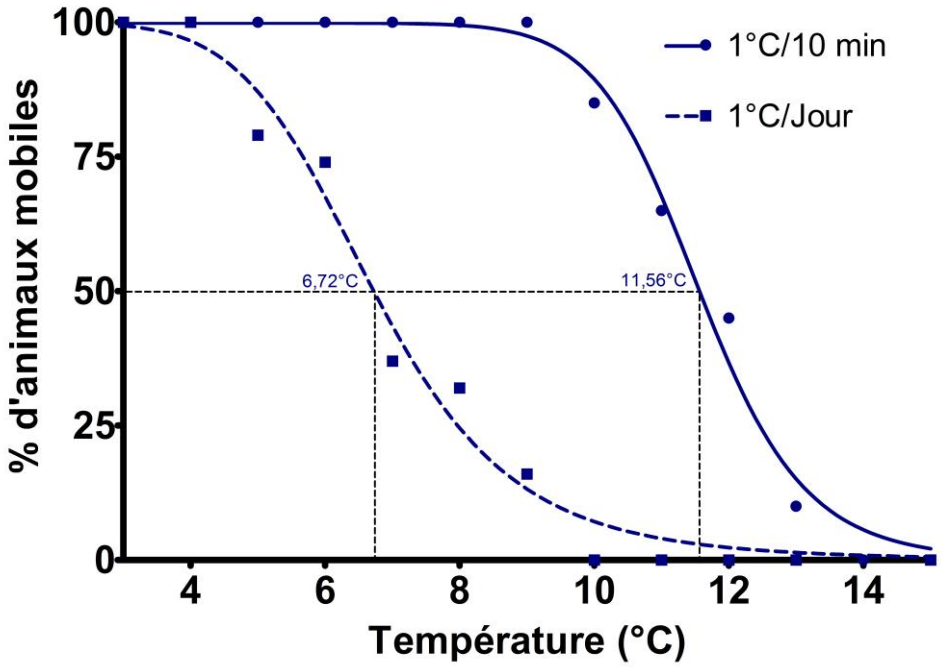

Figure 2-5 : Détermination de la CT_{50} de *C. antarcticus* lors d'une incrémentation en température de 1°C toutes les 10min (ronds et ligne pleine bleu) et de 1°C par jour (carrés et ligne pointillée bleus). Les points représentent les données expérimentales, et la courbe, la tendance théorique. CT_{50} représente la température à laquelle 50% des individus ont perdu leur mobilité.

Dans ces conditions, les crevettes commencent à perdre leur mobilité dès 5°C, alors que précédemment la perte de mobilité survenait à 10°C. Cette diminution se retrouve dans le calcul de CT_{50} qui est de 6,72±0,17°C, ce qui marque une différence de 4,85°C avec la valeur de CT_{50} précédente(figure 2-5).

C. antarcticus est une crevette benthique côtière qui a une activité natatoire très réduite, de plus le milieu benthique est moins soumis aux courants pouvant amener des variations de la température.

Même si l'expérience avec l'incrémentation tous les trois jours n'a pu être menée sur *C. antarcticus*, le conditionnement intermédiaire confirme sans équivoque la différence de thermotolérance entre les deux espèces déjà observées sur le plus court terme. Là où une diminution d'un degré entre les deux premières vitesses d'incrémentation est observée pour le krill, la crevette voit sa CT_{50} pratiquement divisée par deux. Ce résultat confirme la sensibilité particulière de la crevette, mais surtout met en exergue les capacités de tolérance d'*E. superba* face à une augmentation de la température de son milieu.

Une comparaison avec l'espèce sœur *E. crystallorophias* devrait permettre de confirmer voire d'augmenter la différence de CT50 mise en évidence. Une expérience a été menée dans ce but, toujours avec l'AAD en Tasmanie, malheureusement, pour des raisons techniques, elle n'a pu être menée à son terme. Cependant, la température atteinte a été de 12°C avec une incrémentation de 1°C par jour, sans qu'aucune perte n'ait été enregistrée au sein de la population expérimentale. Ce résultat partiel démontre tout de même que le krill des glaces possède lui aussi des capacités de thermotolérance supérieure à celles de la crevette.

2.4. Conclusion

L'utilisation du même protocole expérimental, suivi d'une méthode mathématique de la détermination de la CT_{50} permet de pouvoir comparer la température critique potentielle des différentes espèces.

La crevette antarctique est manifestement l'espèce ayant la plus grande sensibilité thermique, suivie de *E. crystallorophias,* et finalement *E. superba* et *T. inermis*. La modification de l'incrémentation en température tend à confirmer cette hypothèse. Il est intéressant de souligner le fait que *E. crystallorophias* a une CT_{50} proche de celle de *E. superba* (figure 2-2), et que cette différence pourrait être corrélée à la différence de répartition entre les deux espèces Antarctique.

En comparaison avec d'autres organismes antarctiques, les données fournies par ces expériences placent les 3 espèces de krill étudiées comme particulièrement résistantes à la température. La majorité des résistances thermiques des organismes antarctiques ont été mesurées sur des organismes benthiques ou démersaux. Le ver antarctique *Liothyrella uva, et*

le bivalve *Limopsis marionensis* ne résistent pas à des augmentations de température supérieure 4,5°C. D'autres organismes plus résistants comme la patelle *Nacella cocinna* ou l'étoile de mer *Odontaster validus,* ont des limites supérieures evaluées a respectivement 9 et 12°C, ce qui les placent malgré tout parmi les organismes antarctiques les plus thermo-tolérants (Peck, 2002). En comparaison les krills antarctiques *E. superba* et *E. crystallorophias* avec leur CT_{50} mesurées à 15 et 14°C sont classés dans la catégorie des organismes antarctiques le plus thermotolérants.

Ces expériences ont permis d'estimer les limites supérieures de tolérance thermique des espèces étudiées, c'est à dire la température à laquelle les organismes subissent des dommages irréversibles liés à la température.
Cependant, dans le but d'estimer l'impact de l'augmentation de température liée au réchauffement climatique sur le krill polaire, il est nécessaire d'estimer aussi la limite inférieure. La limite inférieure est la température à laquelle un organisme ressentirait les effets de la température, sans que ceux-ci soient irréversibles. Afin de déterminer cette limite, l'impact de la température sera étudié à l'échelle moléculaire, via des molécules impliquées dans la protection de la cellule contre les effets délétères de la température. Dans ce but, les « Heat Shock Proteins 70 » ont été choisies comme marqueurs à priori. L'expression de ces protéines devraient permettre de marquer le début des effets de la température, et indiquerait donc la limite supérieure de l'optimal thermique.

3. Caractérisation moléculaire et phylogénie des Hsp70

3.1. Introduction

Afin d'estimer la limite supérieure de la tolérance thermique d'un organisme, il est important d'analyser les effets de la température à l'échelle moléculaire. La température a pour principal effet de dénaturer les protéines, déstabilisant l'homéostasie cellulaire, et pouvant amener à la mort cellulaire et jusqu'à la mort de l'organisme. Les heat shock proteins (HSP) sont bien connues pour contrebalancer ces effets néfastes, en permettant la renaturation des protéines. Il existe une multitude d'HSP classées en fonction de leur poids en Kilo Dalton (de 10kDa à 110Kda). Au sein de cette grande famille, les protéines de choc thermique de 70 kDa (Hsp70) sont les plus étudiées. Elle ont la particularité d'être transcrites massivement lors de chocs thermiques, où elles remplissent leur rôle de protéine chaperonne et orchestrent le recrutement d'autres HSP participant à la réponse à un choc thermique. Elles sont, de par leur activité, en grande partie responsables de la tolérance thermique d'un organisme. En effet, l'absence de ces molécules engendrerait une baisse de la capacité de tolérance (Bettencourt *et al.*, 2008).

Les Hsp70 sont séparées en deux catégories, assumant théoriquement deux rôles distincts. La première rassemble les Hsp70 dites inductibles car leur expression est induite lors d'un stress. La deuxième rassemble les Hsc70 (Heat Shock cognate) dites constitutives car elles sont exprimées en permanence dans la cellule, et sont maintenues à un taux basal. Lors d'un stress, les protéines dénaturées vont être prises en charge par la famille des Hsc70, ce qui va lever la répression du facteur de transcription (HSF) qui, une fois trimérisé, va induire l'expression des Hsp70 qui vont chaperonner les protéines dénaturées et permettre la récupération de leur structure tridimensionnelle originelle (Morimoto, 1998).

Afin d'utiliser les Hsp70 comme bio marqueur de stress, il a été nécessaire de caractériser un maximum d'isoformes de ces Hsp70. Les transcriptomes préalablement séquencés (Clark *et al.*, 2011; Toullec *et al.*, 2013) ont permis d'extraire les séquences de 5 isoformes d'*Hsp70* pour chacune des espèces : *E.superba, E.crystallorophias, T.inermis*. L'étude a pris en compte de manière différentielle l'ensemble des isoformes disponibles (Morris *et al.*, 2013)

Chaque isoforme obtenue à partir du transcriptome a été confirmée via le séquençage direct (méthode de Sanger) de ces dernières.

3.2. Matériels et Méthodes

Une approche par séquençage à haut débit (Illumina) des transcriptomes de trois espèces de krill a été mise en œuvre. Le transcriptome d'une espèce supplémentaire de krill *Thysanoessa raschii*, pêchée elle aussi en Arctique et vivant dans la même aire de répartition que *T. inermis*, a été également séquencé. Cependant, en raison du nombre limité d'échantillons, aucune expérimentation n'a été réalisée sur cette espèce. Les assemblages n'ont pas été confirmés par PCR chez cette espèce.

Grace aux assemblages, il a été possible d'identifier des séquences codantes pour différentes isoformes d'Hsp70 et ce pour les quatre espèces. Les transcrits codants pour les Hsp70 sont des ARNm d'environ 2000pb. Les isoformes ont un taux de similarité très élevé entre elles, ce qui peut être source de confusion lors de l'amplification spécifique d'une isoforme. Afin de confirmer l'existence biologique de ces isoformes une caractérisation par PCR interne, après rétro-transcription des ARNm, et séquençage direct a été réalisée.

3.2.1. PCR interne

2 à 4 paires d'amorces oligonucléotidiques ont été réalisées pour chaque isoforme de chaque espèce. Afin de faciliter les étapes de PCR et de séquençage les amorces sont conçues de manière à découper la séquence d'ADNc (produit de la transcription inverse des ARN totaux) en deux parties, une d'environ 600-700pb et une autre de 1400-1300pb. Ce découpage a été choisi en fonction du taux de similarité entre les isoformes. Les zones d'hybridation avec les amorces sont les séquences nucléotidiques les plus variables entre isoformes. Ainsi, il a été possible d'amplifier spécifiquement chaque isoforme.

Le protocole d'amplification PCR est globalement le même pour toutes les isoformes. Des PCR nichées sur de l'ADNc des trois espèces ont été réalisées dans un volume réactionnel contenant du tampon 10X® (Promega), du chlorure de magnésium (50mM), des dNTPs (2.5µM), des amorces (2.5µM chaque) et de l'enzyme Taq Uptitherm DNA polymérase®(Interchim;1U/µl). Les PCR ont enchainé les cycles suivants : premier cycle à 95°C/3min (dénaturation), 60-57°C/2min (hybridation) et 72°/5min (élongation) ; Trente-cinq cycles ont suivi avec 95°C/30s, 60-58°C/30s, 72°C/3min et 72°C/10min.

Quelques modifications ont été nécessaires afin d'augmenter la spécificité d'hybridation de chaque couple d'amorces testé via la modification de la température d'hybridation.

3.2.2. Extraction ADN et purification

Les produits d'amplification de PCR interne sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Un gel a 1,5% contenant 1,5% d'agarose et du tampon TBE (Tris, Borate, EDTA) et un intercalant Gel red a permis de faire migrer et de visualiser les produits de la PCR interne. Un étalon moléculaire (Smart Ladder) a permis de sélectionner les fragments à la taille attendue avant extraction, à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II.

3.2.3. Ligation des produits PCR

Apres avoir été sélectionnés et purifiés les produits PCR sont insérés dans un plasmide. La réaction de ligation est effectuée dans un mélange réactionnel contenant du tampon 10X, le plasmide (pGEM-T vector system), les produits PCR pur, er l'enzyme T4. Le mélange est incubé pendant une nuit à 4°C, puis transformé dans des bactéries compétentes.

3.2.4. Transformation de bactéries compétentes DH5α

Des bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α-phage résistantes (kitpGEM®-T Vector Systems-Promega)on été ajoutées aux produits de ligation et l'ensemble a été laissé trente minutes sur glace, puis 60 secondes à 42°C et à nouveau trois minutes sur glace. Un mélange LB (Lysogeny Broth)® + glucose a alors été ajouté suivi d'une incubation d'une heure à 37°C sous agitation de 180 rpm. 80µL des suspensions ont été étalées sur des boîtes de Pétri LB agar contenant de l'ampicilline (100µg.mL^{-1}), du X-Gal (2%) et de l'IPTG (1 mM) et placées à l'étuve à 37°C pendant la nuit afin de laisser pousser les bactéries.

L'ampicilline permet de sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide contenant le gène de résistance. Si les fragments d'ADNc sont insérés dans le plasmide alors le gène LacZ codant pour le peptide alpha de la β-galactosidase est délété, et la β-galactosidase devient non fonctionnelle . Dans le cas où l'opéron LacZ n'est pas délété, et la β-galactosidase est fonctionnelle, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside ou X-galactose(X-gal 2%) incolore est transformé par l'enzyme en un produit bleu insoluble. Les colonies bleues correspondent donc à celles qui ont le plasmide mais ne contenant pas d'insert. Les colonies

blanches sont celles qui sont sélectionnées et qui contiennent un plasmide présentant un insert. Huit clones de couleur blanche ont été sélectionnés par insert afin de limiter le risque d'utiliser des faux positifs.

Il existe du polymorphisme chez les isoformes, un séquençage direct sur les produits PCR « purs » pourrait donc être à l'origine d'erreurs de séquençage. Le passage par les plasmides et les bactéries a permis de sélectionner les formes majoritaires.

3.2.5. PCR sur Clones

Une PCR de contrôle a été réalisée sur les clones. Cette PCR a suivi le même protocole que les PCR précédentes à la différence que les amorces utilisées, SP6 (5' (CATTTAGGTGACACTATAG 3') et T7 (5' GTAATACGACTCACTATA 3'), bordant l'insert ont une température d'hybridation de 55°C. Les clones positifs contenant l'insert ont été sélectionnés.

3.2.6. Purification ExoSap

Les produit PCR des clones positifs ont été purifiés par ExoSAP afin d'éliminer les sels, amorces et dNTPS qui n'ont pas été incorporés lors de la réaction PCR et ainsi purifier les fragments d'ADN. Un mélange avec de l'ExoSAP-IT et de l'eau a été ajouté à un volume de produit PCR brut à purifier. La réaction de purification est faite à : 37°/15 min, 82°/15 min puis 4°C.

3.2.7. Réaction de séquence et séquençage

Le séquençage a été réalisé, à la station biologique de Roscoff, selon la méthode de Sanger avec le kit BigDye Terminator v3.1. Ce kit contient des tampons (5X), des amorces (5µM), le kit BDT contenant des sels, une Taq polymérase, des dNTPs et ddNTPs couplés à un fluorochrome spécifique au type de ddNTP. Le mélange est ajouté au produit PCR purifié pour un volume final de 10µL. La réaction de séquence (synthèse des fragments par PCR) suit une dénaturation à 96°C/5min, puis 25 cycles avec une dénaturation (96°C/10s), une hybridation (55°C/5s) et une élongation (60°/4min). Les fluorochromes permettent la détection des fragments synthétisés en électrophorèse capillaire (séquençage) et ainsi de déterminer la séquence d'ADN correspondante.

3.2.8. Analyse phylogénétique

La construction d'un arbre phylogénétique à partir des séquences d'Hsp70 de crustacés disponibles, incluant les Grp78 (Glucose Related Protein) et les différentes séquences de krill extraites des transcriptomes, a été menée par inférence Bayésienne (BI). L'analyse bayésienne a été réalisée avec MrBayes 3.1.2. avec 4 chaines de 10^6 générations, un échantillonnage des arbres toutes les 100 générations et une valeur de burn-in fixée à 20% des arbres échantillonnés. Les séquences protéiques ont été analysées à partir d'un modèle acide-aminé mixte (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). 74 séquences d'un seul tenant (ce qui exclut les séquences trop partielles) ont été alignées avec clustalW et l'alignement a été affiné avec Gbloks afin d'éliminer les parties trop variables donc mal alignées ainsi que les gaps. 521 sites ont été retenus.

3.3. Caractérisation des Hsp70

Les transcriptomes préalablement séquencés ont permis d'extraire les séquences de 5 à 6 isoformes d'Hsp70 pour chacune des espèces. L'étude a pris en compte de manière différentielle l'ensemble des isoformes disponibles (Morris *et al.*, 2013).

L'assemblage réalisé au préalable chez *E. crystallorophias* a permis de caractériser 5 isoformes d'Hsp70 différentes (A à E) pratiquement complètes. Quatre séquences potentiellement orthologues (A à D), partielles à l'exception de la forme A, ont pu être retrouvées chez *E. superba* (Clark *et al.*, 2011) Le niveau de conservation des séquences entre les quatre espèces de krill est très élevé et a permis de confirmer sans ambiguïté la co-occurrence de 4 lignées potentiellement paralogues dénommées ici A, B, C et D. Seule la forme E, présente chez l'espèce *E. crystallorophias* ainsi que chez les *Thysanoessa*, mais absente de l'assemblage du transcriptome de *E. superba* n'a pu être partiellement caractérisée que par une amplification spécifique du cDNA sur plusieurs échantillons de *E. superba* avec des amorces hétérologues dessinées à partir de la forme E d'*E. crystallorophias*. Les séquences obtenues à partir des assemblages des transcriptomes ont été confirmées et complétées par RT-PCR en se servant d'amorces hétérologues dessinées chez l'espèce sœur. Compte tenu du taux d'identité élevé et de la spécificité des séquences terminales en 5' ou 3'

pour chaque forme d'Hsp70, une série de protéines complètes a pu être obtenue chez l'une ou l'autre des 4 espèces, à l'exception de la forme E. Chez les deux espèces de *Thysanoessa*, 5 isoformes ont aussi été caractérisées. Cependant, à la différence des espèces australes, la forme A n'a pu être extraite des données transcriptomiques, alors que deux isoformes C (C1 et C2) ont pu être caractérisées chez *T. inermis*, malgré les recherches croisées par Blast interne entre les différentes espèces. Des isoformes de type G ont été de plus postérieurement extraites du transcriptome chez les *Thysanoessa*, puis par blast interne chez *Euphausia*, mais elles n'ont pas été confirmées par RT-PCR et n'ont pas fait l'objet d'une étude d'expression.

Les différentes isoformes sont globalement très proches les unes des autres en terme de séquence primaire avec des pourcentages d'identité élevés (Table 1)**.** Ces pourcentages se situent dans une fourchette comprise entre 68 et plus de 99% d'identité en acides aminés, si l'on exclut de la comparaison la forme D. En effet, celle-ci se démarque nettement avec un taux d'identité en acides aminés relativement faible (40-44%) avec les autres isoformes d'Hsp70. Sa masse est par ailleurs légèrement supérieure à celle des autres Hsp70 caractérisées chez les quatre espèces avec une masse moléculaire (74,5 kDa) qui lui vaudrait plutôt l'appellation d'Hsp74. Les meilleurs scores sont obtenus par Blast avec les séquences d'Hsp70 d'insectes répertoriées en tant qu'Hsp70 cognate-5 et considérées comme mitochondriales bien que ne possédant pas les répétitions de glutamine et la signature PEAEYEEAKK caractéristiques de cette famille. Par contre, la séquence de la région hydrophobe liant les deux régions principales de la molécule (Nucleotide binding Domain - NBD et Substrate binding Domain - SBD) semble en adéquation avec cette assignation (Zuiderweg *et al.*, 2013).

Les isoformes possèdent toutes les motifs IDLGTTYSCV ; TVPAYFND ; NEPTA ; IVLVGGSTRIPKVQKLL attestant de leur appartenance à la famille des Hsp70, particulièrement bien conservés pour toutes les isoformes (Rensing & Maier, 1994). Les isoformes A, B, C, et E comportent toutes les signatures RARFEEL et I/EEVD attestant de leur localisation cytosolique. En revanche, les formes D non cytosoliques ont la signature GPKH spécifique des Hsp70 mitochondriales (Karlin & Brocchieri, 1998). Bien que très conservée, la signature de translocation nucléaire KKXXXXXX XXXRRLRT est elle beaucoup plus variable entre isoformes indiquant des modes de fonctionnement potentiellement différents (Velazquez & Lindquist, 1984). D'autre part, les formes A, E, G et B dans une moindre mesure, présentent des répétitions d'un motif tétrapeptidique (GGMP)

Table 1 : Pourcentage d'identité entre les séquences peptidiques des différentes isoformes d'Hsp70 de *E. superba*, *E. crystallorophias* et *T.inermis.*

comprises entre 1 exemplaire pour les formes B des deux espèces, 4 ou 6 pour les formes A et 3 pour la E (figure 3-1). Cette séquence répétée serait impliquée dans l'interaction avec une protéine co-chaperonne (Demand *et al.*, 1998) et caractériserait les formes constitutives (Fuertes *et al.*, 2004). Elle serait absente des formes inductibles et permettrait, sur la seule information de la séquence, de ranger les formes A, B, E et G parmi les Heat shock proteins constitutives (Hsc). Par contre, les motifs potentiellement impliqués dans la liaison avec l'ATP/GTP sont beaucoup plus variables entre les différentes formes, laissant supposer des modes de fonctionnement différents. Il en est de même pour les possibles sites de glycosylation (NKSI et NVSA) (Laursen *et al.*, 1997). Ce premier site est d'ailleurs complètement absent de la forme D (figure 3-1).

La comparaison des séquences primaires des différentes isoformes de krill avec les formes Hsp70 d'autres espèces de crustacés plus éloignées phylogénétiquement permet de retrouver ces signatures. Ainsi les isoformes de type C des quatre espèces de krill partagent avec les formes 1 et 2 d'Hsp70 de *Rimicaris exoculata* (Ravaux *et al.*, 2007), l'isoforme 1 de *Palaemonetes varians* (Cottin *et al.*, 2010) et l'isoforme de *Fenneropenaeus chinensis* (Luan *et al.*, 2010) en plus de l'absence du tetrapeptide GGMP en extrémité C-terminale, une séquence augmentée de 2 à 4 acides aminés à la localisation particulièrement bien conservée (fig). Comme le caractère inductible de ces isoformes a été expérimentalement démontré chez ces différents décapodes, il paraît raisonnable de postuler aussi, sur la simple homologie des séquences, de la potentielle inductibilité des formes C chez le krill.En règle générale, plusieurs isoformes d'Hsp70 ont été trouvées chez une grande variété d'organismes où elles ont été recherchées, le plus souvent assimilables par leur structure à des Hsc70. Si l'on fait exception des arthropodes dont le génome a été séquencé, il y a toujours une réserve sur la représentativité réelle du nombre des isoformes présentes au sein d'un même organisme. Cependant les études réalisées sur la base de séquences extraites de données génomiques complètes offrent une base de réflexion sur ce sujet, même si les appellations diverses et variées ne facilitent pas l'identification des orthologues, au même titre que l'appellation Hsp70 peut englober, au sens large du terme, des GRP78s (Glucose-Related Protein) ou des TRAPs (TNF receptor-associated protein). Quoiqu'il en soit, le séquençage *de novo* de transcriptomes (RNAseq) représente une alternative au séquençage exhaustif du génome surtout lorsque celui-ci a une taille considérable, comme c'est le cas pour le krill (Jeffery, 2011). Sous la condition de mélanger plusieurs banques de tissus, elle garantit certainement une meilleure représentation de la diversité des isoformes présentes dans l'échantillon qu'une

prospective traditionnelle via des amorces dégénérées en RT-PCR. Il n'en demeure pas moins que certains auteurs rapportent des nombres d'isoformes du même ordre que celles obtenues

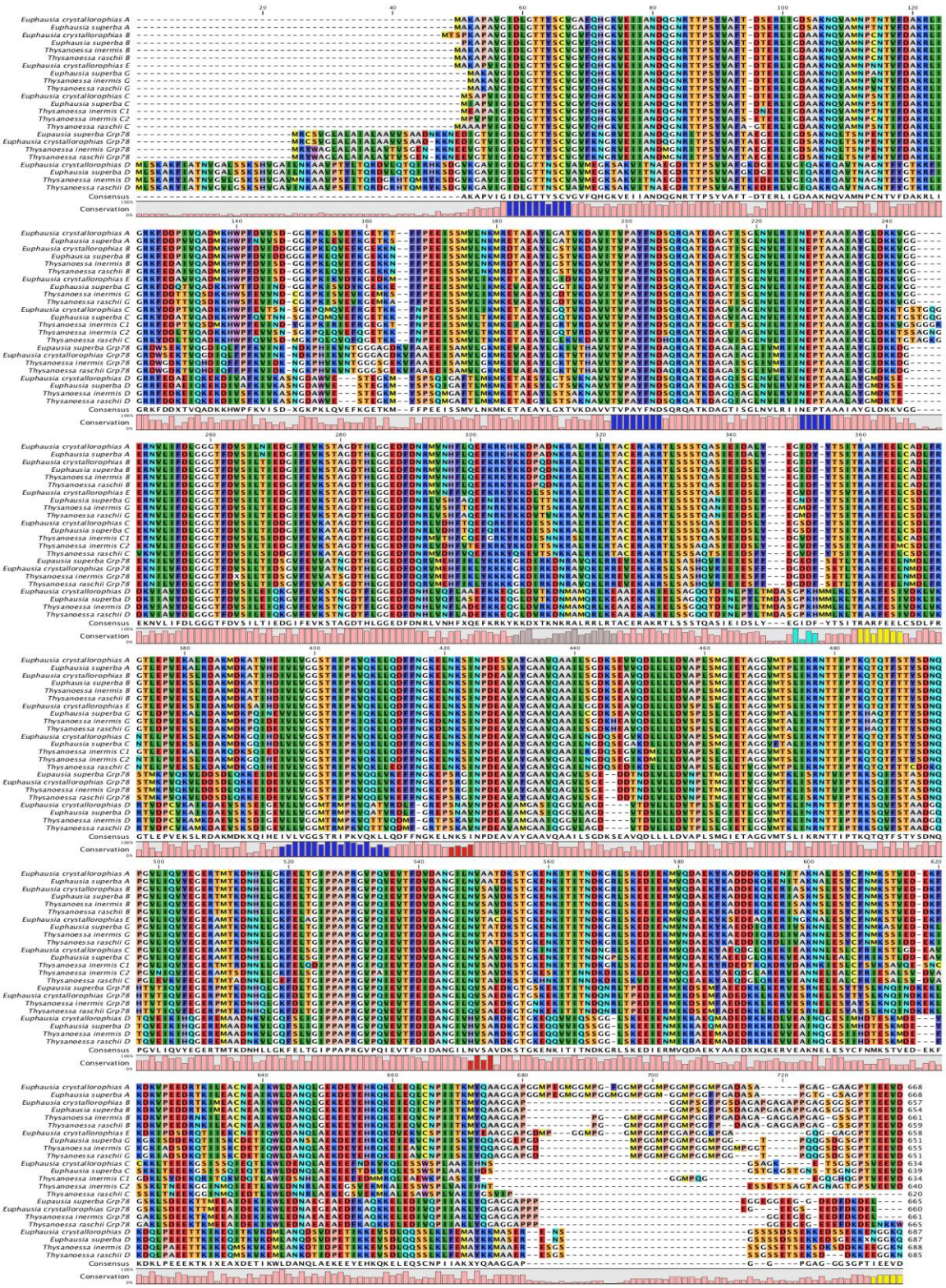

Figure 3-1 : Alignement péptitidique (CLC Main Workbench) des isoformes d'*Hsp70* des espèces *E.superba*, *E. crystallorophias* et *T. inermis* à partir des séquences nucléotidiques obtenues par séquençage direct (Sanger) et séquençage haut-débit du transcriptome (Illumina). Sont représentés par une coloration des histogrammes de consensus certain motif

permettant la caractérisation moléculaire : Les signatures Hsp70 (bleu foncé) ; les motifs attestant de la localisation cytosolique (jaune) ; la signature des Hsp70 mitochondriale (bleu clair) ; les sites de glycolysation (rouge) ; et le signal de translocation nucléaire (gris)

dans cette étude sur les deux espèces de krill. C'est le cas notamment du crabe *Portunus triberticulatus* (Cui *et al.*, 2010) et de la crevette des sources hydrothermales profondes *Rimicaris exoculata* (Ravaux *et al.*, 2007; Cottin *et al.*, 2010) dont quatre isoformes sont présentes dans les banques de données. Cependant, toutes les formes ne se retrouvent pas dans chacune des espèces. Ainsi, chez *P. trituberculatus* aucune isoforme orthologue de la forme C d'euphausiacé n'a été caractérisée à l'heure actuelle alors qu'à *contrario* chez *Rimicaris exoculata* deux isoformes de ce type sont connues pour une seule chez le krill d'Antarctique, mais deux également pour *T. inermis*. Pour souligner davantage la disparité des données, la forme E ne trouve une séquence orthologue que chez le portunidé (ACZ02405.1). Cette dernière est annotée Hsp70 cognate-4 chez les divers insectes chez lesquels elle a été mise en évidence à partir des données génomiques. Les formes G ne trouvent pas non plus d'équivalence dans les banques. Il apparait donc évident que l'approche comparative, que ce soit au niveau quantitatif (nombre d'Hsps présentes) ou qualitatif (type d'Hsp ou Hsc), ne peut déboucher que sur des conclusions limitées. Il n'en demeure pas moins que le nombre d'isoformes identifiées permet, lorsque celui-ci est suffisant, de postuler sur les capacités de thermotolérance des organismes étudiés par simple arithmétique. En effet, il semble exister un lien direct entre le nombre de molécules d'Hsp/c70 présentes et les capacités thermorégulatrices des cellules ou des organismes étudiés (Feder *et al.*, 1996; Krebs & Feder, 1997; Bettencourt *et al.*, 1999b, 2008). Le nombre d'Hsp70s est aussi directement dépendant du nombre de copies des gènes codant pour chacune des isoformes. La diversité des paralogues, qui découle directement de phénomènes de duplication, semble également constituer un critère déterminant dans la réponse au stress thermique (Bettencourt & Feder, 2001). Dans ce cadre, il est concevable que la présence d'une forme supplémentaire puisse soit augmenter la diversité de la réponse Hsp70 à un stress temporaire, soit assurer le maintien d'une expression continue de haut niveau d'Hsc70 pour répondre à un contexte environnemental difficile et persistant. Il est également notable que globalement, toujours structuralement parlant, il n'y a qu'une seule forme dite inductible chez les *Euphausia* pour deux ou trois constitutives, voire quatre si l'on considère ici les formes G qui n'ont pas été confirmées par séquençage. Cette proportion est donc peu en faveur, au niveau cytoplasmique (isoformes se terminant par EVD), des isoformes réputées inductibles chez le krill d'Antarctique. Chez *Rimicaris exoculata* (Ravaux *et al.*, 2007; Cottin *et al.*, 2010) où quatre

formes ont pu être caractérisées, deux sont de vraies inductibles, comme mis en évidence chez

T. inermis. Chez les insectes du genre *Drosophila*, il y a de deux à cinq gènes codant pour des Hsp70 inductibles (Bettencourt & Feder, 2001). La multiplication de ces formes au cours de l'évolution et leur perte chez certains organismes pourrait constituer une réponse adaptative et supporter l'hypothèse selon laquelle l'*hsp70* serait une cible toute particulière de la sélection naturelle (Bettencourt *et al.*, 2008). Les conditions particulièrement difficiles rencontrées dans l'Océan Antarctique sont susceptibles d'avoir eu un rôle discriminant sur ce type de gène et d'être responsables, via l'action de la sélection sur des gènes se dupliquant souvent, de leur sous-fonctionnalisation ou de leur disparition (Prince & Pickett, 2002).

La Grp78 (Glucose related protein of 78kDa) aussi dénommée BiP (immunoglobulin heavy-chain-binding protein) est un membre de la famille des Hsp70s intervenant au niveau du réticulum endoplasmique (ER). Cette protéine joue un rôle essentiel dans la conformation et dans les modifications post-traductionnelles des protéines non glycosylées (Haas, 1994). D'abord caractérisée chez *E. superba* (Clark *et al.*, 2011), elle a été aussi trouvée dans le transcriptome d'*E. crystallorophias*. Les séquences obtenues pour chacune des deux espèces sont, comme pour les autres membres de cette famille de gènes, très proches entre les 2 espèces de krill même si l'identité au niveau de la séquence primaire n'est que de 88,2%. Les deux séquences présentent les trois zones attestant de leur appartenance à la famille ainsi que la partie C-terminale signant leur localisation dans l'ER (KDEL).

3.4. Phylogénie moléculaire des Hsp70

Afin d'analyser les relations phylogénétiques entre les différentes formes de la famille des Hsp70 des quatre espèces de krill et d'établir les relations d'orthologie, une recherche par BLASTp a été réalisée afin de permettre la construction d'un arbre phylogénétique. L'alignement de 72 séquences de Pancrustacés suivi par un traitement par inférence Bayésienne a permis la construction de l'arbre présenté en figure 3-2. L'arbre généré montre que les positions des Hsp70s sont cohérentes par rapport à la phylogénie connue, de par leur position dans l'arbre en groupe frère des décapodes et leur regroupement (Jarman *et al.*, 2000a, 2000b). Ils permettent aussi de distinguer trois ensembles principaux au sein des séquences actuellement disponibles chez les malacostracés et correspondant aux Hsp70

mitochondriales, cytosoliques et aux Grp78. Au sein des séquences cytosoliques deux groupes se détachent : un ensemble regroupant les séquences structurellement affiliées aux Hsc70s et dont des études ont confirmé expérimentalement cet état de fait et un second regroupant les séquences assimilables sur les mêmes critères aux Hsp70s (Liu *et al.*, 2004; Ravaux *et al.*, 2007, 2012; Cottin *et al.*, 2010; Luan *et al.*, 2010). Comme la simple analyse des séquences le laissait supposer de par la présence de signatures caractéristiques, les formes A et B sont positionnées au sein des Hsc70s. Chez *M. fortunata* et *R. exoculata* deux isoformes coexistent également. Cependant, contrairement aux 2 espèces de krill où la diversification des formes A et B est clairement due à un événement de duplication antérieur à l'événement de spéciation ayant conduit aux 2 espèces, l'agencement des séquences montrent que les isoformes de crevettes pourraient être des formes alléliques différentes et non des lignées paralogues. Il est en effet peu parcimonieux de penser que 2 événements de duplication indépendants aient pu générer les 4 isoformes cytosoliques présentes chez les deux crevettes caridés. Au sein de ces Hsc70, paradoxalement les formes issues des caridés sont plus proches des euphausiacés que des pénéides. L'ensemble formé par l'isoforme E et les isoformes G se positionne en groupe frère des lignées A et B. La position des isoformes E et G tend à montrer qu'ils pourraient constituer des formes sœur à la base de l'ensemble formé par les Hsc70s. Leur pourcentage d'identité avec les autres paralogues et leur signature GGMP plaident pour leur intégration à cet ensemble. La seule séquence orthologue potentielle connue chez les crustacés est celle de *P. trituberculatus*, ce qui tend à montrer, soit une sous-représentation de ces isoformes dans les extraits, limitant ainsi ses chances d'être caractérisée de façon reproductible chez les crustacés, soit une simple perte de la lignée chez certains taxons. Il apparait également que les formes E et G sont bien des formes sœur, même si les séquences partielles de certaines de ces séquences n'ont pas permis de les intégrer dans l'arbre. Cette duplication présente chez les quatre espèces souligne une importance particulière de ces isoformes chez les euphausiacés étudiés.

Les isoformes C des euphausiacés se positionnent dans le second ensemble regroupant plutôt les Hsp70s, soit les protéines inductibles. Les longueurs de branches de cet ensemble attestent d'une vitesse d'évolution plus importante de ces isoformes par rapport aux Hsc70s.

Si deux formes ont été caractérisées chez *T. inermis*, une seule est présente dans les transcriptomes des *Euphausia*. Cependant chez *T. raschii*, une courte séquence qui pourrait être assimilable à une forme C1 a été trouvée dans l'assemblage. Les deux séquences en

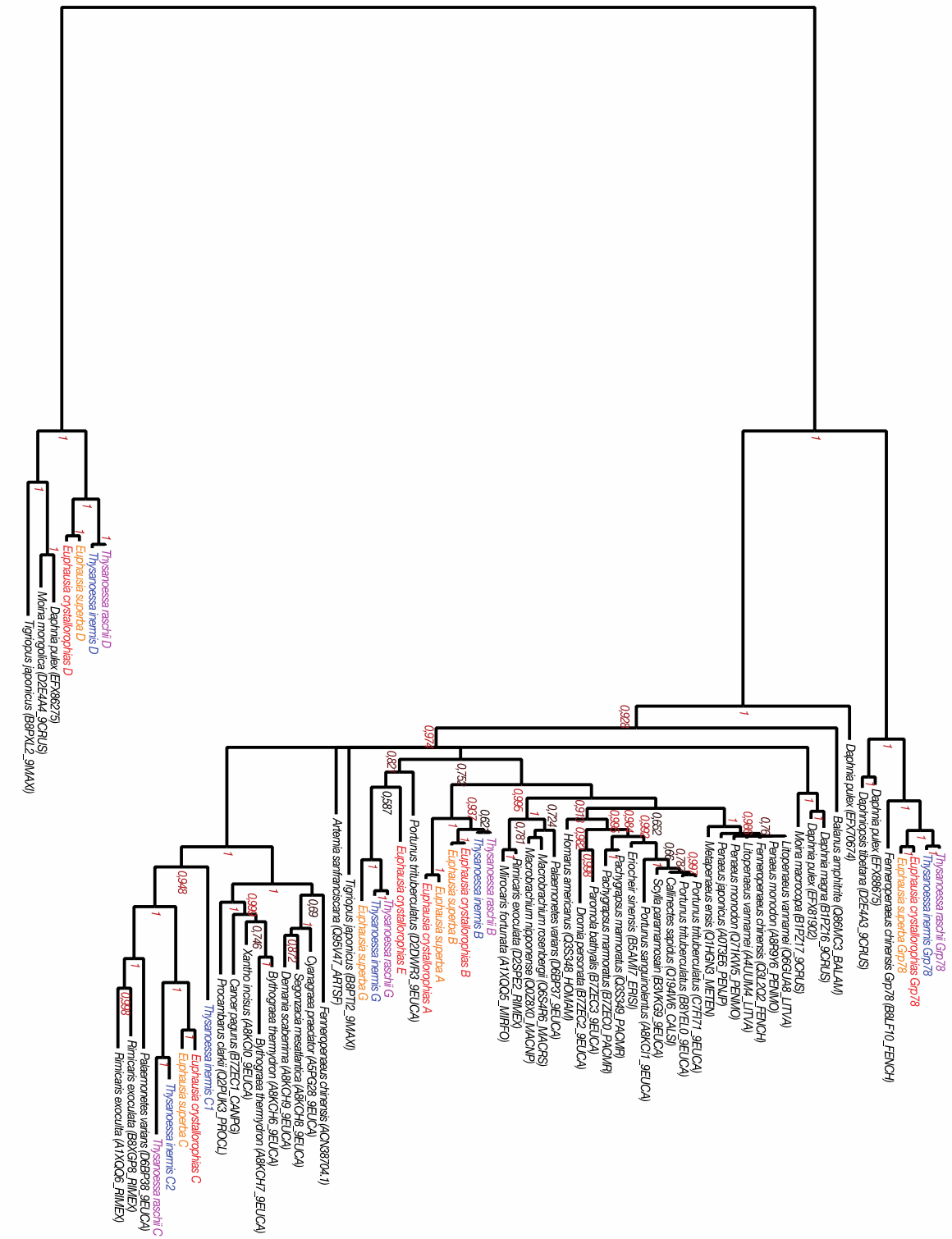

Figure 3-2 : Arbre phylogénétique des Hsp70 et Grp78 d'Eucrustacés construit par inférence Bayésienne. Les différentes Hsp70 de krill apparaissent en couleur.

questions sont, comme dans le cas de *R. exoculata*, portées sur la même branche de l'arbre, branche partagée avec cette même crevette. A ce titre, l'agencement des séquences de la lignée C ne suit pas la phylogénie connue chez les Eucrustacés. En effet, les positions des deux espèces de krill et de la crevette pénéide *F. chinensis*, si elles sont cohérentes dans chacun des sous groupes, ne s'interprète pas sur l'ensemble. Cette observation permettrait d'avancer l'hypothèse de l'existence de deux lignées paralogues de type C ou d'Hsp70s correspondant à chacune des deux branches sœurs avec perte de lignées selon le taxon considéré. En absence de données issues du génome, la mise en évidence de ces deux Hsp70Cs est tributaire d'un différentiel d'expression important ou bien de la perte d'une des formes. Cette dernière hypothèse est pour l'heure peu probable pour deux raisons au moins. En premier lieu, à la base de chacun des groupes se trouvent la crevette pénéide ou le krill. La phylogénie traditionnelle positionne ces deux taxons très proches l'un de l'autre, avec les euphausiacés à la base. Si ce taxon ne possédait qu'un seul des deux paralogues, il est difficilement explicable que ce soit justement l'autre forme qui soit portée par la pénéide. En second lieu, la longueur des branches tend à montrer que le groupe qui rassemble les Caridés et les Euphausiacés évoluerait plus rapidement, laissant supposer un allègement de la pression de sélection sur une des isoformes issues par duplication. Enfin, le fait qu'il ait été établi que la drosophile était ancestralement porteuse de deux gènes hsp70s constitue aussi une donnée à considérer dans le cadre d'une phylogénie intégrant les Pancrustacés (Bettencourt & Feder, 2001).

Néanmoins, il est impossible d'occulter le fait que, au sein des formes A et B des Eucarides et comme mentionné précédemment, la position des caridés et des pénéidés semble avoir été intervertie dans cet arbre. Si cette structure est reportée sur les formes C, elle invaliderait l'hypothèse précédente et plaiderait alors pour une unique lignée de forme inductibles.

Afin de valider les observations structurales au niveau fonctionnel et de marquer les limites inférieures du stress thermique, les isoformes caractérisées au sein des 3 espèces (*T. raschii* n'a pas pu être conditionnée en raison d'un manque d'effectif) ont fait l'objet d'un suivi d'expression par PCR quantitative lors d'augmentations de la température du milieu.

4. Suivi de l'expression des *Hsp70* en réponse à une augmentation de la température du milieu

4.1. Introduction

Trois espèces différentes de krill ont été choisies pour cette étude. Deux espèces d'Antarctique, *Euphausia superba* et *Euphausia crystallorophias*, et une d'Arctique, *Thysanoessa inermis.* Ces trois espèces ont évolué au gré des courants marins, structurant les populations et engendrant des phénomènes de spéciation (Zane & Patarnello, 2000). Toutes trois représentent un maillon clé des chaines trophiques de leurs écosystèmes respectifs. Dans le contexte actuel de réchauffement climatique, l'impact négatif d'une hausse de température sur ces espèces serait à l'origine de bouleversement des écosystèmes, amenant au remplacement de ce maillon par d'autres espèces ne pouvant assumer le même rôle écologique (Atkinson *et al.*, 2004b). C'est pourquoi il est important d'investiguer sur les capacités de réponse à une hausse de température sur ces espèces. Afin de mettre en évidence la présence d'un stress thermique, ces trois espèces ont été soumises à des chocs thermiques de faible intensité (en accord avec les prévisions du GIEC, bien que les chocs soient instantanées), puis leur réponse HSP a été analysée lors de ces chocs thermiques. La réponse HSP est caractéristique d'un stress thermique, et s'apparente entre autre à l'expression des Hsp70. Mise en évidence pour la première fois chez *Dorophila busckii* par l'augmentation de la synthèse d'ARN lors d'un choc thermique (Ritossa, 1962), ce n'est que plus tard que la réponse HSP a été caractérisée (Lindquist, 1986). Depuis, de multiples études recensent les réponses HSP chez plusieurs types d'organismes (modèles comme non modèles) via l'étude de l'expression des *Hsp70.* L'observation de l'induction de la transcription de ces molécules lors d'un stress thermique a permis l'utilisation des Hsp70 comme bio-marqueur de stress (Colson-Proch *et al.*, 2010).

La réponse HSP est un mécanisme moléculaire conservé au cours de l'évolution et présent chez tous les phyla. Lors d'un stress, les protéines dénaturées vont être prises en charge par la famille des Hsc70, ce qui va lever la répression du facteur de transcription (HSF) qui une fois trimérisé va induire l'expression des Hsp70 qui vont chaperonner les protéines dénaturées et permettre la récupération de leur structure tridimensionnelle originelle (Morimoto, 1998). Ainsi la réponse usuelle observée lors d'un stress thermique est l'augmentation de la transcription comme de la traduction des Hsp70.

Bien que présente dans tous les phyla, la réponse HSP ne s'articule pas forcément de la même manière, et présente de grandes variabilités de réponse. Ce qui va prédéterminer le type de réponse va être dépendant des contraintes environnementales et de l'évolution de la réponse HSP, sous ces régimes sélectifs, chez les organismes cibles. En effet, l'expression d'HSP constitue un cout évolutif (compromis évolutifs entre reproduction, croissance, et développement) qui est à l'origine de la variabilité de réponse observée selon les organismes étudiés (Sørensen *et al.*, 2003).

4.2. Matériels et Méthodes

4.2.1. Protocoles expérimentaux des chocs thermiques

Le krill d'Antarctique pêché lors de la campagne 2010 (*cf* Matériels et méthodes Chapitre 2), a été soumis à différents types de chocs thermiques. Après une stabulation de 24 heures environ, le krill est directement placé dans des aquariums thermostatés à 3°C et à 6°C pendant 3h et 6h, conditions assimilables à un choc thermique en référence au milieu d'origine. Ensuite, les individus sont transférés dans un bac de dit « de récupération » à une température de 0°C, température pré-expérimentale, pendant 6h. Au cours de ces différents traitements, des animaux sont échantillonnés à 3h et 6h de choc, puis toutes les 2 heures pendant la récupération (noté PC pour Post-Choc). Chaque individu est directement plongé dans l'azote liquide, puis conservé à -80°C de retour au laboratoire, dans l'attente des analyses moléculaires (figure 4-1). Une fois les échantillons rapatriés à la station Biologique de Roscoff, l'ARN total de chaque individu est extrait de l'abdomen, puis rétro transcrit afin d'analyser les cinétiques d 'expressions des différentes isoformes d'*Hsp70* caractérisées précédemment, par PCR quantitative.

Un protocole similaire a été suivi pour l'espèce pêchée en Arctique *Thysanoessa inermis*, lors de la campagne 2012 à Ny-Alesund. *T. inermis* vit dans des eaux à 4°C (pendant l'été). Les chocs thermiques ont donc été effectués à 6°C et à 10°C, avec une récupération à 4°C. La durée des chocs a été la même que pour les espèces d'Antarctique. De plus, il a été possible d'échantillonner les individus après 1h30 ; 3h ; 4h30 et 6h de choc. Puis, les cinétiques d'expressions des différentes isoformes d'*Hsp70* ont été suivies par PCR quantitative.

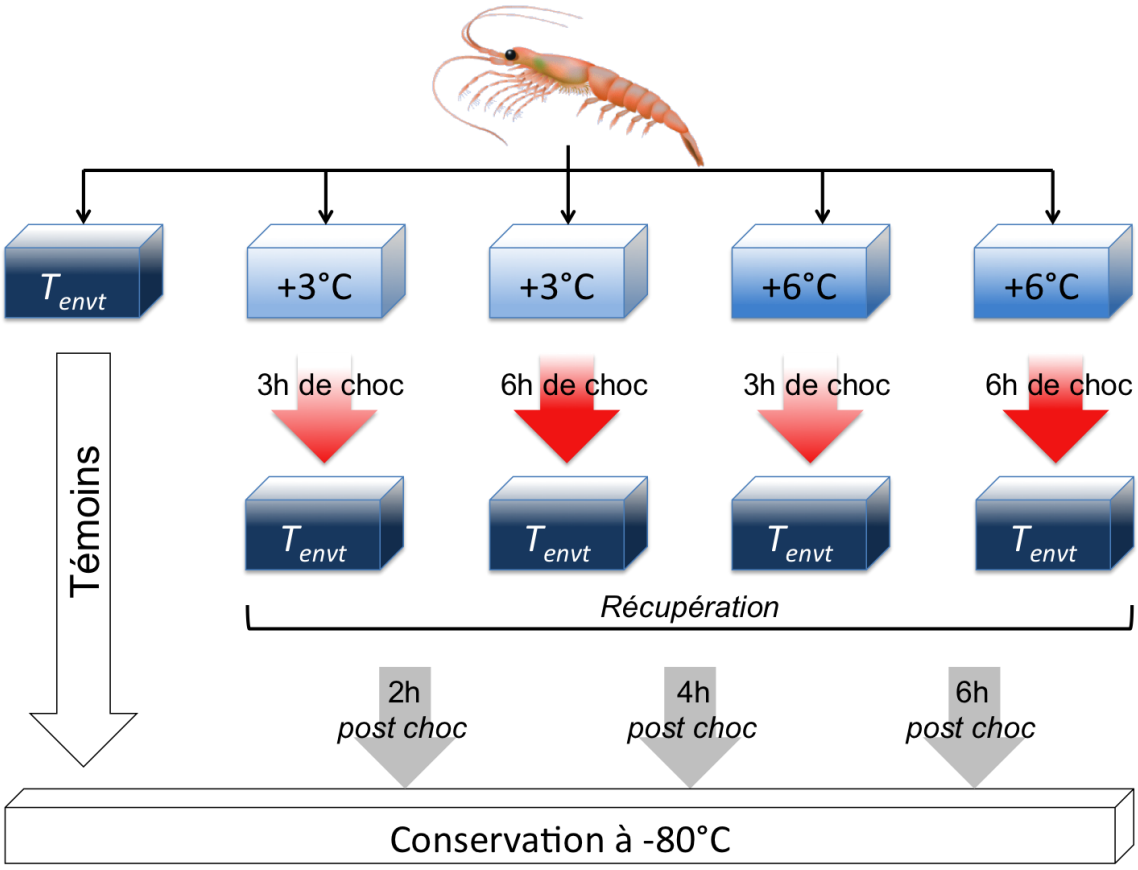

Figure 4-1 : Protocole expérimental d'augmentation de la température du milieu sur les trois espèces de Krill, afin d'analyser l'expression des *Hsp70*. La température est augmentée de 3°C et 6°C par rapport a la température où vivent les espèces étudiées (T_{envt}), soit 0°C pour les espèces Antarctiques (*E. superba et E. crystallorophias*) et 4°C pour l'espèces Arctique (*T. inermis*)

4.2.2. La PCR quantitative (qPCR)

4.2.2.1. Principe

La PCR quantitative est une méthode qui permet, entre autres, de déterminer la valeur d'expression d'un gène. Elle repose sur le principe d'une réaction en chaine par polymérase (PCR), c'est à dire l'amplification d'un ADN cible. Cette amplification se fait par la succession de cycles de dénaturation à 95°C, d'hybridation à la température spécifique des amorces utilisées pour cibler l'ADN, et d'élongation à 72°C, soit la température optimale de fonctionnement de la polymérase qui néo-synthétise le brin cible. La quantité des nouveaux brins synthétisés suit alors une loi de 2^n à partir d'un seul brin cible.

Lors d'une PCR quantitative, les étapes sont les mêmes à la différence que le mélange réactionnel contient un intercalant fluorescent de l'ADN : Le SYBR Green. Cet intercalant émet un signal fluorescent lorsqu'il est inséré dans un double brin d'ADN (figure 4-2). La fluorescence émise est alors mesurée à chaque cycle d'amplification.

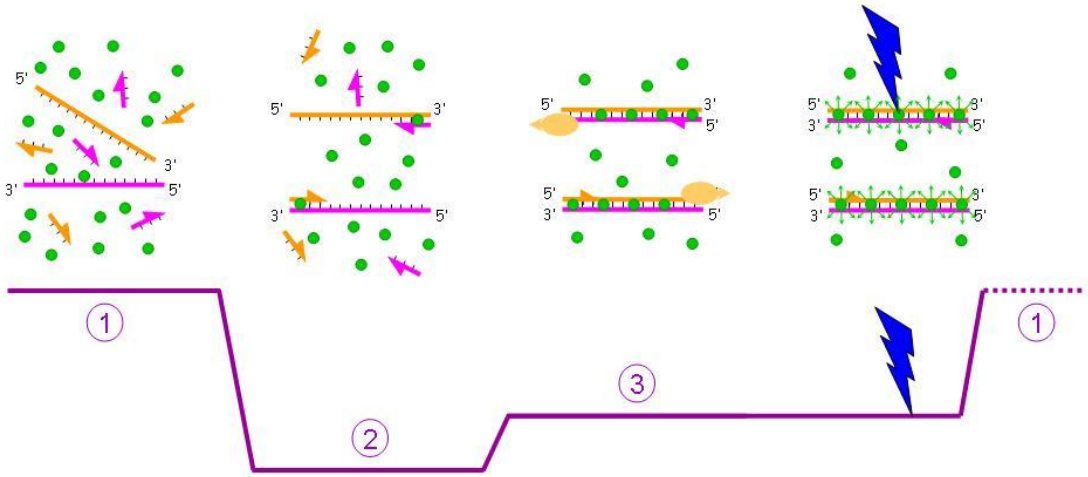

Figure 4-2 : Déroulement d'un cycle de qPCR : (1) Dénaturation à 95°C ; (2) Hybridation à la Tm des amorces (3) Elongation à 72°C (ou 60°C sur LC480 Roche). L'intercalent le SYBR green est emprisonné dans le double brin et émet une fluorescence à chaque cycle.

La quantité initiale d'un fragment cible sera alors déterminée par le nombre de cycle nécessaire pour que la fluorescence émise dépasse un seuil détectable par un capteur laser. Ce nombre de cycle (Cp) est déterminé par la méthode mathématique de la double dérivée maximale.

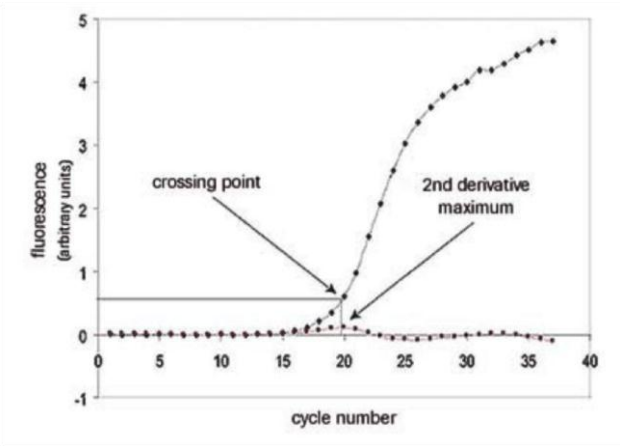

Figure 4-3 : Profil d'amplification lors d'une qPCR. Le « crossing point » (Cp) représente le nombre de cycle auquel la quantité d'amplicon dépasse le seuil du bruit de fond. Celui-ci est déterminé par seconde dérivée maximum.

Afin de déterminer l'expression d'un gène, la qPCR s'effectue sur des ADNc issus de la rétro-transcription des ARNs totaux de l'échantillon. Le protocole intégral, de l'extraction à l'analyse de l'expression, se fait en plusieurs étapes qui comportent toutes des biais techniques pouvant directement influer sur les résultats et la fiabilité de la qPCR.

4.2.2.2. Extraction d'ARN totaux

Les échantillons doivent être constamment conservés au moins à -80°C jusqu'au moment de l'extraction, afin d'éviter l'action des RNases omniprésentes. L'utilisation d'une solution inhibant l'action des RNases reste pour certains une alternative à la conservation de leur échantillon à -80°C. Cette technique peut malgré tout être à l'origine de dégradation des ARNs, dans la mesure où l'efficacité inhibitrice peut être insuffisante en fonction de l'échantillon utilisé. De plus, lorsqu'il s'agit d'un tissu animal, la taille de ce dernier va influer sur la vitesse de pénétration de la solution dans les tissus et ainsi laisser le temps aux RNases d'être actives, causant des dommages irréversibles sur les ARNs devant être analysés.
La congélation de l'échantillon dans l'azote liquide reste le meilleur moyen de stopper tout réaction moléculaire de façon quasi-instantanée dans l'ensemble d'un tissu. De même, l'extraction doit se dérouler dans un environnement le moins propice à la contamination et à la dégradation d'ARN (cônes à filtres, tubes autoclavés, gants, instruments stériles, manipulation sous hotte).
Pendant l'extraction des ARNs, l'échantillon doit être immédiatement transféré dans un tampon de lyse dénaturant l'ensemble des protéines, et broyé dans celui-ci. Pour le krill, un broyage avec des billes d'acier pendant 2-3 min est suffisant.
Lors de cette étude deux techniques d'extraction ont été testées et la plus performante a été ensuite appliquée à la totalité des échantillons.
La première extraction, la plus traditionnelle, est réalisée dans du Trizol et suivie d'une séparation de phase au phénol-chloroforme, pour isoler les ARNs.

Protocole détaillé

Les ARN totaux ont été extraits à partir de l'abdomen d'individus conservés à -80°C. Les tissus ont été broyés dans du TRI Reagent® (Sigma). Une séparation des phases a été effectuée en ajoutant du chloroforme et en centrifugeant 15min à 12000g à 4°C (l'ensemble des centrifugations a été réalisé à cette température et cette vitesse). Après transfert de la phase aqueuse contenant les ARNs, deux types de précipitation à l'ispropanol ont été testés : une précipitation directe (0.5mL d'isopropanol par mL de Trizol de départ) et une précipitation en deux temps (0.1 mL/mL de Trizol puis 0.4mL/mL de Trizol) (centrifugation de 10min, 14000g entre les deux précipitations). Les ARNs ont alors été lavés deux fois avec de l'éthanol à 75% froid et resolubilisés dans de l'eau sans RNase par incubation à 55°C. Un dosage au Nanodrop 1000® (Thermo Fisher Scientific) a alors été réalisé pour vérifier la quantité d'ARN extraite ainsi que sa pureté.

Cette méthode comporte avantages et inconvénients. Elle est peu coûteuse, et permet d'extraire de grandes quantités d'échantillon et de ce fait de plus grandes quantités d'ARN (de l'ordre de plusieurs µg). Cependant avec cette méthode, il est possible que les ARNs soient accompagnés par des quantités non négligeables d'ADN pouvant fausser les résultats d'expressions géniques. Il est donc fortement conseillé d'appliquer un traitement DNase sur chaque échantillon, rendant l'extraction plus lourde. Autre inconvénient, après l'élution finale, la solution d'ARN extrait n'est pas pure. La contamination est difficile à éviter et nécessite la multiplication des étapes de lavage, qui en contre partie réduisent les quantités d'ARN total finales. L'indice de contamination est donné par mesure spectrophotométrique avec un nanodrop en mesurant les ratios d'absorbance 260/280nm et 260/230nm. Le ratio d'absorbance 260/280 indique une contamination protéique et phénolique (260nm étant la longueur d'onde à laquelle les protéines absorbent) et le Ratio 260/230 indiquant la contamination aux phénol et les glucides.

Les ratios sont avec cette méthode respectivement de 1,8 et 1 (au lieu de 2,10 et 2) en moyenne montrant une contamination protéique (malgré l'utilisation du choroforme) et aux phénols. Les phénols (indispensables à la séparation des phases) lors de l'extraction, se retrouvent jusqu'à l'élution finale dans les ARNs, en raison de la multiplication limitée des étapes de lavage (perte de matériel à chaque lavage). La faible qualité générale des échantillons issus de ce type d'extraction, peut alors causer des biais lors de la rétrotranscription et de la qPCR elle même. Par exemple il a été souvent observé la présence de plus d'un produit d'amplification, rendant impossible l'exploitation des résultats. Une ou deux solubilisations à l'acétate d'ammonium permettent de retrouver des ratios qualitatifs

mais avec un risque de perte de matériel supplémentaire et un allongement non négligeable de la manipulation.

L'autre méthode testée consiste à utiliser une colonne qui fixe spécifiquement les ARNs sur une membrane (RNeasy Kit). Le principe est que l'échantillon, après avoir été broyé dans un tampon de lyse dénaturant, et les ARNs précipités à l'alcool à 75%, est déposé sur une colonne comportant une membrane de silice capable de lier spécifiquement les ARN. Une fois sur la membrane, les ARN sont supposés être nettoyés de tout contaminant par l'utilisation de plusieurs tampons de lavage. Il est aussi proposé, afin d'éviter toute contamination génomique, un traitement DNase lors de cette extraction. L'inconvénient principal de cette méthode est que la capacité de liaison de l'ARN est limitée (100µg) et que l'utilisation d'une trop grande quantité de tissu obstrue cette colonne en la saturant. Elle perd ainsi sa capacité de liaison spécifique à l'ARN. Il est donc préférable d'utiliser de faibles quantités d'échantillon, ce qui ce révèle être un avantage pour l'extraction du krill qui est assez petit (2 à 6cm selon l'espèce). Il est donc possible d'effectuer plusieurs extractions pour un même individu, ce qui laisse une marge de manœuvre en cas de problème d'extraction. La qualité de l'ARN avec cette méthode est bien supérieure qu'avec la méthode précédente : le ratio 260/280nm varie entre 2,10 et 2,12 , quant au ratio 260/230nm il varie entre 1,9 et 2. Une telle qualité d'ARN est bien sur préférable pour la suite du protocole, et *in fine* pour la qPCR. En effet l'utilisation de ce type d'échantillon n'a pas montré de défaut majeur et généralisé. Il est à noter que le traitement DNase (optionnel) n'est pas incontournable lors de cette extraction car aucune différence majeure n'a été détectée entre les résultats d'échantillons traités ou non. Les produits d'élution ne seraient donc pas contaminés par de l'ADN génomique.

Cette seconde méthode d'extraction d'ARN a donc été choisie pour l'ensemble de cette étude, dans le but de minimiser les biais liés à la qualité de l'ARN et aux contaminations (protéines, phénols, ADNg)

4.2.2.3. Rétro-transcription

Afin de quantifier l'expression d'un gène, les ARNs totaux doivent être rétro-transcrits et convertis en ADN complémentaire. La rétro-transcription est un processus biologique connu chez certain virus (rétro virus) pour convertir l'ARN en un ADN complémentaire simple brin (figure 4-4). Ce processus est utilisé en biologie moléculaire pour effectuer *in vitro* la même opération afin d'analyser l'ARN moins stable que l'ADNc.

Protocole détaillé
Les ARN totaux (concentration de 1 ou 0.5 µg/µL) ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires. L'ARN a été ajouté à de l'eau sans RNase et du SKdT , une amorce polyT. Après incubation de cinq minutes à 70°C et un choc thermique sur glace de cinq minutes, du 5X Buffer® (Promega), des dNTPs, de la RNasin (inhibiteur de RNases)®, l'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase® (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; Promega) et de l'eau sans RNase ont été ajoutés, puis incubés 90 min à 37°C.

C'est cet ADNc qui, représentatif de l'ARNm présent, sera utilisé comme matrice lors de la qPCR. La quantité d'ARN doit est préalablement normalisée et donc dosée afin de rétro-transcrire la même quantité d 'ARN (ici 1µg ou 0,5 µg) pour tous les échantillons.

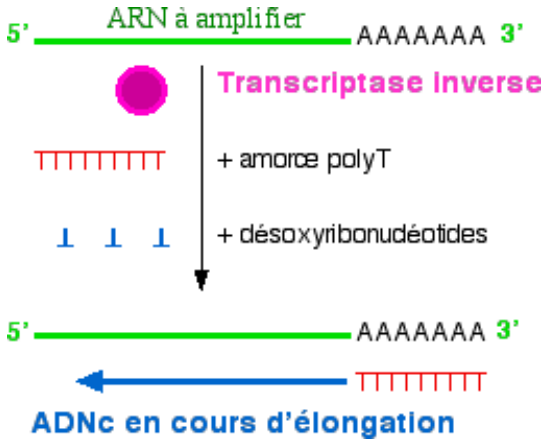

Figure 4-4 : Schéma représentant la rétrotranscription, c'est à dire la conversion d'un ARNm en ADN complémentaire grâce a une transcriptase inverse se liant sur la zone poly A de l'ARNm.

La rétro-transcription comporte cependant un biais qu'il est important de prendre en compte afin de quantifier correctement l'expression d'un gène. Lors de la conversion de l'ARN en ADNc, la transcriptase inverse se fixe sur une amorce poly dT employée pour cibler spécifiquement les ARN messagers qui ont tous une terminaison poly A (figure 4-4).

La synthèse de l'ADNc va donc se faire depuis la partie 3' du gène vers la partie 5' de celui-ci. Or, un ARNm peut avoir une longueur très variable pouvant atteindre plusieurs milliers de bases, surtout lorsque la partie 3'UTR est grande. La transcriptase inverse n'a pas la capacité de rétro-transcrire de très longs fragments et peut générer ainsi des ADNc incomplets principalement dans la zone 5' d'un gène.

4.2.2.4. Conception des amorces

Dans le cas de l'analyse de l'expression de différentes isoformes d'*Hsp70*, la conception d'amorces spécifiques de chaque isoforme est particulièrement difficile compte tenu de la haute conservation des séquences codantes pour les *Hsp70*. Cependant, il existe au sein des séquences quelques *loci* plus variables que d'autres. Un de ces sites variables se trouve en partie 3' des séquences. Le site de conception des amorces a été choisi dans cette zone en raison de sa variabilité mais aussi afin de minimiser les biais liés à la rétrotranscription (voir paragraphe ci-dessus). Les amorces ont été dessinées dans cette zone sur des motifs variables tels que la région terminale et lorsque cela a été possible dans les région 3' UTR bien plus spécifiques de chaque isoforme. Néanmoins, les parties 3' UTR étant bien plus riches en A/T, il n'a pas été possible de positionner systématiquement les amorces dans ces régions.

La conception d'amorces pour la qPCR répond à des règles sensiblement différentes que pour les PCR classiques. Les amorces doivent avoir une composition en G/C proche de 50%, et de ce fait une taille moyenne de 20pb. Il est important qu'il n'y ait pas de structures secondaires associées aux amorces dessinées pouvant provoquer une hybridation non spécifique du gène cible. Une Tm de 60°C, température d'élongation de la polymérase du kit de qPCR Roche, est requise. Et finalement, la taille du fragment amplifié ne doit pas dépasser les 200 pb, afin de ne pas provoquer une saturation précoce du signal liée à la taille de l'amplicon, mais aussi pour maintenir un temps d'élongation court (de l'ordre de 15 secondes).

Les multiples paramètres à contrôler sont d'autant plus difficiles à respecter que la zone de positionnement des amorces est très réduite. Il a donc été nécessaire de vérifier par séquençage direct le produit d'amplification de chaque couple d'amorces utilisé pour analyser l'expression des différentes isoformes d'*Hsp70*, et vérifier qu'il soit bien spécifique. De plus, lors de la qPCR elle même il est important de s'assurer qu'il n'y a qu'un seul type de produit d'amplification. Pour ce faire des cycles de dénaturation/renaturation à différentes températures vont déterminer la température de demi-hybridation du fragment amplifié (Tm). Si un seul pic apparaît pour tous les échantillons testés alors l'amplification est bien spécifique et les résultats peuvent être pris en compte.

4.2.2.5. Efficacité de qPCR

Les amorces doivent aussi présenter des efficacités optimales qui vont dépendre de tous les paramètres énoncés précédemment. Les efficacités doivent être comprises entre 90% et 110%. Cette efficacité détermine le facteur d'amplification lors de la réaction de PCR (figure 4-5). Lors d'une PCR chaque cible est copiée, la quantité de brin néosynthétisé va donc croître exponentiellement, en suivant une loi mathématique de 2^n (n étant le nombre de cycles de PCR). Cela implique que chaque amorce trouve sa cible et qu'une copie soit créée pour chaque brin présent dans le mélange réactionnel. La valeur d'efficacité de 2 correspond donc à une efficacité de 100%. Une efficacité de 90 % va indiquer que le mélange contient des inhibiteurs de polymérase ou mettre en évidence la non spécificité des amorces, ou la présence de structure secondaire de ces derniers. En revanche une efficacité de 110% va plutôt indiquer la formation de dimères d'amorces, ou la présence d'un second produit d'amplification (détectable par Tm calling)

Cette efficacité doit donc être déterminée pour chaque couple d'amorce utilisée. Elle est définie en quantifiant la quantité d'ADNc présente pour chaque point d'une gamme de dilution. Le logarithme de la concentration d'ADNc en fonction du Cp permet d'obtenir une droite dont le coefficient directeur (a) indique la valeur d'efficacité selon la formule $E=10^{-(\frac{1}{a})}$.

L'efficacité doit être mesurée lors de chaque run de qPCR avec un mélange équimolaire de l'ensemble des échantillons utilisés. L'efficacité (E) donnée lors du run sera utilisée afin de réajuster les valeurs d'expression (Exp) :

$$Exp = (E_{gene\ cible})^{-Cp\ cible}$$

Cette démarche permet de prendre en considération les variations potentiellement liées à l'expérimentation elle-même (plaques différentes échantillons différents, etc...) qui pourraient biaiser les résultats et donc les interprétations, particulièrement lorsque les variations observées sont faibles.

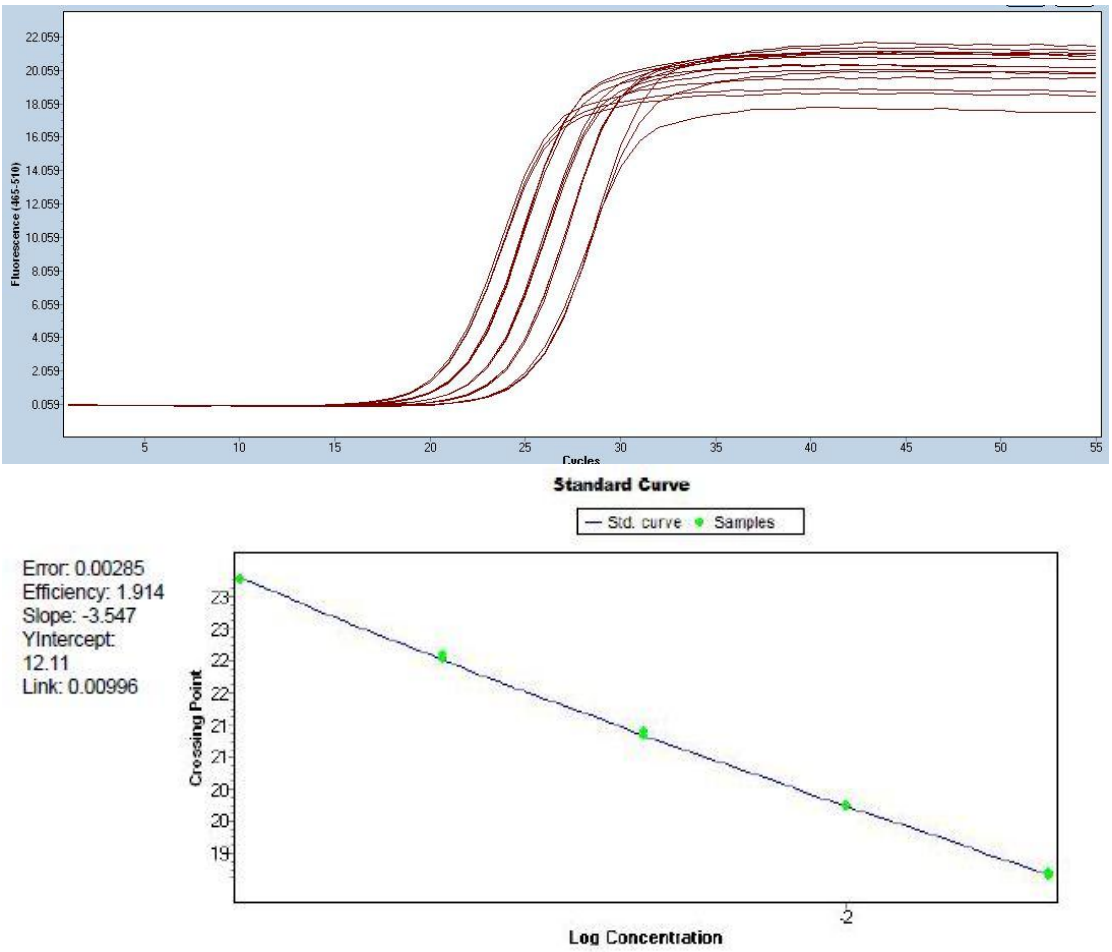

Figure 4-5 *:* Gamme d'amplification de produit de retro-transcription visant à déterminer l'efficacité d'un couple d'amorce, noté Efficiency. (Courbes obtenues avec le logiciel Light Cycler480 de Roche©)

4.2.2.6. Quantification relative

Outre la quantification relative (expliquée ci-après), il existe un mode de quantification dite « absolue ». La quantification consiste à exprimer les valeurs d'expression en nombre de copies. Cette méthode nécessite une bonne connaissance du génome de l'organisme étudié, notamment de la taille et du poids total, mais aussi le nombre de copies des gènes cibles étudiés. Il est alors possible de déterminer le nombre de copies du gène cible dans l'échantillon en fonction de la quantité d'ADN génomique utilisée dans une gamme étalon. Un autre moyen est d'insérer le(s) gène(s) à étudier dans un plasmide bactérien. Une gamme étalon de ce plasmide modifié renseignera aussi sur le nombre de copies présent dans l'échantillon à tester. Cependant, cette quantification absolue comporte une première limite évidente qui est de séquencer le génome, tâche plus ou moins aisée en fonction de la taille

d'une part, et d'autre part de la disponibilité d'un génome de référence. La seconde limite est liée au fait qu'il est impossible d'évaluer l'efficacité d'une PCR sur un échantillon qui est composé d'ADNc alors que la gamme de dilution est réalisée avec de l'ADN plasmidique ou génomique.

En l'absence de données génomiques, la quantification relative s'est imposée afin de déterminer les niveaux d'expression de chaque isoforme. Pour ce type de quantification il est nécessaire d'analyser l'expression d'un gène dit de référence qui permettra de normaliser les expressions des gènes cibles. Le gène de référence est utilisé afin de déterminer un « état transcriptionnel basal», et permet de normaliser la valeur d'expression du gène cible dans un échantillon donné. Le gène référence se doit d'avoir une expression stable dans les conditions expérimentales testées et au sein de la population analysée. Il est donc primordial que le gène de référence choisi n'intervienne pas dans la régulation du gène cible, sinon leur expression serait susceptible de varier l'un en fonction de l'autre, rendant impossible toute quantification différentielle.

Quatre gènes de références candidats on été sélectionnés en raison de leur utilisation lors d'analyses similaires sur d'autres invertébrés marins : La glycéraldéhyde-3-Phosphate déhydrogénase (GAPDH), le facteur d'élongation 1-alpha (EF1-a), la sous unité ribosomale 60S L8 (RPL8) et la sous unité ribosomale 18S (18S). L'expression de ces quatre gènes a été suivie lors des différentes conditions. La sélection du meilleur candidat a été réalisée à l'aide des algorithmes Best-Keeper, Genorm et NormFinder qui testent l'homogénéité de l'expression au cours des expériences. Le gène 18S a été systématiquement celui qui présentait la meilleure stabilité d'expression chez *E.superba* et *E.crystallorophias*. Il a donc été choisi comme gène de référence pour la quantification relative des expressions d'*Hsp70*. Le 18S a donc permis de normaliser les expressions des isoformes d'*Hsp70* en calculant l'Expression Normalisée Moyenne (MNE pour Mean Normalized Expression ; Muller 2003) de plusieurs réplicas biologiques.

$$MNE = \frac{(E_{hsp70})^{-Cp\ hsp70}}{(E_{18S})^{-Cp\ 18S}}$$

Le choix d'un bon gène de référence est donc capital pour quantifier avec précision la variation d'expression d'un gène. En effet, le meilleur gène de référence possible n'est pas

systématiquement le même selon le traitement effectué et l'espèce étudiée. Il est alors nécessaire de redéfinir le gène de référence entre lots d'échantillons ayant subit des traitements indépendants et issus d'échantillonnages indépendants.
L'utilisation de plusieurs gènes de références, entre 3 et 5, et de la moyenne géométrique de leur expression comme normalisateur permet de limiter les légères variations d'expression (pouvant être aussi dues à des biais techniques). Un facteur de normalisation (NF) est dans ce cas défini par la moyenne géométrique de l'expression des gènes de références choisis, et remplace le gène de référence seul lors du calcul d'expression. Cette méthode a été utilisée pour la normalisation de l'expression chez *T. inermis* où un NF a été calculé a partir des gènes 18S et RPL8.

$$MNE = \frac{(E_{hsp70})^{-Cp\ hsp70}}{NF}$$

4.2.2.7. Protocole

Un run de qPCR doit donc suivre un certain cahier des charges pratiques, pour minimiser les biais expérimentaux et techniques. En tout premier lieu chaque «point» doit être effectué en triplicat technique. Chaque gamme permettant d'établir les efficacités doit être faite pour tous les gènes présents sur la plaque. Il est aussi important d'analyser le(s) gène(s) de(s) référence(s) en même temps que les gènes cible, pour pallier aux variations entre runs.

En conclusion, la PCR quantitative est une méthode puissante de plus en plus répandue, puisqu'elle a été utilisée dans plus de 25 000 publications pendant les 10 dernières années. Cependant, il n'existe pas de réel consensus sur la marche à suivre afin d'obtenir des données fiables d'expression de gènes. La multitude des biais techniques possibles engendre une grande variabilité des résultats (s'ajoutant à la variabilité biologique déjà existante en particulier chez les invertébrés marins), qui parfois altère la recevabilité des résultats. Une rigueur toute particulière est donc indispensable, notamment dans la prise en considération des biais possibles et la limitation de leur influence dans les calculs finaux.

4.2.2.8. Statistiques

Les MNE obtenues ne suivant pas de loi Normale, les résultats sont comparés statistiquement, à l'aide du logiciel graphPad Prism 5, par un test de Kruskal-Wallis (ANOVA non paramétrique), suivi d'un test post hoc de Dunn. Seul les différences statistiques entre le groupe témoin et les groupes soumis à un choc thermique sont représentées (P value < 0,05).

4.3. Résultats

4.3.1. Cinétiques d'expression de *E. superba* et *E. crystallorophias*

4.3.1.1. Choc thermique de 3°C

Les expressions de 5 isoformes d'*Hsp70* des deux espèces antarctiques, *E. superba* et *E. crystallorphias,* ont été analysées par PCR quantitative lors d'un choc thermique de faible intensité. Ce choc a été effectué à 3°C et 6°C pendant 3 et 6 heures, et a été suivi d'une récupération de 6h dans une eau à 0°C (mesurée comme la température du milieu de vie). Les isoformes notées arbitrairement de A à E ont des identités différentes, qui ont été confirmées par l'analyse phylogénétique des séquences codantes pour ces gènes. Les Hsp70 A B et E sont structurellement et phylogénétiquement classées dans la famille des Hsp70 constitutives (Hsc70) et seraient donc exprimées de manière constante, l'isoforme C est assimilable par les mêmes analyses à une forme inductible (Hsp70), et finalement l'isoforme D est mitochondriale. Le choc thermique appliqué aux deux espèces a été volontairement choisi de cette faible intensité afin de ne pas être surdimensionné par rapport à la question posée, liée aux conséquences d'un réchauffement climatique. Ainsi, ce type d'expérience vise à évaluer la limite inférieure de tolérance thermique du krill d'Antarctique, dans un contexte de réchauffement global, en mettant ces espèces dans des conditions thermiques proches ou légèrement supérieures à celles qu'elles seraient amenées à rencontrer. Les Hsp70 servent dans ce cadre de bio-marqueur de stress dans les conditions décrites.

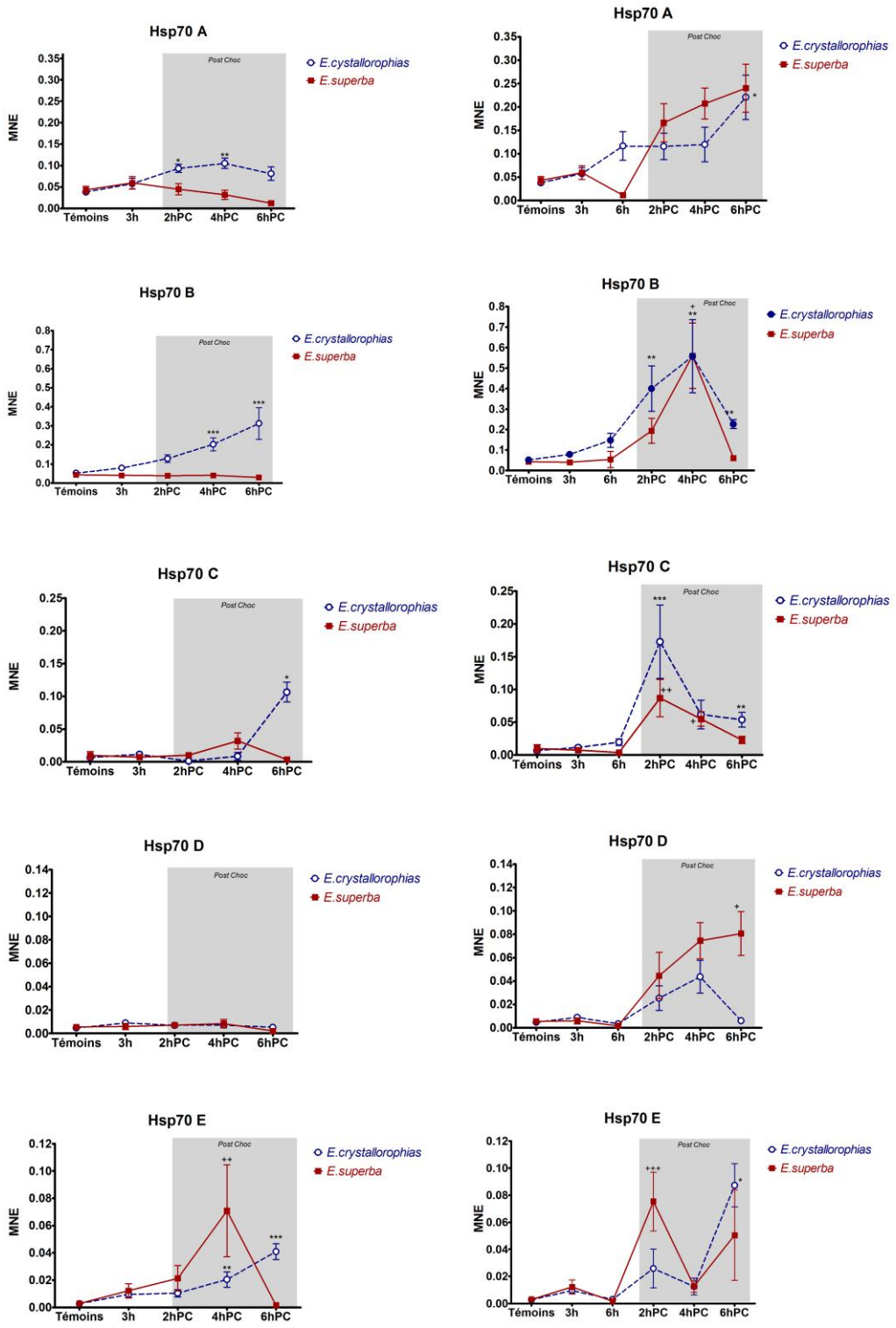

Figure 4-6 : Cinétique d'expression des isoformes d'Hsp70 chez *E. crystallorophias* (bleu) et E. superba (rouge) pendant un choc thermique de 3h et 6h à 3°C suivi d'une période de récupération de 6h à 0°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) et les croix (+) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn chez respectivement *E. crystallorophias* et *E. superba*.

Table 2 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc thermique à 3°C et le groupe contrôle. Le dégradé de orange est fonction de la valeur du ratio d'expression

3h - 3°C

E. crystallorophias	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	1,51	1,52	1,69	1,93	3,54
2hPC	2,45	3,36	-5,36	1,5	3,88
4hPC	2,76	5,34	1,27	1,52	7,61
6hPC	2,13	8,21	15,91	1,13	15,18

E. superba	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	1,38	-1,07	-1,35	1,08	4,14
2hPC	1,04	-1,13	1,05	1,29	7,25
4hPC	-1,36	-1,07	3,28	1,54	24,04
6hPC	-3,57	-1,49	-2,87	-2,66	-1,88

6h – 3°C

E. crystallorophias	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	1,51	1,52	1,69	1,93	3,54
6h	3,06	2,85	2,9	-1,39	1,13
2hPC	3,04	7,75	25,83	5,48	9,61
4hPC	3,15	10,82	9,2	9,45	4,45
6hPC	5,8	4,38	8,04	1,3	32,45

E. superba	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	1,38	-1,07	-1,35	1,08	4,14
6h	-3,76	1,26	-2,8	-3,28	-1,78
2hPC	3,86	4,55	8,92	8,16	25,56
4hPC	4,82	13,17	5,63	13,65	4,8
6hPC	5,58	1,42	2,36	14,76	17,13

4.3.1.1.1. Choc thermique de 3h à 3°C et post-chocs à 0°C (figure 4-6)

Dans un premier temps, le krill a subi un choc de 3h à 3°C suivi d'une récupération à 0°C de 6h. La première remarque est que les isoformes ont des profils d'expression qui ne sont pas semblables. L'isoforme A chez *E. superba* ne subit pas de variations d'expression lors du choc, car les niveaux varient peu entre les contrôles et le groupe 0h. Lors de la récupération à 0°C une tendance à la diminution apparaît par rapport au groupe contrôle. L'absence de

différences statistiques entre groupes montre la constance dans l'expression de cette isoforme. Dans le cas d'*E. crystallorophias*, la réponse lors du choc est similaire avec l'absence de variations entre les contrôles et le groupe 0h. Par contre, la réponse varie à partir de 2h de récupération, Il y a une légère induction de l'expression de l'ordre de deux fois l'expression contrôle. Bien que statistiquement significative cette induction est très faible.

L'isoforme B chez *E. superba* a une expression très stable au cours de l'expérience. Lors de la récupération, les valeurs d'expression restent très proches des contrôles. En revanche, chez *E. crystallorophias,* il a une augmentation de l'expression graduelle au cours du temps. Cette augmentation devient significative au bout de 4h de récupération avec une induction de l'ordre de 5 fois au bout de 4h et de 8 fois après 6h. Le comportement inductible de l'expression de l'*Hsp70 B* est inhabituel pour ce type d'isoforme, d'autant plus qu'elle est induite chez *E. crystallorophias* et pas chez *E. superba.* Malgré le fait que les deux espèces soient très proches phylogénétiquement, et les taux de conservations très élevés entre les deux orthologues, la régulation de l'expression des *Hsc70* n'est pas la même en fonction de l'espèce.

L'isoforme C chez *E. crystallorophias*, bien qu'à priori inductible, n'est pas plus surexprimée pendant le choc. Tout de suite après le choc, il n'y a pas de modification de l'expression. L'expression de l'*HspC* reste peu variable lors de la récupération à 0°C malgré une baisse de l'expression à 2h. C'est après 6h de récupération que l'isoforme est induite chez *E. crystallorophias*. L'isoforme est 15 fois plus exprimée que dans le groupe contrôle. Dans le cas d'*E. superba,* il n'y a pas de variation de l'expression. Une légère surexpression est à noter 4h après le choc avec un facteur 3, ce qui est néanmoins peu pour ce type d'*Hsp70.*

4.3.1.1.2. Choc thermique de 6h à 3°C et post-chocs à 0°C (figure 4-6)

La seconde moitié du stock expérimental de krill a été maintenu dans l'aquarium 3h supplémentaires et a donc subi un choc thermique de plus longue durée (6h). De manière générale les profils d'expression entre les espèces tendent à avoir les mêmes profils.

L'isoforme A chez *E. crystallorophias,* est surexprimée tout de suite après le choc de 6h. Puis lors de la récupération, le niveau d'expression reste stable (d'un fold de 3 à 6h, 2hPC, et 4hPC) et ré-augmente légèrement après 6h passées à 0°C. Dans le cas d'*E. superba*, l'expression chute à 6h de choc, mais par la suite elle remonte jusqu'à des valeurs proches de celles trouvées chez *E. crystallorophias*. Globalement la tendance de cette *Hsc* est à l'augmentation de l'expression lorsque la durée du choc thermique augmente.

Cette tendance à l'augmentation de l'expression lors de l'expérience se retrouve pour l'isoforme B où le pic d'expression est atteint après 4h de récupération. Le même niveau d'expression est atteint chez les 2 espèces et associé à un fold de 10 chez *E. crystallorophias* et 13 chez *E. superba*. Une fois de plus, on ne retrouve pas le caractère constitutif de cette isoforme chez les 2 espèces. De plus l'augmentation du temps de choc induit une réponse plus précoce lors de la récupération.

On retrouve ce même phénomène pour l'*Hsp70* C qui a un pic d'induction à 2h de récupération. Cette induction est plus forte chez *E. crystallorophias* avec un fold de 25 que chez *E. superba* qui a un fold de 8. Chez *E. crystallorophias*, après le pic d'induction, le niveau d'expression se stabilise à un fold de 8 alors que chez *E. superba* le niveau d'expression tend à retrouver une valeur basale.

Contrairement à l'expérience précédente où l'*Hsp70* mitochondriale restait à un niveau basal malgré le choc thermique, lorsque le temps de choc est augmenté, cette isoforme subit des variations notables de son expression. Apres 2h de récupération l'*HspD* est induite chez les 2 espèces et continue d'augmenter jusqu'à 4h. A 6h post choc, chez *E. crystallorophias*, l'expression retombe à une valeur basale alors que chez *E. superba* elle augmente jusqu'à être 15 fois plus exprimée.

Dans le cas de l'isoforme E, on observe un premier pic d'induction à 2h de récupération bien plus élevé chez *E. superba* que *E. crystallorophias*. Il est du même ordre que celui observé lors du choc de 3h suivi de 4h de récupération. On retrouve donc la même sensibilité de l'expression de l'isoforme E à 3°C mais avec un pic d'expression plus précoce dû à l'augmentation de la durée du choc. A 4h de récupération les expressions chutent à un niveau basal pour augmenter 2h plus tard. L'induction est plus forte chez *E. crystallorophias* et atteint un fold de 30, qui est le fold le plus élevé de cette expérience.

4.3.1.1.3. Observations Générales (3°C)

Les taux d'expression des témoins apparaissent cohérents et du même ordre pour les deux espèces, pour l'ensemble des isoformes étudiées et des expérimentations effectuées en milieu contrôlé (table 3). Cette observation tend à valider les valeurs mesurées pour les contrôles et par là-même les variations observées suite au choc thermique chez les deux espèces. De plus, les taux d'expression témoins sont différents selon les différentes isoformes et suggèrent que le niveau basal de l'expression dépend fortement de la fonction de l'isoforme considérée. Les

analyses moléculaires et phylogénétiques ont permis d'émettre des hypothèses sur le statut de ces différentes isoformes, soit Hsp70A et B voire E comme constitutives, Hsp70C comme inductible et enfin Hsp70D comme mitochondriale. Si l'on considère A et B comme constitutives, il est cohérent que leur expression soit supérieure à l'inductible, en l'occurrence la forme C, au moins chez les contrôles. La forme B est la plus abondante chez les témoins suivie de la forme A. Les formes E et D sont encore plus faiblement exprimées. Les taux relatifs d'expression mesurés entre les isoformes sont par ailleurs compatibles avec les valeurs d'expression relatives de chacune des isoformes obtenues par l'analyse du transcriptome d'*E. crystallorophias* (table 4), validant ainsi les patrons d'expression observés.

Table 3 : Valeurs d'expression relative (MNE) des différentes *Hsp70* des groupes témoins

MNE des controles	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
E. crystallorophias	3,80E-02	5,15E-02	6,69E-03	4,61E-03	2,69E-03
E. superba	4,30E-02	6,32E-02	9,73E-03	6,03E-03	2,95E-03

Table 4 : Valeurs d'expression des isoformes d'*Hsp70* de *E.crystallorophias* et résultats de blast associés. Comp ID : séquences assemblées avec Trinity. Size (aa) : taille séquences codantes déduites en acide aminé. Size (pb) : taille des séquences assemblées en nombre de paire de base. FPKM : « Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped ». Les valeurs de FPKM par isoforme sont notées en gras.

	Comp ID	Size (aa)	Size (pb)	FPKM	BLAST matches (E-value)
EucHsp70A		**668**	**2007**	**395.1**	Hsc70 *Mirocaris fortunata* (0.00) ABF85672
	comp586_c0_seq1	179	538	254.2	
	comp1674_c0_seq2	178	535	52.3	
	comp1806_c0_seq1	177	532	88.6	
EucHsp70B		**657**	**1971**	**404.6**	Hsc70 *Litopenaeus vannamei* (0.00) AAT46566
	comp208_c3_seq1	657	2281	404.6	
EucHsp70C		**634**	**1902**	**33.2**	Hsp70 *Metapenaeus japonicus* (0.00) BAJ78982
	comp2276_c0_seq1	634	2061	33.2	
EucHsp70D		**687**	**2061**	**16.2**	Hsp70 *Tribolium castaneum* (0.00) XM_970293
	comp3534_c0_seq1	687	2791	16.2	
EucHsp70E		**658**	**1974**	**22.5**	Hsp70 *Portunus trituberculatus* (0.00) ACZ02405
	comp17582_c0_seq1	152	1012	5.6	
	comp2807_c0_seq2	509	1653	16.9	

Au regard des cinétiques post-choc à 3°C, il apparaît que la constitutivité des isoformes A et B n'est pas si évidente. L'augmentation de leur niveau d'expression après un choc thermique indiquerait une activation de leur transcription sous l'effet de la température. Bien que le seuil reste, de manière générale, assez faible, certaines valeurs atteignent des surexpressions

de 10 fois le niveau basal. Or, dans le cas d'organismes antarctiques, ce niveau d'expression est considéré comme étant significatif. La forme C prédite comme une Hsp70 inductible à une expression basale 10 fois moins grande. Lors d'un choc de 3h son induction reste assez discrète, notamment chez *E. superba* où elle n'est pas induite. En revanche, lors d'une exposition plus prolongée à 3°C, elle est finalement induite après le choc. Une réponse similaire est observée pour la forme mitochondriale qui ne présente de variation d'expression, chez les deux espèces, qu'après un choc de 6h. Le manque d'information sur cette isoforme ne permet pas de spéculer sur son type de régulation. Cependant, sa faible induction pourrait indiquer que son expression est liée aux dommages cellulaires localisés dans la mitochondrie, ceux-ci arrivant plus tardivement après un choc. Finalement, la forme E est plus délicate à interpréter. Sa séquence indiquerait qu'il s'agit d'une constitutive, mais sa concentration relative basale est bien inférieure aux formes B et A, et se situe plus dans l'ordre de grandeur de l'isoforme C. De plus, elle est la plus réactive aux différents chocs thermiques, c'est à dire qu'elle est exprimée avant les autres au cours de l'expérience et surtout elle présente les niveaux de surexpression les plus élevés. Son profil d'expression indique que c'est la forme la plus inductible malgré son « étiquette ».

En bref, le passage brusque de 0 à 3°C ne semble pas provoquer de réaction immédiate notable au niveau de l'expression des Hsp70s chez *E. superba*, si ce n'est une tendance à la baisse à 6h. *E. crystallorophias* se démarque bien de son espèce sœur en terme de réponse à cette température mais après 6h pour les formes A, B et C. La forme mitochondriale présente le même profil pour les deux espèces ainsi que la forme E. Les réponses apparaissent principalement durant la période de récupération pour les deux espèces. Les profils sont alors comparables mais les folds restent modérés.

4.3.1.2. Choc thermique de 6°C

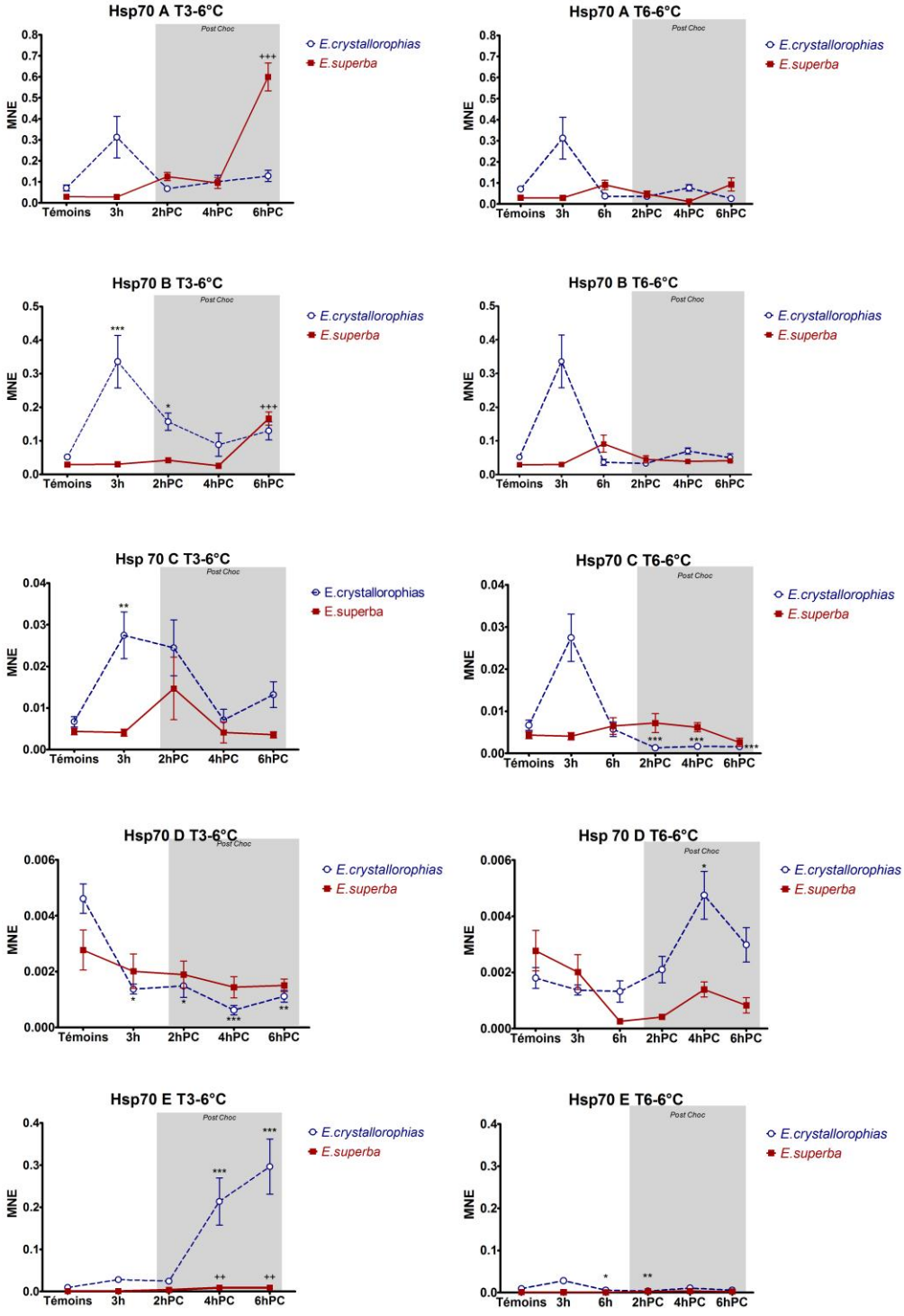

Figure 4-7 *:* Cinétique d'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. crystallorophias* (bleu) et *E. superba* (rouge) pendant un choc thermique de 3h et 6h à 6°C suivi d'une période de récupération de 6h à 0°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) et les croix (+) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn, chez respectivement *E. crystallorophias* et *E. superba.*

Table 5 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc thermique à 6°C et le groupe contrôle. L'intensité du dégradé orange est fonction de la valeur du ratio d'expression

3h - 6°C

E. crystallorophias	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	4,34	4,03	4,10	-3,36	2,97
2hPC	-1,07	1,88	3,66	-3,10	2,61
4hPC	1,20	1,06	1,06	-7,40	22,61
6hPC	1,77	1,55	1,97	-4,13	31,36

E. superba	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	-1,03	1,04	-1,07	-1,38	-1,08
2hPC	4,27	1,44	3,37	-1,47	3,86
4hPC	3,25	-1,14	1,00	-1,93	9,42
6hPC	20,55	5,74	-4,14	-1,84	10,30

6h - 6°C

E. crystallorophias	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	4,34	4,03	4,10	-3,36	2,97
6h	-1,97	-2,29	-1,16	-1,16	-1,62
2hPC	-2,03	-2,55	-5,05	1,37	-2,69
4hPC	1,06	-1,20	-4,00	3,09	1,12
6hPC	-2,81	-1,66	-4,19	1,94	-1,60

E. superba	Hsp70 A	Hsp70 B	Hsp70 C	Hsp70 D	Hsp70 E
3h	-1,03	1,04	-1,07	-1,38	-1,08
6h	3,09	3,15	1,49	-10,65	-1,48
2hPC	1,58	1,56	1,65	-6,66	3,05
4hPC	-2,70	1,21	1,43	-1,99	3,88
6hPC	3,17	-1,02	-1,67	-3,33	2,63

4.3.1.2.1. Choc thermique de 3h à 6°C et post-chocs à 0°C (figure 4-7)

Un choc thermique à 6°C a été mis en œuvre selon le même protocole, avec les mêmes durées de choc : 3h et 6h. Là encore, de manière générale, les mêmes niveaux d'expression sont observés pour les contrôles de toutes les isoformes *d'hsp70*. A cette température, l'isoforme A chez *E. crystallorophias* est surexprimée après 3h de choc, puis le niveau d'expression

retourne à un niveau basal et reste stable. La forme A de *E. superba* n'est pas surexprimée pendant le choc, mais après 2h et 4h de récupération son

niveau d'expression augmente. A 6h, cette surexpression est bien plus grande et atteint un fold de 20. L'*Hsp70* B de *E. crystallorophias* présente le même patron d'expression que la forme A. Elle est induite avec un fold de 4 après 3h de choc et retrouve un niveau basal au cours de la récupération. Cette similarité avec la forme A se retrouve chez *E. superba*, à la différence que le seuil d'expression est bien plus faible puisqu'à 6h de récupération, le fold est de 4. L'*Hsp70* C, est elle aussi induite après 3h de choc chez *E. crystallorophias*, avec la même intensité. Le niveau d'expression reste similaire après 2h de choc et revient à des valeurs basales pendant le reste de l'expérience. Pour *E. superba*, l'induction de cette forme est plus précoce que pour l'isoforme A et B et apparaît 2h après le choc thermique. Cependant cette induction reste faible pour ce type de forme. Elle est 4 fois plus exprimée ce qui la rend comparable avec la forme B.

L'*Hsp70* D chez les 2 espèces n'est pas surexprimée lors de cette expérience. Elle est exprimée à des valeurs assez constantes chez *E. superba*. En revanche chez *E. crystallorophias* elle est très significativement sous exprimée, avec un maximum de sous expression après 4h de récupération. L'isoforme E reste à un niveau constant au début de l'expérience, puis est surexprimée chez les 2 espèces. La différence entre les 2 espèces réside dans l'intensité de cette expression. Elle est bien plus forte chez *E. crystallorophias* que *E. superba*, et atteint le différentiel d'expression le plus fort. Comme dans l'expérience précédente cette isoforme est la plus réactive et elle est surexprimée à partir de 4h de récupération. Par contre dans ce cas, l'expression ne retombe pas, elle continue pendant encore 2h, alors que précédemment les surexpressions se faisaient par pic d'induction. Cette isoforme reste la plus réactive et, dans ce cas précis, il semblerait qu'elle soit plus sensible chez *E. crystallorophias* que chez *E. superba* à 6°C. Alors qu'à 3°C cette tendance semblait inversée avec *E. superba* qui exprimait l'isoforme plus tôt et avec une plus grande intensité.

4.3.1.2.2. Choc thermique de 6h à 6°C et post-chocs à 0°C (figure 4-7)

Lors d'un choc thermique de 6h à 6°C il y a une tendance globale à l'absence d'induction. La forme A chez les 2 espèces oscille autour des valeurs contrôles. La forme B est légèrement induite (fold = 3) à la fin du choc chez *E. superba*, mais globalement il n'y a pas de variation majeur de l'expression. Chez *E. superba* l'expression de l'isoforme C est assez constante

alors que chez *E. crystallorophias* elle chute après le choc et reste basse pendant toute la période de récupération. Même si cette sous-expression est relativement faible (-4), elle est néanmoins à prendre en considération puisqu'elle perdure. L'isoforme mitochondriale chez *E. crystallorophias* reste globalement constante. Il est à noter une légère induction 4h après le choc thermique. Chez *E. superba* l'expression de l'isoforme D chute drastiquement après 6h de choc, et elle est 10 fois moins exprimée. Lors de la récupération, l'expression a tendance à remonter mais reste néanmoins sous la valeur basale d'expression. La forme E habituellement la plus réactive avec des inductions très fortes est complètement inhibée chez les 2 espèces à l'issue d'un choc de 6h. Ici aussi l'expression oscille autour des valeurs contrôles.

4.3.1.2.3. Observations Générales (6°C).

A 6°C pendant un choc court (3h) les isoformes A, B, C sont induites à faible intensité au bout de 3h de choc chez *E. crystallorophias*. Si l'expression se manifeste plus tôt qu'à 3°C, le fold reste cependant du même ordre pendant le choc. L'isoforme D est sous exprimée tout au long de l'expérience. Et l'isoforme E est 30 fois plus exprimée. Chez *E. superba*, l'induction des formes A et B est beaucoup plus forte et arrive plus tardivement. La forme C a une très légère induction (2hPC). La forme D reste constante et la forme E est légèrement induite en fin de récupération. En somme, à cette température et pendant 3h, il y a des variations d'expressions.

A la même température mais en augmentant le temps de choc, il y a une perte totale d'induction. Les niveaux d'expression observés précédemment ne se retrouvent plus, même pour les formes qui ont été les plus exprimées. Cette intensité de choc thermique semble avoir un réel effet négatif sur la transcription des *Hsp70* en général. La diminution globale du nombre de transcrits dans ces conditions peut être due à la mise en place d'autres types de régulation n'impliquant pas les hsp70. Ou encore que les transcrits sont traduits massivement pour pallier aux dommages cellulaires éventuels, sans nouvelle transcription. Une autre hypothèse plus drastique expliquerait cette tendance par une dépression métabolique, qui désactiverait tous les processus cellulaires primordiaux amenant à la mort cellulaire, voire à la mort de l'individu à plus ou moins long terme. Cette hypothèse bien que possible car déjà observée chez d'autres organismes, impliquerait lors de cette expérience une mortalité élevée des individus, ce qui n'a pas été le cas sur le temps réduit de l'expérience, mais ne peut être exclu à plus long terme.

En bref, le choc à 6°C semble, au moins chez *E. crystallorophias*, provoquer une réponse, toujours limitée en intensité mais plus précoce qu'à 3°C. La réponse durant le choc est toujours aussi réduite chez *E. superba*, même si les formes A et B, voire C affichent un légère tendance à la hausse. Les inductions en phase de récupération sont plus limitées qu'3°C, tout particulièrement après 6h de choc où la chute est générale, exceptée la forme D. Il est évident là encore que les profils d'expression des deux espèces sont différents. La réactivité de *E. crystallorophias* aux chocs de température s'affiche clairement, à l'opposé de *E. superba*.

4.3.2. Cinétique d'expression chez *T. inermis*

Le krill *Thysanoessa inermis*, récolté dans le Kongsfjorden en région arctique a été soumis aux mêmes types de chocs thermiques, hormis la température, suivis de périodes de récupérations. Deux températures cible, de 6°C et 10°C, ont été choisies en fonction des températures auxquelles cette espèce peut être confrontée en raison des incursions de courants marins plus chauds venant de l'océan Atlantique Nord, mais aussi à partir des données de respirométrie établies par l'équipe du Pr F. Buchholz. Le krill est soumis à des chocs de 3h et 6h suivis d'une récupération de 6h dans une eau à 4°C. La température de 4°C est la température de l'eau dans laquelle *T. inermis* a été échantillonné au mois d'Aout 2012. Les températures choisies sont, en outre, comparables en différentiel avec les températures expérimentales appliquées sur le krill antarctique.

Lors de ce choc thermique le krill est échantillonné après 1h30 , 3h, 4h30 et 6h de choc puis toutes les 2 heures lors de la récupération (noté PC pour Post-Choc). L'expression de 5 isoformes d'*Hsp70* est suivie par PCR quantitative afin de mesurer la réponse à un possible stress cellulaire de *T. inermis* lors de ces augmentations de température.

4.3.2.1. Choc thermique de 6°C

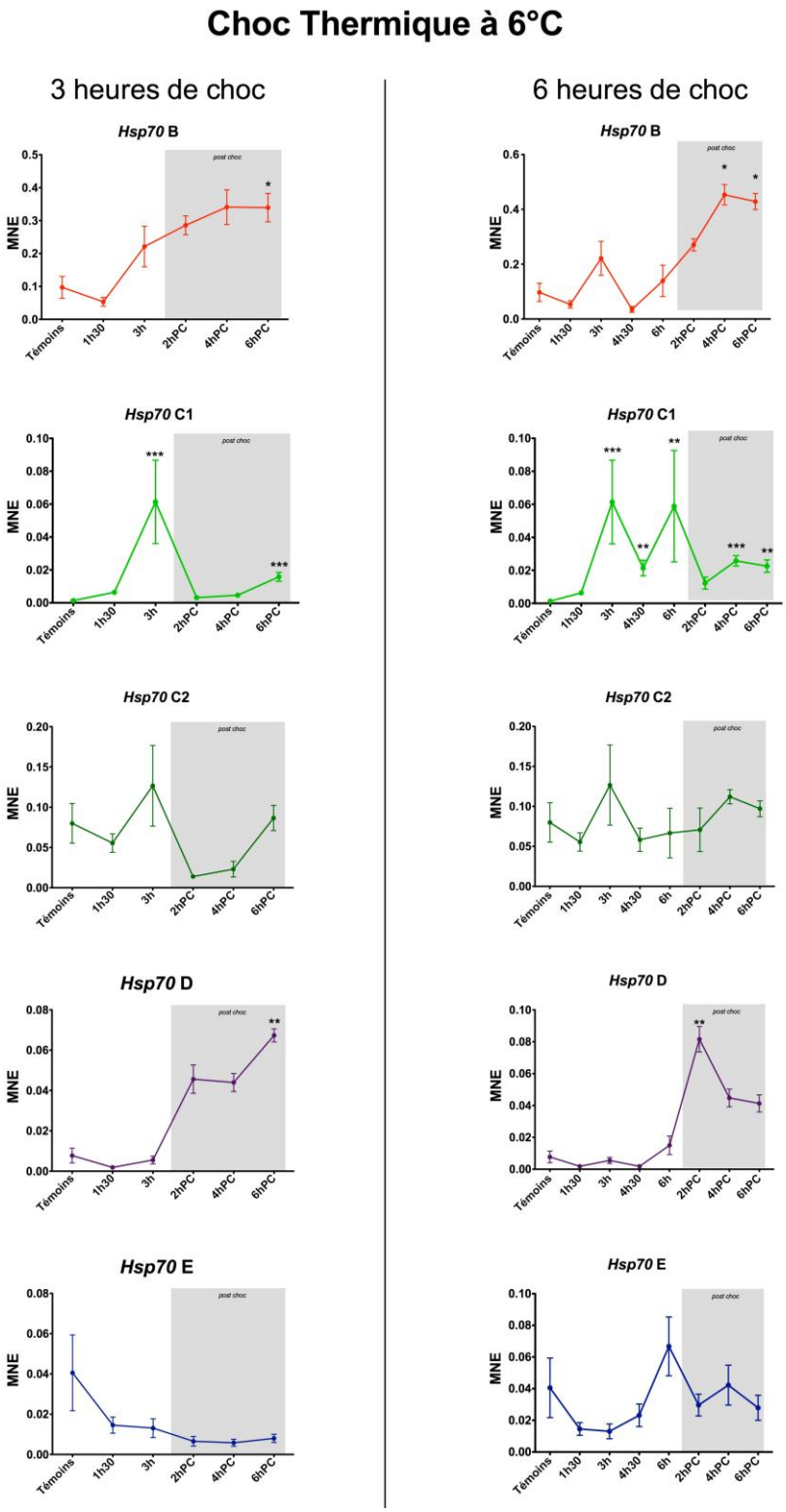

Figure 4-8 : Cinétique d'expression des isoformes d'Hsp70 chez *T. inermis* pendant un choc thermique de 3h et 6h à 6°C suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn.

Table 6 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc de 3h et 6h à 6°C thermique suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C et le groupe contrôle. Le dégradé de orange est fonction de la valeur du ratio d'expression

3h6°C	Hsp70 B	Hsp70 C1	Hsp70 C2	Hsp70 D	Hsp70 E
1h30	-1,83	4,77	-1,44	-4,14	-2,79
3h	2,28	45,98	1,58	-1,40	-3,10
2h PC	2,94	2,36	-5,76	5,89	-6,18
4h PC	3,51	3,44	-3,47	5,67	-6,98
6h PC	3,50	11,81	1,08	8,68	-5,08

6h 6°C	Hsp70 B	Hsp70 C1	Hsp70 C2	Hsp70 D	Hsp70 E
1h30	-1,83	4,77	-1,44	-4,14	-2,79
3h	2,28	45,98	1,58	-1,40	-3,10
4h30	-2,77	16,04	-1,37	-4,15	-1,75
6h	1,43	44,10	-1,20	1,94	1,65
2h PC	2,79	9,20	-1,13	10,52	-1,37
4h PC	4,67	19,30	1,40	5,78	1,04
6h PC	4,41	16,91	1,21	5,33	-1,45

4.3.2.1.1. Choc thermique de 3h à 6°C et post-chocs à 4°C (figure 4-8)

L'expression de l'isoforme B prédite comme une *Hsp70* constitutive lors de la caractérisation, ne subit pas de variation significative lors du choc thermique de 3h. Néanmoins, à ce temps de choc l'expression est 3 fois plus grande que chez les témoins et se maintient à un taux équivalent lors de la récupération. Apres 6h de récupération l'expression est significativement différente indiquant peu de variabilité de l'expression à ce stade et donc une réelle tendance à être régulé, montrant une activation et potentiellement une activation de la réponse HSP.

La forme C1 prédite comme inductible, subit les plus grandes variations. Au bout de 3h de choc son niveau d'expression est 45 fois plus grand que dans la condition contrôle, indiquant une induction accrue de l'expression de cette *Hsp70*. Lors de la récupération, le niveau d'expression retombe à une valeur contrôle montrant, ici aussi, une régulation de la transcription des *Hsp70* par pic d'induction. Ce résultat tend à confirmer la prédiction faite

sur la fonction de cette isoforme. En fin de récupération (6hPC), l'expression est 11 fois supérieure aux témoins montrant la persistance des mécanismes de réparation même après un retour à une température normale.

L'*Hsp70* C2, elle aussi prédite comme une forme inductible ne subit pas de variation lors du choc. Lors de la récupération cette isoforme est sous-exprimée (-5,76 à 2hPC) puis le niveau d'expression revient à une valeur basale. Dans cette condition il semblerait que la forme C2 ne soit pas induite bien que sa séquence la caractérise comme inductible.

L'*Hsp70* mitochondriale (D) est légèrement sous exprimée lors du choc thermique. En revanche le niveau d'expression augmente lors de la récupération à 4°C. Elle est 5 fois plus exprimée lors des 4 premières heures de récupération, et 8 fois (appuyé par les tests statistiques) plus exprimée au bout de 6h après le choc. Cette isoforme mitochondriale semble nettement induite lors de la récupération, indiquant la présence de dommages au niveau de la mitochondrie, et/ou un transport accru entre le cytosol et la mitochondrie.

Finalement, la forme E a une expression qui varie peu lors du choc thermique et diminue lors de la récupération. L'absence de significativité des tests statistiques montre une variabilité des données indiquant une absence de régulation de cette isoforme.

4.3.2.1.2. Choc thermique de 6h à 6°C et post-chocs à 4°C (figure 4-8)

Lors d'un choc de 6h à 6°C l'expression des isoformes reste globalement la même, hormis le fait que l'on observe une modification de l'intensité et un décalage dans le temps de la réponse *Hsp70*.

L'expression de l'isoforme B ne subit pas de variation significative lors du choc thermique, et lors de la récupération, elle est 4 fois plus exprimée que chez les témoins à partir de 4h post-choc, soit un niveau équivalent à celui atteint après 3h de choc. La valeur obtenue à 3h se démarque comme un léger pic d'induction avec une chute à 4h30 et une remontée à 6h maintenue en post choc.

L'isoforme inductible C1, présente un second pic d'induction à 6h de choc de même intensité que celui à 3h, à la différence qu'il y a une plus grande variabilité intra spécifique de la réponse Hsp70. Lors de la récupération, le niveau d'expression est maintenu à une valeur 19 et 16 fois supérieure au groupe témoins après 4h et 6h passées à 4°C. Ici, le niveau d'expression lors de la récupération est supérieur à l'expérience précédente indiquant qu'il existe une proportionnalité entre la durée du stress thermique infligé et la réponse Hsp70.

Dans le cas de l'isoforme inductible C2 on observe, comme précédemment, une absence de variation de l'expression et donc une absence de réponse à la température de 6°C. De plus les résultats de chaque groupe sont marqués par une grande variabilité.

L'*Hsp70* D ne varie pas pendant les 6h de choc thermique. En revanche, après 2h de récupération il y a une induction 10 fois supérieure aux témoins, ce qui est plus important que précédemment. Puis, le niveau d'expression retombe à un fold de 5 pendant le reste de la récupération. Ce choc de 6h a eu pour effet d'augmenter la transcription de cette isoforme et surtout de l'activer plus tôt lors de la récupération. Finalement, comme lors de l'expérience précédente l'expression de l'*Hsp70* E ne varie pas significativement au cours du temps, que cela soit pendant ou après le choc.

4.3.2.1.3. Observations générales (6°C)

Les cinétiques d'expression au cours du choc thermique mettent en évidence des différentiels nets entre les isoformes, laissant supposer là encore des fonctionnalités différentes. Elles présentent aussi l'avantage d'être mieux échantillonnées que pour les espèces d'Antarctiques avec des temps intermédiaires à 1h30 et 4h30. Cet étagement permet de détailler les cinétiques et de caractériser des pics transitoires ou des tendances qui auraient pu passer inaperçu avec des intervalles supérieurs.

Ainsi, la cinétique pendant le choc sur 6h montre, même si la significativité n'a pas été établie, une légère baisse à 1h30 suivie d'un pic et d'une nouvelle diminution de l'expression après laquelle une augmentation se dessine. Certes le fold est faible, mais il est de l'ordre de celui observé chez les autres formes constitutives des espèces d'Antarctique. De plus, cette succession d'augmentations et de baisses sont en adéquation avec ce qui est connu concernant les cinétiques d'expression des isoformes, notamment les interactions entre les constitutives et les inductibles. La diminution du stock d'ARN de la forme B, résultante d'une traduction active, semble précéder l'augmentation des formes inductibles C1 voire C2. En effet, le rôle des d'Hsp70 constitutives, est aussi de participer à l'activation de la transcription des Hsp70 inductibles.

Il est manifeste que les deux isoformes structuralement inductibles C1 et C2 ne présentent pas une réponse équivalente, en cinétique comme en amplitude. La présence d'une induction de la forme C1 nous confirme qu'il y a bien une réponse Hsp70 chez *T. inermis*, où la forme C2 ne semble pas être impliquée. Il est à ce propos surprenant que les témoins de la forme C2 soient

aussi élevés en taux d'expression de base. Ces valeur-témoins qui ont pourtant été vérifiées plusieurs fois en raison de leur importance, limitent clairement l'amplitude de la réponse attribuée à C2. La valeur à 3h est pourtant bien supérieure à celle observée pour C1 et la valeur à 1h30 correspond à la valeur d'expression maximale de C1. Cette réserve est d'autant plus à considérer que les valeurs des témoins obtenues dans l'expérimentation à 10°C (voir ci-après) sont du même niveau que les C1. Cette absence de réponse de la forme C2 serait donc à considérer avec prudence.

D'autre part, la confrontation des expressions en phase de récupération renforce également le différentiel observé au cours du choc entre les inductibles et les constitutives. Que ce soit après 3h ou 6h de choc, la forme B affiche une surexpression notable avec un fold de l'ordre de 3 à 4 mettant en évidence une activité accrue de cette forme dans les processus de réparation ou d'élimination après le choc.

Ce type de réponse est aussi observé pour la forme mitochondriale. L'isoforme D mitochondriale n'est pas impliquée de la même manière dans l'HSR, puisqu'elle participe à la ré-acquisition de la conformation spatiale des protéines lors de leur passage du cytosol à la mitochondrie. Cependant, sa surexpression pourrait indiquer l'accumulation de dommages mitochondriaux liés au stress oxydatif.

Puis, finalement la forme constitutive E ne réagit à aucun moment lors des deux expériences, poussant à nous interroger sur la perte ou la spécificité de fonction de cette dernière.

Deux types de réponses apparaissent clairement : des réponses qui pourraient être considérées comme immédiates et ayant lieu au cours du choc pour les formes dites inductibles et des réponses plutôt « à postériori » qui interviennent en post-choc, pour les constitutives.

4.3.2.2. Choc thermique de 10°C

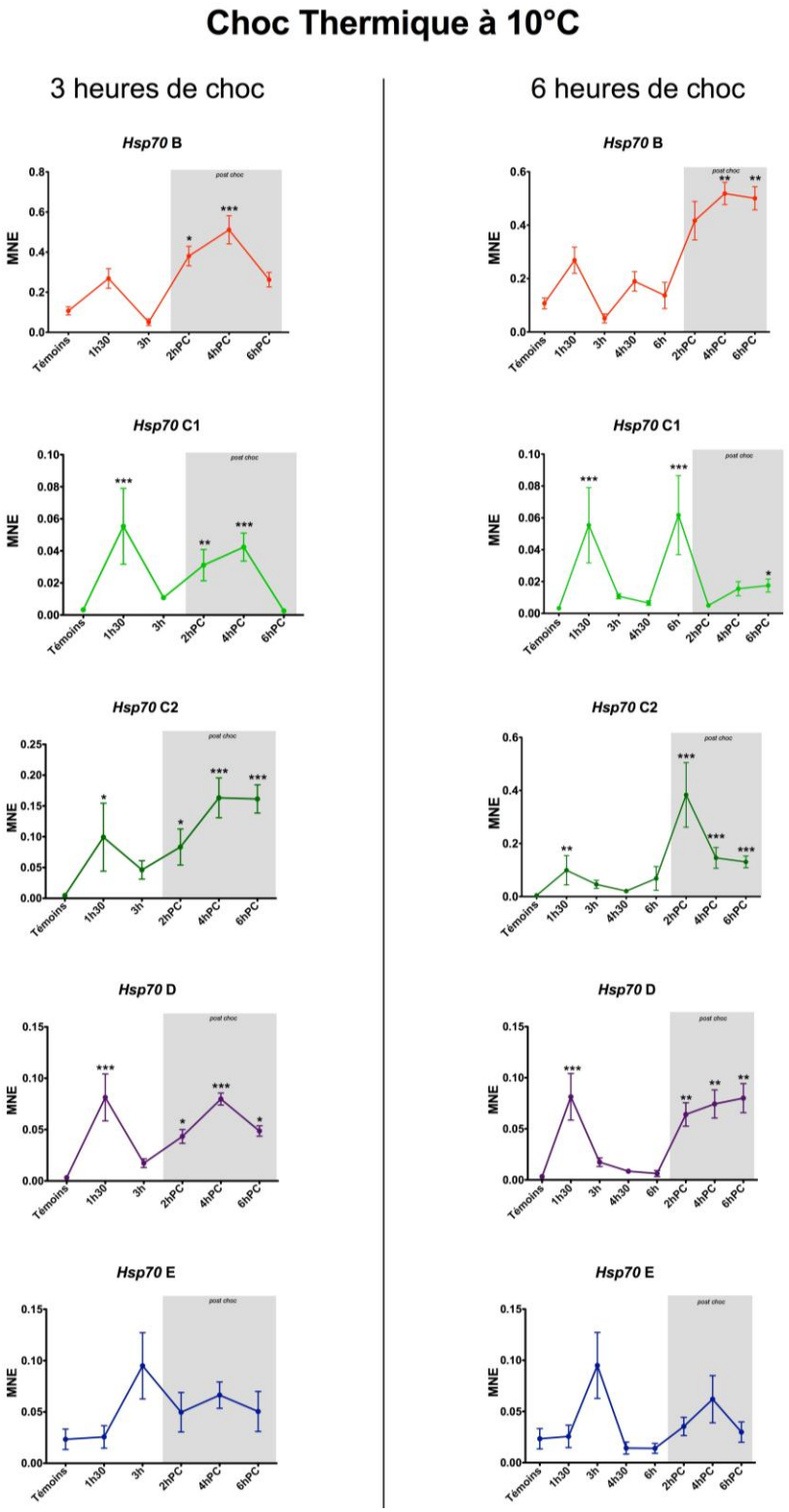

Figure 4-9 *:* Cinétique d'expression des isoformes d'Hsp70 chez *T. inermis* pendant un choc thermique de 3h et 6h à 10°C suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn.

Table 7 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc de 3h et 6h à 10°C thermique suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C et le groupe contrôle. Le dégradé de orange est fonction de la valeur du ratio d'expression

3h10°C	Hsp70 B	Hsp70 C1	Hsp70 C2	Hsp70 D	Hsp70 E
1h30	2,51	16,92	21,63	24,92	1,10
3h	-2,11	3,30	10,06	5,30	4,06
2h PC	3,55	9,50	18,15	13,27	2,13
4h PC	4,77	12,94	35,55	24,43	2,84
6h PC	2,45	-1,27	35,16	14,90	2,16

6h10°C	Hsp70 B	Hsp70 C1	Hsp70 C2	Hsp70 D	Hsp70 E
1h30	2,51	16,92	21,63	24,92	1,10
3h	-2,11	3,30	10,06	5,30	4,06
4h30	1,77	1,99	4,56	2,60	-1,64
6h	1,28	18,85	14,94	1,91	-1,67
2h PC	3,89	1,54	83,50	19,63	1,51
4h PC	4,84	4,74	31,78	22,76	2,65
6h PC	4,67	5,35	28,50	24,52	1,28

4.3.2.2.1. Choc thermique de 3h à 10°C et post-chocs à 4°C (figure 4-9)

L'expression de l'isoforme B présente un profil similaire à celui observé à 6°C. Il n'y a pas de variations majeures de l'expression lors du choc thermique, suivi d'une légère induction soutenue statistiquement lors de la récupération. L'induction reste du même ordre c'est à dire à un fold de 4-5.

Dans le cas de l'isoforme C1, il y a une induction rapide de celle-ci dès 1h30 de choc thermique à 10°C. Cette induction est plus faible (fold= 16,92) que celle observée à 6°C bien que la température soit plus élevée. Puis, lors de la récupération, la présence d'un deuxième pic d'induction plus faible (12,94) que le précédent à 4hPC est observée.

L'expression de la forme C2 se démarque des expériences précédentes. A 6°C, il n'y avait à priori aucune induction de cette isoforme, alors qu'à 10°C une induction est présente. Lors du

choc thermique, l'isoforme est 21 fois plus exprimée comparée au groupe contrôle dès 1h30 de choc. L'expression est maintenue à un fold de 10 au bout de 3h. Puis, lors de la récupération, le niveau d'expression ré-augmente et se maintient à partir de 4hPC à un niveau élevé (Fold = 35). Il s'avère donc d'après ce profil d'expression que l'*Hsp70* C2 soit bien une forme inductible comme ses caractéristiques structurales le laissaient supposer.

L'hsp70 D est, lors du choc thermique, fortement induite (comme les isoformes C1 et C2) dès 1h30 de choc avec un fold élevé de 24,92. Un deuxième pic d'induction est observé après 4h de récupération. De plus, en dehors des pics d'induction, le niveau d'expression de l'isoforme D reste à un niveau élevé (≈14). Ces valeurs d'expression restent plus fortes que celles observées lors des chocs à 6°C, indiquant que sur l'ensemble de cette expérience le niveau d'expression de l'*Hsp70* mitochondriale est significativement élevé, avec en plus des pics d'inductions. Il y aurait donc pour la forme D une corrélation entre la température de choc et l'intensité de l'expression.

L'expression de l'Hsp70 E ne varie pas lors de cette expérience. Une fois de plus son expression varie peu et atteint un maximum d'expression à 3h de choc, mais qui n'est significativement pas différent.

4.3.2.2.2. Choc thermique de 6h à 10°C et post-chocs à 4°C (figure 4-9)

L'allongement du temps de choc n'a pas d'incidence sur le profil d'expression de l'isoforme B. Elle varie peu lors du choc puis lors de la récupération l'expression est maintenue à un fold de 4.

L'*hsp70* C1 présente un deuxième pic d'induction après 6h de choc à 10°C de la même intensité que celui observé à 1h30. Le niveau d'expression retombe après 2h de récupération à un niveau basale. Ce niveau remonte légèrement lors de la suite de la période de récupération à 4°C, et se maintient autour d'un fold de 4-5.

La forme C2 présente elle aussi d'autres pics d'inductions. En plus de celui observé à 1h30 de choc, un deuxième pic lors du choc est présent, bien que plus faible (fold = 15), après 6h de choc. Après 2h de récupération, la plus importante surexpression d'une *Hsp70* sur l'ensemble de cette expérience est mesurée. L'Hsp70 C2 est 83 fois plus exprimée que dans le groupe contrôle. Après ce pic d'induction, l'expression ne retourne pas à un niveau basal, mais se maintient à un niveau élevé pendant le reste de la récupération autour d'un fold de 35. Lors de ce choc thermique et de la récupération à 4°C, l'*Hsp70* C2 qui n'était pas exprimée lors d'un

choc thermique à 6°C est clairement induite, et de manière élevée lors d'un choc à 10°C, confirmant le potentiel préférentiel thermique de l'expression de cette isoforme.

L'isoforme mitochondriale est exprimée dès 1h30 de choc thermique puis, le niveau d'expression retourne à un niveau basal. Le pic d'induction est élevé et atteint un fold de 25 ce qui, d'une part semble élevé pour ce type d'isoforme, et d'autre part différent du profil d'expression observé a 6°C où la surexpression de l'isoforme D ne se faisait qu'à partir de la récupération.

L'isoforme E conformément aux observations faites lors des autres expériences ne subit aucune variation. L'absence de régulation de la transcription sur cette isoforme permet de s'interroger à nouveau sur la perte d'activité de cette forme ou son caractère de constitutive vraie.

4.3.2.2.3. Observations générales (10°C)

La température de 10°C constitue un choc de plus grande amplitude que précédemment. Les réponses enregistrées au niveau des différentes isoformes illustrent l'importance de l'impact de cette augmentation au niveau des animaux.

Pour la forme B, le pic non significatif révélé à 6°C est toujours présent mais à 1h30, donc plus précocement. Il est intéressant de noter que le pic de C1 est lui aussi effectif plus tôt. L'intensité des différents pics reste cependant similaire, laissant supposer que si l'intensité du choc peut avoir une incidence sur le temps de réponse, elle est sans effet sur l'amplitude de celle-ci. Autrement, le profil général reste inchangé au cours du choc.

La forme C2 présente des variations de taux d'expression particulièrement importantes par rapport au taux des témoins. On retrouve comme pour C1 un pic à 1h30, en avance sur 6°C, et 6H de choc, absent à la température inférieure. Ceci dit, ces taux sont du même ordre en intensité que ceux observés à 6°C. La différence de niveau est directement liée au faible taux d'expression des témoins dans ce lot. Indépendamment de cette remarque, la forme C2 se démarque nettement de C1 par une surexpression post-choc particulièrement importante lui permettant d'atteindre des niveaux d'expression comparable à la forme B et des folds inégalés. D'autre part, ces taux sont bien plus importants que ceux enregistrés à 6°C. Ainsi la forme C2 se démarque clairement de la C1 avec notamment une expression plus marquée en phase de récupération.

L'expression de l'*Hsp70* mitochondriale est elle aussi différente à 10°C. Elle est exprimée lors du choc et lors de la récupération à 4°C. De plus, son expression est bien plus élevée qu'à 6°C. Cette proportionnalité entre l'amplitude thermique du choc et l'intensité transcriptionnelle de cette isoforme montre la présence d'une forte régulation du transport entre le cytoplasme et le cytosol dans la mitochondrie.

En résumé l'analyse des profils d'expressions des isoformes d'*Hsp70,* à la suite de chocs thermiques de 3h et 6h à 6°C et 10°C sur l'espèce *T. inermis,* montrent une réponse *Hsp70* traduisant un stress lié à la température. La quantité de transcrits des différentes isoformes d'Hsp70 varie au cours de l'expérience, pendant et après le choc. Chaque isoforme varie en fonction de son rôle et de l'intensité du choc thermique.
L'ensemble de ces résultats mettent bien en évidence une activation de l'expression de molécules de la famille des Hsp70, que ce soit lors d'un choc ou lors de périodes de récupérations, mettant en évidence un stress cellulaire et physiologique lié a la température chez les individus.

4.4. Discussion

La réponse HSP caractérise un état de stress à l'échelle cellulaire chez un organisme. Présent chez tous les phylum, elle est désormais utilisée comme bio-marqueur de stress (Colson-Proch *et al.,* 2010). Cependant, le décryptage de cette réponse n'est pas le même en fonction de l'espèce considérée et du stress appliqué. Il existe par exemple des organismes comme le poisson antarctique *Harpagifer antarcticus* (Clark & Peck, 2009), l'étoile de mer *Odonaster validus,* ou encore l'amphipode *Paraceradocus gibber* (Clark *et al.,* 2008a) qui ont perdu ces mécanismes au cours de l'évolution. Ainsi, l'absence de réponse HSP chez ce type d'organisme ne peut être considérée comme une absence de stress, mais plutôt comme une incapacité à pallier les détériorations causées par un facteur à l'origine de dénaturations, comme la température.
De plus, la quantification de la réponse HSP via l'analyse de la transcription des gènes codant pour les Hsp70 est elle aussi un paramètre à analyser avec précaution. L'environnement et l'histoire évolutive des organismes étudiés vont avoir une incidence directe sur le niveau d'activation de la transcription des *Hsp70.* On distingue ainsi les organismes vivant dans des milieux variables en terme de température tels que les milieux

pélagiques tempérés, hautement variables comme le milieu intertidal, et les milieux stables voire invariants, tels que les zones tropicales et polaires (Tomanek, 2010). La réponse HSP va varier en fonction de ce type d'environnement thermique : plus l'environnement est stable, plus la réponse HSP sera faible et provoquée par une température proche de l'optimum thermique des espèces étudiées. A contrario, plus l'environnement est variant plus la réponse HSP70 est intense et survient lorsque l'individu est soumis à une température plus éloignée de son optimum thermique. C'est dans ce cadre que la réponse HSP représente un mécanisme moléculaire crucial dans la capacité de thermotolérance d'un individu et contribue fortement à sa survie en cas de stress thermique. A cela s'ajoute l'histoire évolutive des organismes. Les animaux adaptés depuis plusieurs millions d'années à des conditions thermiques variables auront un mécanisme HSR sélectionné positivement et donc une réponse HSP très développée et sensible. A l'inverse, la réponse HSP des organismes vivant dans des milieux stables n'aura pas autant été sélectionnée, voire perdue.
Les deux espèces de krill *E. superba* et *E. crystallorophias* sont des organismes isolés dans un milieu froid et stable, en l'occurrence l'océan austral depuis 25 millions d'années (Jarman *et al.*, 2002), avec comme incidence possible une perte totale des mécanismes de réparation des dommages cellulaires causés par une augmentation de température, comme il a été observé chez certains organismes antarctiques. Cependant, il s'agit d'organismes respectivement, pélagique et épipélagique, amenés à rencontrer des couches d'eau variables avec comme possible conséquence la nécessité de conservation des cascades générant la HSR. A contrario, ce sont des organismes vagiles capables d'éviter ou de fuir activement une zone à risque. L'analyse de l'expression des différentes *Hsp70* démontre en première analyse que ces deux espèces ont conservé une réponse HSP, malgré leur isolement dans l'océan Austral.

Les réponses des deux espèces de krill antarctiques durant ces chocs thermiques apparaissent différentes que ce soit à 3 ou 6°C. Pour un choc à 3°C (figure 4-6), la tendance de l'expression chez *E. superba* serait à la diminution alors que celle de *E. crystallorophias* serait à l'inverse en augmentation. Des réponses qui sont donc antagonistes pour les formes A, B et C mais sont similaires pour les formes D et E. La différence est réellement significative, bien que modeste, après 6 heures de choc. La réponse de *E. crystallorophias* est donc réelle et est confortée par la cinétique d'expression à 6°C (figure 4-7). En effet, la réponse au choc dans ce cas apparait dès 3 heures soutenant l'existence d'une proportionnalité entre l'intensité du choc et la rapidité de la réponse. Il n'y a cependant pas de relation visible

entre l'intensité du choc et l'intensité de la réponse. Elle reste modeste, même si elle est légèrement supérieure à celle observée à 3°C. Le pic à 3h est suivi par un retour à une valeur inférieure à la valeur d'origine. Cette chute de l'expression pourrait être liée à l'effet feed-back des Hsp70 sur leur propre expression (DiDomenico *et al.*, 1982a) mettant aussi en évidence les capacités limitées de la réponse HSP chez cette espèce ou bien à un effondrement métabolique lié au couple température-temps de l'expérimentation. Cette cinétique est observable pour les 4 isoformes cytoplasmiques étudiées (A, B, C, E), qu'elles soient considérées sur la base de leur structure comme inductibles ou constitutives. Il n'y a en effet aucune différence de profil ni d'amplitude de la réponse entre ces 4 formes cytoplasmiques. Cette observation va à l'encontre du paradigme selon lequel les paralogues que sont les Hsc70s et Hsp70s seraient constitutives versus inductibles respectivement. S'il est clair à l'observation des taux d'expression que les fonctions et les niveaux d'action doivent être différents, les notions d'inductibilité et de constitutivité ne semblent pas avoir lieu d'être chez ces deux espèces. Les formes A et B qui typiquement appartiendraient aux Hsc70s comme l'attestent à la fois leur structure, leur position dans l'arbre mais aussi leur fort taux d'expression basal, présentent une surexpression manifeste chez *E. crystallorophias* et dans une moindre mesure chez *E. superba*. Les formes C qui présentent toutes les caractéristiques d'une Hsp70 inductible avec, outre la structure et la position phylogénétique, une faible expression basale, se comportent exactement comme les formes A et B, avec surtout des folds d'expression similaires et donc bien en deçà de ce qu'une Hsp70 est théoriquement susceptible de fournir.

Il est également manifeste que le taux basal des *Hsp70* C est inférieur à celui des *Hsp70* A et B. Ce résultat tend ainsi à démontrer que tous les organismes des milieux extrêmes ne généralisent pas la surexpression des formes dites inductibles en réponse à un potentiel stress permanent, dans la mesure où, évidemment, les formes A et B sont vraiment des constitutives et non des inductibles surexprimées. Quoiqu'il en soit, il n'en demeure pas moins vrai que l'inductibilité des formes constitutives représente une forme de réponse quantitativement intéressante dans la mesure où elle concerne les isoformes les plus exprimées originellement. Les valeurs de FPKM permettent d'établir un rapport de un à dix entre les formes C d'une part et A et B d'autre part, respectivement chez *E. crystallorophias* (Tableau 4). Une surexpression d'un facteur trois comme il est observé dans ces cinétiques d'expression pour l'ensemble de ces trois isoformes n'a pas la même conséquence en terme quantitatif, le rapport d'expression entre les différentes isoformes étant maintenu. De plus, si l'on prolonge

le raisonnement, il y a deux isoformes constitutives, proches structuralement, avec les mêmes réponses. Un facteur deux supplémentaire peut donc encore être considéré, en dehors de toute considération qualitative. Ce type de comportement des Hsc70 a déjà été mis en évidence chez notamment des poissons en réponse à des chocs thermiques ou en phase d'acclimatation (Deane & Woo, 2005). Même si chez *T. inermis*, seule l'isoforme B a été mise en évidence, son comportement reste très comparable à ceux des isoformes des espèces d'Antarctique. Là encore, la notion de constitutivité est mise à mal, plus particulièrement en post-choc. L'existence d'un taux basal important de ces isoformes constitue une assurance de capacité de réponse rapide à un stress en permettant une traduction immédiate d'une quantité élevée de protéines. La duplication de ces isoformes chez les *Euphausia* constituerait alors un plus non négligeable que ce soit en réponse à un choc chaud, ou un choc froid.

Si une corrélation entre l'amplitude du stress et le temps d'exposition peut être mise en évidence chez *E. crystallorophias*, il semble que ce soit également vrai chez *E. superba*, mais avec une sensibilité nettement moins importante. A 3°C, la tendance est plutôt à la baisse de manière généralisée. Cette diminution pourrait être liée à une dépression métabolique avec une diminution généralisée de toutes les fonctions, mais le profil obtenu à 6°C tend à infirmer cette hypothèse puisque la tendance est inverse, au moins pendant le choc lui-même. Une autre hypothèse est simplement que le passage à 3°C ne stresse absolument pas les animaux, au contraire, et est sanctionné par une baisse de l'expression des Hsp70. Cette observation pose alors chez cette espèce la question de l'existence d'un stress au froid à des températures inférieures ou égales à 0°C et d'un preferendum thermique plutôt aux environs de 3°C. De nombreuses populations localisées de manière moins septentrionale à l'ouest de l'Antarctique vivent d'ailleurs dans des eaux jusqu'à 5°C (Atkinson *et al.*, 2004b, 2009). D'un autre côté, la baisse de la quantité d'ARNm codant pour ces protéines peut être aussi liée à une traduction accrue qui n'atteint pas des niveaux d'alerte générant une réponse au niveau de la transcription, ce qui pourrait sous tendre une dénaturation limitée des protéines dans ces conditions mais aussi une notion de seuil.

L'étude des cinétiques post-choc tend à relativiser ces réflexions, en ce sens que l'ensemble des formes affiche des surexpressions dans ces conditions, en particulier après 6h à 3°C (figure 4-6). Manifestement, la réponse à court terme, soit en cours de choc, est très limitée chez ces deux espèces d'Antarctique et encore plus particulièrement chez *E. superba*, mais les processus de réparation ou de gestion d'un stress modéré sont toujours présents. La

comparaison avec l'espèce de krill pêchée en Arctique est à ce titre édifiante. Cette dernière présente une réponse plus complexe, en particulier durant le choc lui-même, avec une surexpression notable des isoformes C qui correspondrait à une cinétique d'animal de milieu variable. Cette réponse limitée ne serait donc pas une caractéristique des euphausiacés mais plutôt des espèces d'Antarctique.

Le choc thermique à 6°C (figure 4-7) démontre une réaction bien plus marquée qu'à 3°C chez les deux espèces d'Antarctique. L'augmentation de température provoque, à défaut d'une expression plus élevée, une augmentation de l'expression plus précoce. Une observation similaire est réalisée avec *T. inermis* entre 6 et 10°C. Par contre, la durée du choc se révèle être une composante particulièrement sélective chez les *Euphausia*. En effet, à 6h de choc, l'expression chute drastiquement chez *E. crystallorophias*, sans remontée en phase de récupération, voire une diminution par rapport aux témoins pour la forme C. Si l'on se réfère aux valeurs obtenues en post-choc 3°C (figure 4-6) où les deux espèces présentaient des surexpressions significatives, il serait incompréhensible que le choc à 6°C (figure 4-7) n'ait aucune conséquence au niveau de la cellule. Par conséquent, il est probable que ces absences d'expression sanctionnent un effondrement métabolique délimitant une température délétère pour ces animaux et nécessitant tout au moins un temps de récupération plus long pour permettre l'élaboration d'une nouvelle réponse HSP. À ce niveau, la différence entre notamment *E. superba* et *T. inermis* est particulièrement criante. Si les deux espèces possèdent des CT_{50} corrigées identiques, leurs HSR face à des hausses de température de même amplitude sont vraiment différentes, mettant en évidence des mécanismes de réponse à la hausse des températures antinomiques.

Dans ce cadre et pour tenter d'expliquer la faible réponse enregistrée au niveau des isoformes C, une étude d'évolution moléculaire réalisée en collaboration avec C Papot et D. Jollivet (Cascella et al., soumis) a permis de révéler que les Hsp70 appartenant à la lignée C considérée comme étant la forme cytosolique inductible présentaient une caractéristique particulière chez les 2 espèces de krill d'Antarctique. Cette lignée présente en effet un relâchement évident des pressions de sélection purifiante chez les 2 espèces de krill voire le remplacement privilégié de certains acides aminés par sélection positive. Deux hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer cette évolution récente de la lignée C chez le krill d'Antarctique eu égard aux autres lignées paralogues dont les structures et fonctions apparaissent fortement contraintes par la sélection (Papot et al., soumis). La première

hypothèse, relativement vraisemblable pourrait être une évolution dégénérative récente de l'isoforme vers ce qui n'est pas encore un pseudogène (i.e. fixation de mutations délétères) mais pourrait le devenir, l'existence d'isoformes inductibles n'étant plus nécessaire dans un environnement stable ou la température varie relativement peu autour de -1.5°C. Certaines espèces d'Antarctique ont en effet perdu la capacité d'exprimer les *Hsp70* face à un stress thermique (Hofmann *et al.*, 2000) même si cette perte d'induction est plutôt liée à la région promotrice du gène. Cette hypothèse semble néanmoins invalidée par le fait que la protéine est toujours fonctionnelle et que ce relâchement de la pression de sélection sur la lignée C prédaterait l'événement de spéciation ayant conduit à la formation des 2 espèces, il y a plusieurs millions d'années. L'apparition d'un pseudogène fait souvent suite à un événement de duplication. Il semble que ce ne soit pas le cas ici, car, même s'il peut être maintenu par conversion génique par le biais de mutations bénéfiques (Fawcett & Innan, 2011) le temps écoulé depuis la séparation des lignées A, B et C apparaît beaucoup trop long pour envisager cette hypothèse. La deuxième hypothèse envisagée pourrait dès lors être une évolution plus spécifique de l'isoforme inductible vers une isoforme constitutive ayant une efficacité plus grande de la molécule à basses températures, et notamment de permettre à cette isoforme de répondre à des stress thermiques plus froids amenant l'animal vers un état proche du point de congélation. Cette hypothèse est étayée par le fait que, chez les 2 espèces de krill, et notamment *E. crystallorophias*, la plupart des remplacements aminés sous sélection positive sont des remplacements d'acides aminés chargés vers des acides aminés polaires. De nombreuses études ont en effet montré que les espèces vivant dans des environnements froids présentent ce type de remplacements qui, en général, confèrent plus de flexibilité à la protéine et donc une efficacité catalytique plus grande à basses températures (D'Amico *et al.*, 2001; Siddiqui & Cavicchioli, 2006). Cette tendance apparaît plus marquée chez le krill des glaces (*E. crystallorophias*) et pourrait donc être reliée à son mode de vie dans les eaux côtières plus froides de l'Antarctique et son hivernage sous les glaces de mer (Pakhomov & Perissinotto, 1996).

Les formes D seraient des formes mitochondriales d'Hsp70 ou mtHsp70. Même si elles ont peu été étudiées chez les Invertébrés en dehors de *Caenorhabditis elegans,* leurs actions seraient multiples au niveau de la mitochondrie : elles se fixeraient sur les nouveaux polypeptides synthétisés dans le cytosol pour les aider à franchir la double membrane mitochondriale et leur assurer une conformation spatiale correcte, et participeraient à l'élimination des protéines dénaturées en les véhiculant vers les enzymes protéolytiques de la matrice mitochondriale (Blamowska *et al.*, 2012; Pellegrino *et al.*, 2013; Voos, 2013). Elle

serait localisée dans la matrice mitochondriale à proximité de la membrane là où ont lieu les translocations de protéines du cytosol à la mitochondrie (Neupert & Herrmann, 2007). Elle est aussi impliquée dans le repliement de précurseurs protéiques mitochondriaux et permet ainsi l'acquisition de leur structure tridimensionnelle finale (Kang *et al.*, 1990). Cette Hsp70 est donc un élément primordial au bon fonctionnement de la mitochondrie que cela soit lors d'un stress ou à l'état basal. Elle permet entre autre, en cas de stress, d'inhiber les signaux apoptotiques amenant à la perméabilisation des membranes mitochondriales (Manoli *et al.*, 2007), et d'empêcher les agrégations de mitochondries (Kawai *et al.*, 2001). Son rôle multiple, rend les interprétations de son expression difficiles. Cependant il est possible de mettre en relation l'expression de cette *Hsp70,* avec un stress mitochondrial. L'augmentation de son expression laisserait penser à une augmentation de la translocation et de la maturation des protéines dans la mitochondrie, montrant une activité mitochondriale accrue, indiquant l'accumulation de dommages et de ROS, révélant un stress (Manoli *et al.*, 2007).
Son action limitée à la mitochondrie pourrait expliquer son modeste taux d'expression, par rapport notamment aux isoformes A et B, même si elle n'en est pas moins fondamentale pour la survie de la cellule. Même si les valeurs sont faibles, la tendance apparait plutôt à la stabilité voire à la baisse au cours des expériences de chocs réalisées et en surexpression en phase de récupération, et ce manière assez comparable pour les trois espèces. Des études récentes réalisées sur des levures ont confirmé l'importance de la mtHsp70 dans la gestion des agrégations moléculaires préjudiciables au bon fonctionnement de la mitochondrie dans des conditions physiologiques normales. Cependant, cet effet protecteur serait diminué lors d'un choc thermique en raison de l'afflux de polypeptides agrégés généré par un choc thermique et/ou par une sensibilité propre à la mtHsp70 elle-même. Ce résultat sous tendrait que la mtHsp70, chez la levure, ne verrait pas son expression augmenter en réponse à un choc thermique ou de manière insuffisante pour pouvoir gérer efficacement les conséquences de ce choc sur les protéines mitochondriales.

Il y a lors des chocs thermiques sur les 3 espèces de krill, une grande différence entre les espèces antarctiques et *T. inermis*. L'*Hsp70* D mitochondriale de *E. crystallorophias* et *E. superba* est très peu surexprimée en comparaison avec celle de *T. inermis.* De plus, chez *T. inermis*, l'expression de cette forme dépend et de la température et de la durée du choc. Plus la durée et l'intensité du choc thermique sont grandes plus la forme D est exprimée. Ce profil d'expression indiquerait la présence d'une perturbation métabolique dans la mitochondrie pouvant être due à une augmentation de l'activité de la chaine respiratoire et de la production

de ROS. Cette hypothèse est soutenue par des mesures de respiration en fonction de la température faite sur cette espèce par Kim Hünerlage et Friedrich Buchholz (de l'institut Alfred Wegener)(fig.4-10). La figure montre l'augmentation de la respiration avec la température, celle ci augmente de manière exponentielle jusqu'à 12°C puis a tendance à diminuer. Cette rupture de la courbe montre que *T. inermis* arrive à un seuil de respiration à 12°C, et que cette température semble être un seuil critique de sa tolérance thermique. Or, les chocs thermiques effectués précédemment ont été choisis proches de ce seuil, et l'augmentation de la transcription de l'*Hsp70* mitochondriale, démontre bien qu'à 10°C *T. inermis* est impactée par la température et est proche de sa limite de thermotolérance.

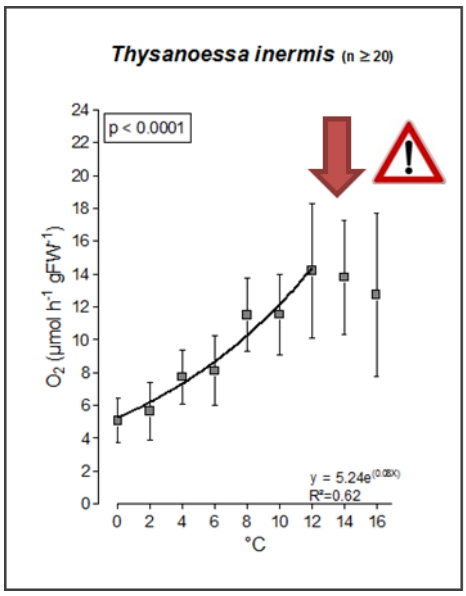

Figure 4-10 *:* graphique représentant la consommation en oxygène (µmol.h-^{1}.gMF^{-1}) de *T. inermis* à différentes températures (de 0°C a 16°C)

Structuralement, les formes E seraient constitutives et cytoplasmiques. La représentation de ces isoformes au sein de la population d'ARNm des deux espèces est faible, comme le démontre le faible FPKM dans le transcriptome de *E. crystallorophias* (Illumina), son absence dans le transcriptome de *E. superba* (454) et la difficulté de la caractériser par RT-PCR chez cette dernière espèce. Ces faibles quantités pourraient d'ailleurs expliquer la pauvre représentation de cette famille d'isoformes au sein des banques de données d'*Hsp70* disponibles sur les crustacés. Il est du même ordre que pour les formes D pourtant mitochondriales et donc confinées dans les limites des besoins de cet organelle. Les variations

observées au cours du choc sont faibles également, même si elles sont globalement du même ordre en amplitude que pour les autres isoformes. Une expression significative n'apparait qu'en phase de récupération. Le profil de *T. inermis* est là encore différent avec une réponse pendant le choc, particulièrement à 10°C (figure 4-9).
Il est clair que cette isoforme se démarque nettement des autres isoformes cytoplasmiques et ne remplit pas les mêmes fonctions. Au delà de ces remarques, il est difficile de s'aventurer plus loin sans risquer de se perdre dans les spéculations peu étayées. Il n'en demeure pas moins que cette simple diversité souligne davantage, s'il en était besoin, l'importance de considérer les différentes isoformes les unes par rapport aux autres et d'éviter la globalisation des interprétations fonctionnelles basées sur l'étude d'une seule isoforme ou d'un mélange (Morris *et al.*, 2013).

Un certain nombre de critères doivent, en principe, déterminer la capacité de réponse à un choc thermique chez les différentes espèces : i) le nombre et l'efficacité des HSP elles-mêmes, ii) la température d'activation de l'expression des Hsp, iii) le niveau d'expression des différentes isoformes que ce soit au niveau basal ou induit.

En ce qui concerne le premier critère, *T. inermis* ne possède que la forme B contre A et B pour *E. superba*, mais possède deux formes réellement inductibles C1 et 2 contre une seule forme C potentiellement en perte de fonction pour l'espèce d'Antarctique. Pourtant, la capacité de résistance à la hausse de température est indéniable pour *E. superba*.

La température d'activation de l'expression des différentes *Hsp70* est également discriminante pour les différentes espèces. *T. inermis* présente une réponse rapide et intense notamment des formes dites inductibles. Les deux espèces d'Antarctique sont peu réactives à ce niveau. Paradoxalement, *E. crystallorophias*, l'espèce la plus sensible au choc thermique en se référant à la CT_{50} est celle qui répond le plus, même si ces réponses sont limitées en intensité. Il est classique de considérer que plus une espèce est sensible à un stress thermique, plus sa surexpression sera importante en réponse à ce stress. De la même manière, Sorensen et al. (1999 et 2001) ont montré que des lignées de drosophiles sélectionnées comme résistantes aux hautes températures avaient des taux d'expression des Hsp moindres en intensité en réponse à un choc. Ces résultats suggèrent donc que les lignées adaptées à des hautes températures subissent moins de dommages cellulaires et donc génèrent une réponse amoindrie. Cette hypothèse semble recevable lorsque l'on confronte les deux espèces d'Antarctique avec une sensibilité plus importante de *E. crystallorophias* en terme

d’expression soutenue par une CT_{50} inférieure. Mais elle perd tout substance lorsque les espèces boréales et australes sont comparées puisque le niveau d’expression est particulièrement élevé pour *T. inermis* et particulièrement modéré pour les espèces d’Antarctique pour un résultat similaire en terme de tolérance thermique. D’autre part, on assiste une absence de réponse assimilable à un effondrement métabolique à 6°C pour les deux espèces. Il semble clair que des stratégies différentes ont été mises en place chez ces deux groupes d’organismes pourtant proches phylogénétiquement.

L’absence de réponse de *E. superba* est donc surprenante. Il ne s’agit pas d’une espèce adaptée aux hautes températures, justifiant ainsi d’une réponse tardive en terme d’expression. Cependant, afin de mieux cerner les limites thermiques de l’animal des expériences complémentaires ont été menées : sur du court terme, du long terme et enfin des températures plus importantes.

5. Cinétique d'expression des Hsp70 en réponse a divers chocs thermiques chez *Euphausia superba*

5.1. Introduction

Le krill Antarctique est l'espèce la plus abondante en Antarctique. D'une importance majeure écologiquement comme économiquement, elle constitue un maillon clé dans les chaines trophiques Antarctiques. Elle constitue le lien entre la production primaire et les consommateurs secondaires, et permet de nourrir l'ensemble des prédateurs de la région, des poissons aux grands mammifères tels que les baleines, en passant par les manchots. D'un point de vu économique, le krill Antarctique, est une espèce pouvant atteindre jusqu'à 6cm, et très riche en protéines et en lipides. Ses caractéristiques font d'elle une prise de choix pour l'industrie de la pêche, et elle constitue la matière première de la production de cosmétiques et de farines animales. De plus, son abondance fait de cette espèce une des dernières grandes ressources marines disponible pour la pêche industrielle. *E. superba* est une espèce considérée comme sténotherme car isolée dans l'océan Austral depuis 25 millions d'années (Patarnello *et al.*, 1996b). Cet environnement froid et peu variable est propice à la perte de la capacité de résistance à une augmentation de température (Clarke, 1983) via la disparition des mécanismes impliqués dans la réponse aux chocs chauds et dans la thermotolérance. Dans le contexte de réchauffement global, plus accentué aux pôles, cette espèce clé est donc un organisme modèle particulièrement pertinent. C'est pourquoi un plus grand effort d'investigation a été fait sur *E. superba*. Il est également important de souligner, notamment pour les expérimentations sur de longues durées, que sans une infrastructure adéquate telle que celle de l'AAD à Kingston (Tasmanie), elles n'auraient pu être mises en œuvre. Au sein de ce laboratoire, *E. superba* est élevée dans les meilleures conditions possibles et constitue le modèle principal. *E. crystallorophias* etant plus rare et difficile à pécher, il n'a pas été possible de réaliser les expériences de manière équivalente sur les deux espèces. Ces expériences focalisées sur *E. superba*, sont regroupées dans ce quatrième chapitre.

Au terme des expériences présentées précédemment, les résultats, apparaissent en contradiction. D'une part, les valeurs de CT_{50} placent *E. superba* comme une des espèces les plus thermo-tolérante d'Antarctique, d'autre part la réponse HSP après un choc à 3°C et 6°C est absente lors du choc et modérée lors de la récupération suivant ce choc. Il semblerait même qu'il y ait une chute métabolique après 6h à 6°C. Le paradoxe est d'autant plus

frappant que l'espèce d'euphausiacé pêchée en Arctique et possédant des capacités de tolérance thermique voisines en terme de CT_{50} présente quant à elle des réponses particulièrement franches en terme de surexpression des isoformes d'*Hsp70*.
La première question qui se pose est donc de savoir si effectivement il n'existe aucune réponse où si cette réponse n'a pu être observée car : i) les échantillonnages à 3h étaient trop longs et une possible réponse aurait pu être détectée avant, comme c'est le cas pour *T. inermis*, ii) les températures choisies pour les chocs sont trop faibles et ne constituent en aucune manière un stress pour l'animal, iii) les chocs appliqués étaient trop courts.

Pour répondre à ces interrogations et ainsi mieux cerner la limite inférieure de réactivité d'*E. superba* via la réponse HSP, des expériences complémentaires comprenant, des chocs thermiques de courte durée aux mêmes températures que précédemment soit 3°C et 6°C ont été entreprises. Des chocs plus forts en intensité : à 9°, 12° et 15°C ont été mis en œuvre afin de déterminer s'il existe vraiment une HSR invisible aux faibles températures appliquées jusqu'à présent.
Enfin, un passage et un maintien à une température de 3°C pendant 6 semaines devaient permettre de mesurer l'impact à long terme d'une hausse de température sur la réponse Hsp70 et de répondre à la dernière question posée.

5.2.Matériels et méthodes

L'ensemble des expérimentations exposées dans ce chapitre a été réalisé en Tasmanie au laboratoire de l'Australian Antarctic Division au sein de l'équipe dirigée par le Dr So Kawaguchi et avec l'aide technique de Rob King. Les animaux sont maintenus en stabulation après la pêche au cours des campagnes d'été du navire australien Aurora Australis dans des aquariums dont l'eau est maintenue à 0°C (Kawaguchi *et al.*, 2010)
Pour les chocs à long terme, mais aussi à court terme et afin de conserver une homogénéité entre les différentes expérimentations mises en œuvre précédemment sur le navire l'Astrolabe, entre 0 et 3 heures, les animaux sont directement transférés du bac d'élevage à 0°C vers le bac expérimental dont la température a été préalablement stabilisée en accord avec le protocole.
Chaque point est sanctionné par le prélèvement de 10 animaux qui sont immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les protocoles d'extraction et d'analyse de l'expression des Hsp70 sont strictement identiques à ceux énoncés et utilisés précédemment.

5.3. Résultats

5.3.1. Chocs courts de 1h et 2h à 3°C et 6°C

Lors des chocs thermiques effectués précédemment à 3°C et 6°C sur *E. superba*, de faibles variations des concentrations relatives ont été observées. En parallèle, l'induction de certaines *Hsp70* a été observée après ces chocs lors d'une récupération à 0°C, laissant supposer que des lésions au niveau cellulaire avaient eu lieu et qu'elles engendraient une réponse. L'absence de grandes variations au cours des chocs lors des expériences précédentes nous incite à envisager une potentielle réponse à très court terme et donc à étudier la réponse précoce des mécanismes cellulaires de réparation. Le « système Hsp70 » est connu pour être très réactif. Il est donc possible que l'analyse de l'expression de ces gènes n'ait pas été faite dans la bonne fenêtre temporelle. C'est pourquoi les chocs thermiques effectués ici sont de même intensité (3°C et 6°C) et suivis d'une analyse de l'expression des gènes *hsp70* au bout de 1h et 2h d'exposition à la température.

5.3.1.1. Choc court 3°C (figure 5-1)

L'*Hsp70* A subit une diminution de son expression au bout d'une heure de choc, puis, 1h plus tard, revient à une valeur basale. Cette sous expression d'un facteur 2, ce qui reste proche des sous expressions déjà observées dans d'autres conditions.

Pour l'isoforme B, c'est une diminution constante au cours du temps qui est observée. Soutenue statistiquement, cette diminution atteint un fold de -6 au bout de 2h, ce qui pour cette isoforme est une forte valeur de sous expression. L'isoforme C a une expression constante pendant la première heure, et son niveau d'expression chute au bout de 2h de choc. Cette sous expression est de -3, ce n'est certes pas la plus grande valeur de sous expression, elle reste néanmoins assez prononcée.

L'isoforme mitochondriale est sous exprimée après 1h à 3°C (fold -6) puis la concentration relative de transcrit augmente drastiquement jusqu'à 6 fois la valeur basale. Finalement la forme E est la seule à ne pas diminuer au cours du temps. Elle est constante jusqu'à une heure, puis à 2h de choc elle est induite avec un fold de 7.

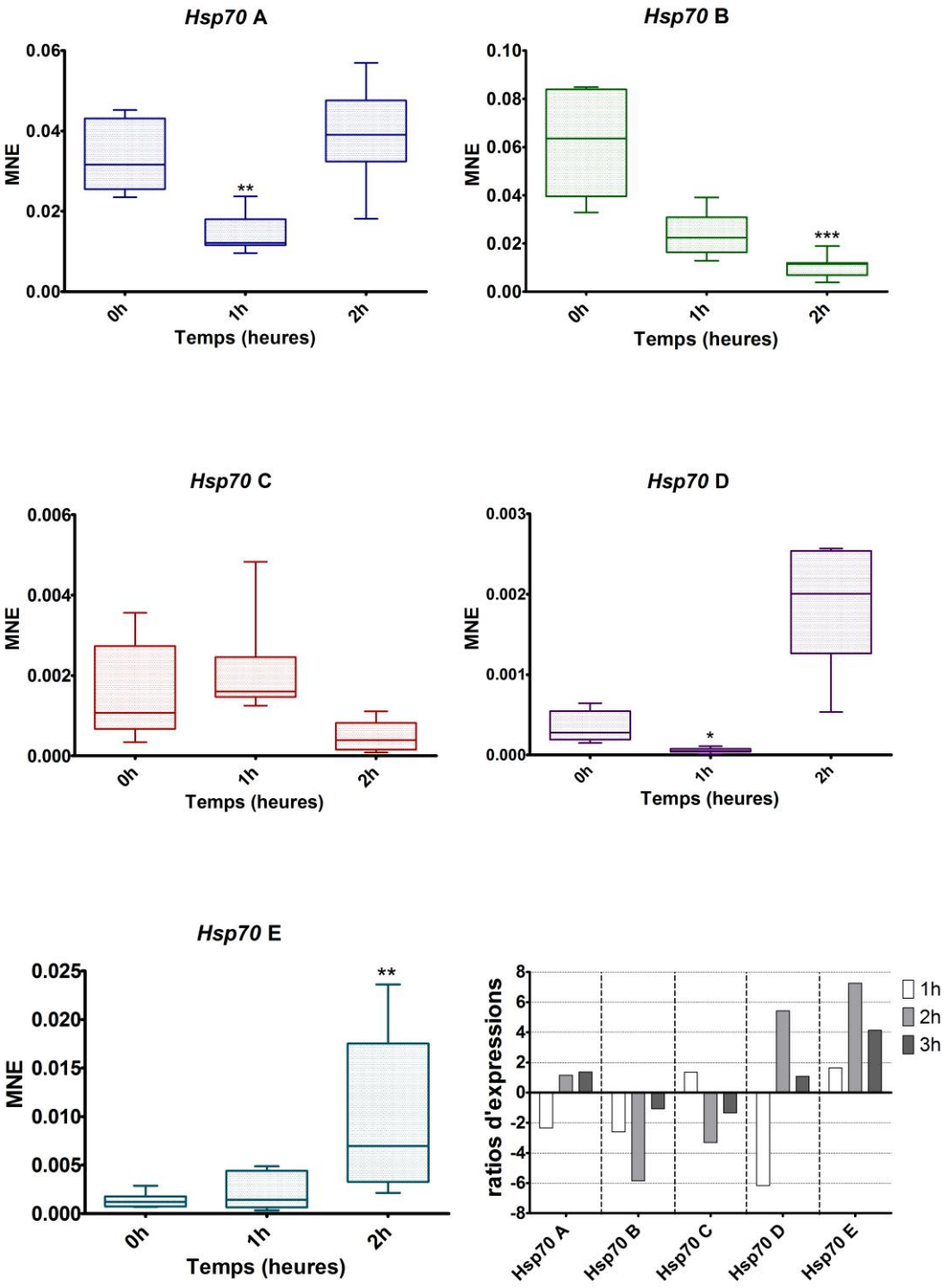

Figure 5-1 : Cinétique de l'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. superba* pendant un choc thermique de 1h et 2h à 3°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post-hoc de Dunn. La figure de ratio d'expression (calculés par rapport au groupe contrôle de chaque expérience) compile les résultats obtenus lors de cette expérience et celle d'un choc de 3h a 3°C (*cf* Partie 4)

5.3.1.2. Choc court 6°C (figure 5-2)

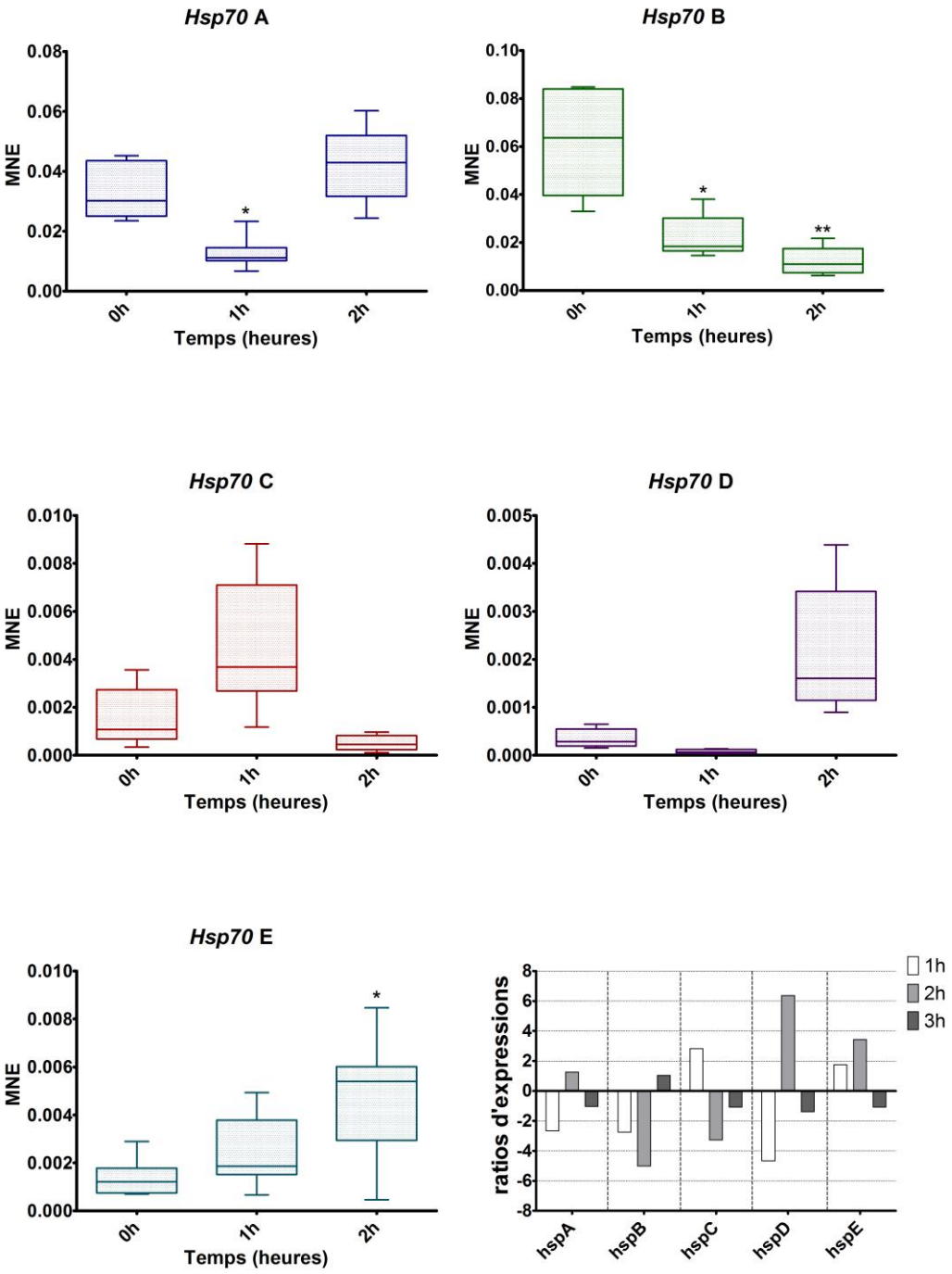

Figure 5-2 : Cinétiques de l'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. superba* pendant un choc thermique de 1h et 2h à 6°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post-hoc de Dunn. La figure de ratio d'expression (calculés par rapport au groupe contrôle de chaque expérience) compile les résultats obtenus lors de cette expérience et celle d'un choc de 3h a 6°C (cf Parti 4)

A 6°C, les tendances d'expressions des différentes formes d'hsp70 sont exactement les mêmes que précédemment. On notera que la seule différence réside dans l'intensité des variations. L'isoforme C est un peu plus induite après 1h à 6°C, alors que l'isoforme E l'est moins à 6°C qu'à 3°C au bout de 2h de choc thermique. Ces seules variations ne permettent pas d'établir sans équivoque une relation entre intensité d'expression et intensité du choc thermique.

5.3.1.3. Observations générales.

Hormis la forme E, toutes les isoformes ont une tendance à la diminution lors des premières heures de choc. Les expériences précédentes de choc aux mêmes températures montrent qu'au bout de 3h et 6h le niveau d'expression des isoformes est au même niveau que ceux des contrôles. Cette diminution transitoire, souvent suivie d'un retour à des valeurs basales voire des surexpressions, pourrait être expliquée par le recrutement des transcrits pour la traduction des protéines d'Hsp70. La concentration des Hsp70 régulant la transcription, le retour des transcrits à un niveau basal pourrait être expliqué par un rétrocontrôle provoqué par la diminution du pool d'ARNm. Quoiqu'il en soit, il apparait clairement qu'il n'y a pas de réponse marquée par une surexpression entre 0 et 3h comme il a pu être observé chez *T. inermis*. L'hypothèse selon laquelle l'absence de surexpression observée au court des premières expériences de chocs était liée au fait que les écarts temporels entre les mesures étaient trop importants est donc infirmée.

5.3.2. Choc thermique pendant 3h à 9°C et 12°C (figure 5-3)

Le choc présenté a été effectué pendant 3h à 9°C, 12°C, et 15°C. Lors de ce type d'expérience le krill a été plongé directement (comme dans les autres expériences) dans les aquariums à la température test, afin de conserver une cohérence avec les autres expérimentations. A 9°C aucune mortalité n'a été déplorée, alors qu'à 12°C, 60% des individus sont morts au bout de 3h. Enfin, à 15°C, aucun des individus n'a survécu 3h. Malgré la forte mortalité à 12°C et la faiblesse manifeste des animaux, les individus ayant survécu ont tout de même été analysés (n=4).

La concentration relative des isoformes des témoins est comparable et du même ordre (sauf pour l'*Hsp70* D, 10 fois plus faible ici) que les concentrations relatives observées au cours des autres expériences de choc thermique et donc issues d'autres populations.

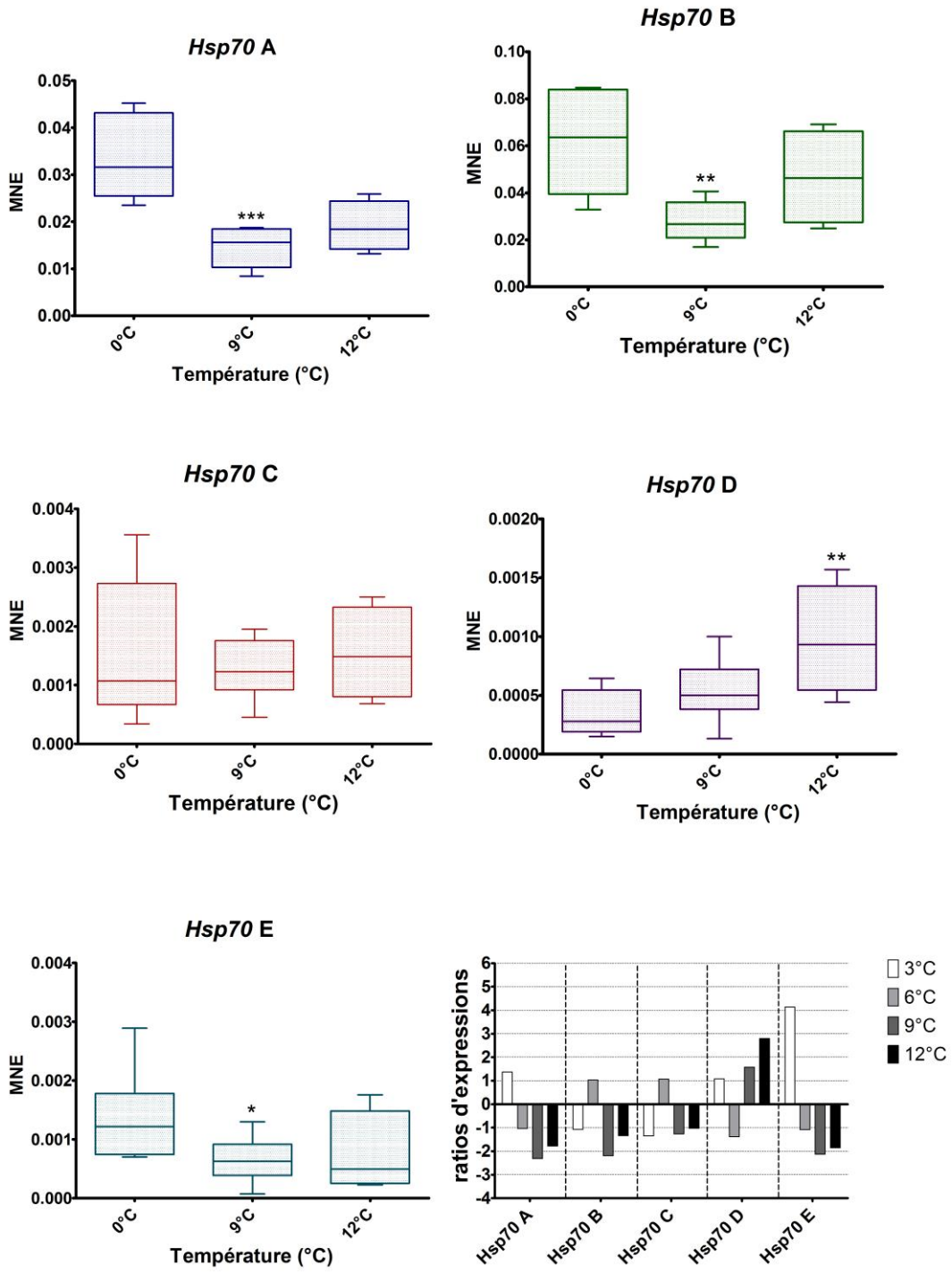

Figure 5-3 : Cinétique d'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. superba* pendant un choc thermique de 3h à 9°C et 12°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post-hoc de Tukey. La figure de ratio d'expression (calculés par rapport au groupe contrôle de chaque expérience) compile les résultats obtenus lors de cette expérience et celle d'un choc de 3h à 3°C et 6°C (*cf* Partie 4)

Au bout de 3h de choc à haute température, la quantité relative de transcrit n'a pas augmenté. C'est plutôt une tendance à la diminution des ARNm des *hsp70* qui est observable.
L'expression de l'*Hsp70 A* après 3h à 9°C diminue par rapport au groupe témoin. Elle est 2 fois moins grande. Un niveau presque équivalent est retrouvé à 12°C. On retrouve cette même tendance pour la forme B. La forme C inductible est dans le cas présent très stable, quelle que soit la condition. Ainsi, aucune différence n'est à signaler à 9°C et à 12°C.
La forme mitochondriale est la seule lors de cette expérience à avoir une faible augmentation de sa concentration. Cette augmentation, de presque 3 fois le niveau contrôle, est significative à 12°C, qui est une température létale. L'augmentation de la quantité d'*Hsp70* dans la mitochondrie peut être l'indicateur d'un stress oxydatif, pour lequel un effort de synthèse de l'Hsp70 serait nécessaire.
L'isoforme E a un profil d'expression similaire aux formes A et B, c'est à dire une diminution de 2 fois l'expression contrôle à 9°C et 12°C.
Dans le cas des isoformes A, B et E, les sous-expressions restent relativement faibles et ne dépassent pas -2. Leur caractère constitutif originel peut expliquer la présence de faibles variations « négatives ».

Cette expérience de choc thermique a été réalisée à 3 hautes températures différentes et improbables dans le milieu afin de sonder l'existence d'une capacité de réponse HSP. En effet, la réponse HSP n'est pas systématique chez les organismes antarctiques. Les données collectées précédemment sur *E. superba* montrent que cette espèce est particulièrement résistante à de faibles comme de grandes augmentations de température avec des CT_{50} mesurées entre 14 et 16°C en fonction de l'incrémentation. Il est d'ailleurs intéressant de noter l'importance évidente sur les taux de survie de la progressivité de l'augmentation de la température. Les animaux utilisés ont la même origine, même s'il ne s'agit pas des mêmes populations, c'est à dire qu'ils ont été conservés pendant des mois dans les aquariums de l'AAD à Kingston où ont été réalisées les expériences Mais manifestement la montée progressive de la température à 12-15°C des CT_{50} apparait largement plus supportable pour les animaux que la plongée directe à 12 ou 15°C qui se révèle rapidement létale. Quoiqu'il en soit, il semble que l'intensité du choc sur 3h ne provoque aucune réponse via la surexpression des *Hsp70* comme on aurait pu le supposer. Mis à part une baisse du stock des ARNm qui doit être liée à la traduction pour les isoformes A, B et E et une légère augmentation de l'expression de la forme D, il ne se passe rien de comparable aux réponses enregistrées pour

d'autres organismes polaires vers 15°C (Clark & Peck, 2009). Il apparait manifeste que le krill *E. superba* ne possède pas de capacité de réponse via les Hsp70 comparable à celle mise en œuvre chez le krill nordique *T. inermis* mais, néanmoins se révèle aussi thermotolérant.

5.3.3. Choc long (6 semaines) à 3°C (figure 5-4)

L'objectif de cette expérience est d'estimer la capacité d'adaptation d'*E. superba* lors du passage d'une eau de 0 à 3°C et de suivre les expressions des différentes isoformes au cours de ce processus qui correspond à un scénario en accord avec un réchauffement global futur ou, simplement à un changement brusque de zone géographique ou de couche d'eau. Le scénario du réchauffement global est évidemment difficile à réaliser puisqu'il sous entend une augmentation progressive sur plusieurs décennies. La seconde éventualité est par contre de l'ordre du possible, à la fois en raison de la longévité des membres de l'espèce et de l'existence de zones géographiques où le krill évolue à des températures de cet ordre.
Le premier résultat notable est l'absence totale de mortalité du début à la fin des 6 semaines qu'a duré l'expérience. Manifestement, sur ce seul critère qu'est la survie, le passage à 3°C s'est révélé sans impact sur les animaux.

L'expression des isoformes d'*Hsp70* A, B, C, et E a été suivie tout au long de l'expérience afin d'observer l'impact du passage à 3°C sur la transcription des *hsp70*. L'isoforme D n'a pas pu être évaluée en raison de l'absence d'un signal suffisant dans la majorité des temps analysés. Sa concentration était trop faible lors de cette expérience. Le suivi de la concentration relative de cette forme aurait nécessité un réajustement des quantités rétro-transcrites et analysées lors d'un run de PCR quantitative.
Il est rassurant de constater que les valeurs des témoins et des points à 3h et 6h de cette expérience recoupent globalement celles obtenues précédemment à cette même température. Les variables expérimentales ne semblent donc pas influencer la lecture des résultats.
La concentration relative des transcrits codant pour la forme A est stable pendant les 6 premières heures du choc à 3°C. Puis, pendant les 12h qui suivent la concentration chute, elle est fortement sous exprimée (-5,30) au bout de 24h de choc. Pendant la suite de l'expérience il n'y a pas de forte sous expression comparable à celle observée à 24h. Du jour 2 à la première semaine de choc, la concentration reste légèrement surexprimée et ce de manière constante. L'expression est 4 fois supérieure aux témoins au bout de 2 semaines de choc. Après 3, 4, 5, et 6 semaines la quantité de transcrit reste stable et oscille à un niveau comparable au témoin.

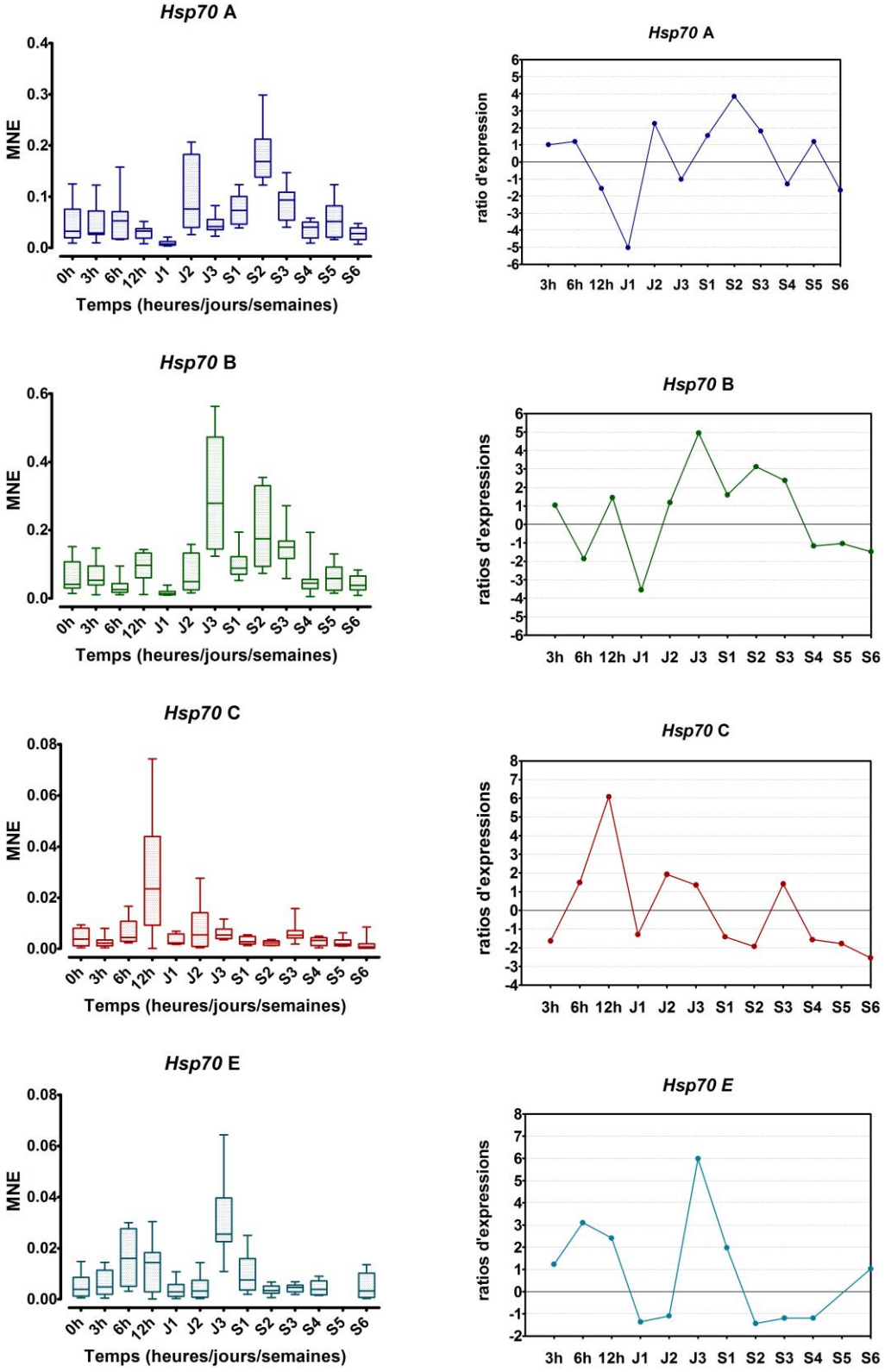

Figure 5-4 : Cinétique d'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. superba* pendant un choc thermique de 6 semaines à 3°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits (à gauche). Et ratios des moyennes d'expression par rapport au groupe témoins (0h) pour chaque isoforme (à droite)

La forme B subit plus de variation de son expression au cours du temps que la forme A. Elle est rapidement légèrement sous-exprimée à 6h de choc confirmant des résultats précédents. Puis, elle retourne à un niveau basal à 12h pour ensuite être de nouveau sous exprimée après 24h de choc. Après un passage au niveau basal à 2 jours de choc, la forme B est surexprimée du jour 3 à la semaine 3. Finalement pendant le reste de l'expérience la quantité d'*Hsp70* B retourne à une valeur basale. Cette expression en « dent de scie » qui oscille entre période de sur et sous expression met en évidence la présence de régulations au niveau de cette *Hsp70*.
On retrouve, dans le cas de l'*Hsp70* C, une régulation similaire oscillant entre surexpression et retour au niveau basal sans passage par une forte sous expression. La plus grande surexpression survient après 12h de choc (+6), puis lors du reste de l'expérience la concentration de cette forme varie autour d'une valeur basale (entre -1 et +1)
Finalement la forme E comme la forme C ne présente pas de grande diminution de l'expression au cours de l'expérience. Pendant les 12 premières heures à 3°C elle subit une légère sur expression, suivi d'un retour à la normale au jour 1 et 2. Après 3 jours de choc cette isoforme est induite (+ 8). Enfin, son niveau reste constant à une valeur témoin pendant le reste de l'expérience.

Le but du choc thermique de 3°C sur une longue période vise à mimer les conditions thermiques rencontrées dans certaines eaux d'Antarctique déjà sous l'emprise du réchauffement climatique. Il permet aussi de déterminer si, à défaut de réactivité des Hsp70 sur les précédentes expériences faisant varier temps courts et températures plus ou moins élevées, il était possible que des temps longs puissent générer une réponse. Et en effet, de manière générale, l'expression ne reste pas constante pour les isoformes. Les cinétiques d'expression de ces dernières présentent des pics mettant en évidence la présence de régulations des *Hsp70* au delà de 6h et donc leur activité de réparation des dommages cellulaires causés par la température.
Les sous expressions comme les surexpressions indiquent un recrutement des *Hsp70*. Il est intéressant de noter que ces phases de plus forte variation d'expression ne sont pas toujours les mêmes en fonction de l'isoforme. Les Forme C et E sont celles qui réagissent le plus rapidement dans ces conditions expérimentales. Elles sont surexprimées lors des premières heures de choc thermique. Contrairement aux formes A et B qui sont sous-exprimées au bout d'une journée puis surexprimées pendant les semaines qui suivent. Ces cinétiques d'expression, confirment un peu plus l'identité de ces Hsp70. Les plus réactives sont la forme C inductible, et la forme E qui lors des autres expériences se comporte le plus comme une inductible. Alors que les formes constitutives subissent des variations plus tard dans le temps, indiquant potentiellement l'accumulation de dommages cellulaires à cette température.

Puis, pour toutes les isoformes s'en suit une période où le niveau des transcrits des 2 familles revient à un état basal. *Euphausia superba* aurait donc une régulation des *Hsp* à 3°C permettant de palier aux dommages cellulaires causés par cette température sur une longue période mettant en évidence les capacités d'acclimatation de l'animal. Cette hypothèse peu être soutenue par l'absence totale de mortalité lors de l'expérience.

5.4. Discussion

Dans cette partie plusieurs types de choc thermique ont été effectués afin de sonder la présence d'une réponse HSP. Que ce soit au cours des chocs courts ou des chocs intenses sur 3h, aucune surexpression notable n'a été détectée. La réponse mise en évidence au cours des phases de récupération n'a pu être retrouvée qu'à l'issue du choc long à 3°C (figure 5-4), significativement à partir de 12h. Il apparait clairement à l'issue de ces différentes expérimentations que le facteur temps est important et que *E. supe*rba ne présente pas de réponse rapide similaire à celle existant chez *T. inermis*, voire *E. crystallorophias*. Les réponses observées pendant les temps de récupération en post choc pourraient donc être également dues à ce facteur. Cependant, comme mentionné précédemment, cette réponse tardive n'impacte visiblement pas les capacités de thermotolérance de l'animal.

L'hypothèse selon laquelle les animaux ectothermes vivant dans des milieux froids privilégieraient l'accumulation d'Hsp pour répondre aux dommages directement liés aux basses températures constituerait une explication à ce comportement physiologique (Place & Hofmann, 2005) Cette absence de réponse rapide pourrait trouver alors son origine dans la présence en permanence de quantités importantes de protéines chez l'animal, quantités suffisantes pour gérer les dommages provoqués par une hausse modérée mais aussi aigüe des températures pendant les premières heures. Lorsque le choc se prolonge et que les quantités et/ou la dégradation des Hsp70 présentes deviennent critiques pour compenser les perturbations cellulaires engendrées par le choc thermique, les ARNm présents sont recrutés via la traduction et une diminution de ce stock, assimilable à une sous expression, est visible. Parallèlement, la mise en œuvre des protéines Hsp70 constitutives, si l'on se réfère au scénario hypothétique de fonctionnement, doit activer la transcription des *Hsp70* inductibles via la libération des heat shock factors associés. Et effectivement, il semble que les pics d'*Hsp70* C apparaissent avant les pics des formes A et B (figure 5-4), voire pendant la phase de diminution, le but étant de soutenir la fonction Hsc70 ou participer à la mise en

conformation des nouvelles Hsc70.

Cette hypothèse pourrait être validée par la comparaison des quantités d'Hsp70 disponibles chez les différentes espèces chez les contrôles. L'estimation de la quantité de transcrits présents doit aussi être informatif dans ce contexte. S'il s'avère possible de comparer les valeurs d'expression entre les deux espèces d'Antarctique en raison d'un gène de référence commun, la comparaison avec *T. inermis* sur ces critères n'est pas possible en raison du choix d'un gène de référence différent.

Il apparait alors que les quantités mesurées par qPCR chez les deux *Euphausia* sont similaires laissant supposer que la stratégie de réponse est comparable. Cependant, les cinétiques d'expression, sur la première série d'expériences, se révèlent différentes, avec des réponses plus marquées pour l'espèce épipélagique. Dans le cadre de cette hypothèse, *E. crystallorophias* serait donc l'espèce la plus thermosensible.

Il semble cependant que les chocs les plus intenses (figure 5-3) n'engendrent pas de réponses plus rapides pour autant, même si manifestement certaines de ces températures sont à l'origine de graves problèmes métaboliques et sont proches de la limite de létalité. Certes, le recrutement des stocks d'Hsp70 apparait plus fort qu'avec les températures plus faibles, mais la surexpression tarde à se mettre en place, manifestement aux dépends des animaux à 12°C où la mortalité est importante même après 3h seulement.

La comparaison avec *T. inermis* démontre que les espèces boréales et australes ne possèdent pas le même type fonctionnement au niveau de la réponse Hsp70. La réponse de l'espèce boréale est plus « classique » et correspond à une réponse compatible avec celle des espèces de milieux tempérés. Les espèces australes sembleraient hypothétiquement privilégier le maintien d'un niveau élevé en protéines associé à un stock important d'ARNm, notamment des formes constitutives. Ces dernières ont une activité encore augmentée par leur nombre en comparaison avec *T. inermis* où une seule forme a pu être caractérisée contre deux chez les *Euphausia*. Cette organisation permettrait donc une réponse immédiate, voire continue, à un stress thermique, chaud comme froid, mais reculerait d'autant le seuil d'induction de la transcription de nouveaux ARNm codant pour ces protéines. Ce système serait particulièrement adapté à des modifications limitées de la température à court terme, gérables grâce aux stocks disponibles mais manifestement ne serait pas assez réactif pour se protéger des chocs plus intenses à court terme. Par contre, les CT_{50} démontrent sans ambiguïté des capacités de gestion sur le long terme des températures faibles comme très importantes et improbables dans la région. Ces données sont soutenues par les informations fournies par

l’expérience de suivi à 3°C mettant en évidence des capacités d’acclimatation indéniables du krill d’Antarctique *E. superba*.(Clark *et al.*, 2011; Toullec *et al.*, 2013).

6. Conclusion et perspectives

Le réchauffement climatique est un phénomène qui amène à une augmentation globale de la température terrestre. Cette augmentation de température entraine une multitude de modifications des paramètres biotiques comme abiotiques. L'origine plurifactorielle des modifications des environnements fait qu'il est difficile d'évaluer l'impact réel de chaque facteur sur les écosystèmes. Il est donc nécessaire d'isoler chaque paramètre afin d'analyser son impact sur les systèmes biologiques. Le but de cette étude a été d'évaluer l'impact de la température seule, sur une famille d'animaux : Le krill.

Le krill a été choisi comme organisme modèle dans cette étude pour son importance écologique dans les écosystèmes polaires. En effet, d'une part il est intéressant d'étudier les écosystèmes polaires, car ce sont les premiers touchés par le réchauffement climatique, et d'autre part le krill constitue, dans les régions polaires, une ressource indispensable pour l'ensemble des communautés animales.

Au cours de cette thèse, la comparaison de l'impact de la température sur 3 espèces polaires a été réalisée. Deux espèces d'Antarctique, *Euphausia superba* et *Euphausia crystallorophias* et une originaire d'Arctique *Thysanoessa inermis* ont été sélectionnées au regard des caractéristiques de leurs répartitions géographiques.

Leur limite de tolérance à la température, dans le contexte du réchauffement climatique permet d'apporter des informations avec l'objectif de prédire le devenir de ces populations, et ainsi l'évolution possible des écosystèmes polaires.

Les limites supérieures et inférieures de ces trois espèces ont été testées à l'aide d'augmentations expérimentales de la température. La limite supérieure a été évaluée par la détermination de la CT_{50} lors de l'augmentation progressive de la température jusqu'à l'observation des premiers troubles de mobilité, et la limite inférieure, par l'apparition d'un stress cellulaire, via l'expression d'*Hsp70*.

Grace aux résultats obtenus au cours de cette étude, il apparait que les espèces étudiées présentent toutes de fortes thermotolérances pour des organismes polaires. En particulier en ce qui concerne le krill d'Antarctique, qui en comparaison avec d'autres organismes de la même région (la plupart des études réalisées ont porté sur des organismes benthiques), se place parmi les organismes, à priori sténothermes, les plus résistants à la température. À contrario, le krill *T. inermis*, choisi pour son milieu froid mais plus variable et considéré comme plutôt eurytherme, a une tolérance similaire, même s'il ne s'agit certainement pas de

la plus thermotolérante des espèces présentes dans ces régions, ni même au sein du krill. *E. crystallorophias*, pourtant proche phylogénétiquement et géographiquement de *E. superba*, a une résistance thermique inférieure de 1°C, comparée à *E. superba*.

L'allongement des temps d'incrémentation lors des CT50 a aussi permis de confirmer la forte tolérance thermique de *E. superba.* Même si l'augmentation du temps d'incrémentation a tendance à diminuer la valeur de CT_{50}, cette diminution demeure faible (en comparaison avec *C. antarcticus*). La comparaison des résultats obtenus avec les mêmes expériences effectuées sur *E. crystallorophias* permettrait de confirmer la thermotolérance de chaque espèce.

Néanmoins les différences de CT_{50} sont à corréler avec la répartition des deux espèces, *E. crystallorophias* étant un épipélagique côtier alors que *E. superba* est un pélagique hauturier.

Des organismes affichant une telle tolérance à la température possèdent des mécanismes moléculaires leur permettant de corriger les dommages cellulaires générés. Les Hsp70 sont les protéines les plus connues et les plus étudiées pour leur fonction de chaperonne au sein de la cellule. C'est pour cette raison qu'elles sont largement utilisées comme biomarqueur de stress au sens large. L'expression génique d'un tel biomarqueur indique, lorsque la température est modifiée, que la limite inférieure de tolérance d'un organisme est atteinte. Cette propriété des Hsp70 est utilisée dans cette étude pour sonder, à de faibles températures (en accord avec les prédictions du réchauffement climatique), si la limite inférieure de tolérance à la température est atteinte pour les krills polaires.

Mais la réponse Hsp, bien que très conservée dans tous les phylum, diffère grandement en fonction des organismes et de leur aires de répartitions. De plus, les *hsp70* étant une cible privilégiée de l'évolution, les forces sélectives peuvent impacter d'autant plus la variabilité de réponse. Il est donc important de replacer chaque réponse Hsp dans son contexte afin d'éviter de mauvaises interprétations.

Les *hsp70* sont généralement présentent en plusieurs copies à l'origine de plusieurs isoformes. Chaque isoforme a une localisation et une fonction distinctes, et de ce fait une activité potentiellement différente. C'est pour cette raison qu'au cours de cette étude l'ensemble des isoformes caractérisées a été analysé.

L'ensemble des cinétiques d'expressions marque bien la diversité de réponse face à un choc thermique. Le krill Arctique se caractérise par une forte réponse Hsp70 en lien avec l'intensité et la durée des chocs thermiques effectués. De plus, cette forte réponse Hsp est observable pendant les phases de choc mais est aussi maintenue lors des phases de récupération. Ces profils d'expressions caractérisent une réponse Hsp de milieu variable. Ces réponses de

« milieu variable » aux températures testées indiqueraient une sensibilité de l'espèce à une hausse de 3 et 6°C de température.

Le krill Antarctique ne possède pas de réponse similaire. D'une part *E. crystallorophias* possède une réponse faible. Cette réponse se distingue de celle observé chez *T. inermis* car il n'y a pas de corrélation entre l'intensité de la réponse avec les types de choc effectués (intensité et durée). D'autre part, *E. superba* se démarque par l'absence de réponse Hsp lors de choc thermique. Cependant, l'absence des mécanismes d'induction des Hsp est à écarter puisqu'il y a une réponse Hsp lors des phases de récupérations. Les deux espèces antarctiques lors du choc thermique à 6°C pendant 6h ont toutes les deux les mêmes profils d'expression : une baisse de l'expression des Hsp70 pendant et après ce choc thermique, indiquant une éventuelle dépression métabolique.

Il existe donc une forte différence de réponse Hsp entre les espèces australes et boréales suggérant que la réponse Hsp n'est pas caractéristique du krill mais plutôt de leur habitat respectif.

Les hausses de températures de 3 et 6°C pour les trois espèces semble indiquer, que *E. crystallorophias* et *T. inermis* sont sensibles, et commencent à accumuler les effets délétères du stress cellulaire sous l'effet de ces températures. En parallèle, *E.superba* serait peu affecté par ces hausses, indiquant l'absence de stress.

Les niveaux d'expression de *E. superba* sont difficiles à interpréter car il possède une CT_{50} corrigée similaire à *T. inermis*, mais absolument pas la même réponse Hsp. C'est ce paradoxe qui a poussé à approfondir l'analyse de l'expression des Hsp70 lors d'autres chocs thermiques.

Or, malgré la multiplication des temps de choc et d'échantillonnage, aucune réponse *Hsp70* significative n'a été observée. Bien que de légères inductions de l'expression soient notables dans certains cas, il est tout de même difficile de mettre en évidence une réponse *Hsp70* lors de chocs thermiques. Cependant, la succession de légères inductions des formes constitutives puis inductibles lors des 6 semaines de choc à 3°C, suivi par une atténuation de ces inductions pourrait mettre en évidence des phénomènes d'acclimatations.

Finalement des chocs thermiques de forte intensité ont été testés pour induire une réponse *Hsp70*. Une fois de plus *E. superba* ne présente pas d'induction d'*Hsp70*.

Bien qu'aucune réponse *Hsp70* indiquant un stress, similaire à ce qui a été démontré sur les autres espèces étudiées, *E. superba* est tout de même dotée d'une forte tolérance thermique. La forte CT_{50}, ou encore l'absence de mortalité pendant 6 semaines à 3°C témoigne de cette tolérance.

Ces résultats contradictoires révèlent qu'il manque des niveaux d'études afin d'élucider la limite inférieure de tolérance thermique de *E. superba*, mais surtout de comprendre les mécanismes moléculaires conférant cette résistance à l'espèce.

Les quantités protéiques d'Hsp70 n'ont pas été analysées. Bien qu'il existe de manière générale une forte corrélation entre le niveau d'expression d'un gène et la quantité de protéines synthétisées, il n'est pas à exclure que cette règle ne soit pas suivi dans ce cas.

En effet, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. La présence d'un stock de d'Hsp70 déjà traduites peut être déjà présent au sein de la cellule. Ainsi, lors d'un choc modéré, les protéines préexistantes pallient directement à la dénaturation thermique, sans que la transcription ne soit affectée. La présence de ce stock associé à de fortes concentrations en ARNm codant pour les *Hsp70* A et B, peut être à l'origine de l'absence d'une forte activité transcriptionnelle, et cependant d'une bonne capacité de résistance de *E. superba* à la température expérimentale.

Il est aussi possible de considérer une activité traductionnelle accrue, à l'origine de grande quantité d'Hsp70 mais sans que la transcription ne suive la même tendance. Ce genre de phénomène peut être expliqué par un recrutement de nombreux ribosomes traduisant simultanément le même ARNm (DiDomenico *et al.*, 1982b). Ces polysomes pourraient donc être à l'origine d'une forte production d'Hsp70 sans que l'on puisse détecter cette activité au niveau transcriptionnel. Afin d'étayer ces hypothèses il serait nécessaire de pousser l'étude au niveau protéique via la mesure de la concentration des Hsp70 globale dans un premier temps, et en discriminant les différentes isoformes considérées dans un second temps.

En l'absence de réponse Hsp observable, il est aussi possible de considérer un fonctionnement différent des Hsp70 chez les espèces antarctiques. La sélection de formes plus adaptées au froid pourrait être à l'origine de protéines ayant une stabilité plus grande et une plus grande efficacité de chaperonnage aux températures froides (Place & Hofmann, 2005). Chez les organismes antarctiques des changements d'acides aminés chargés pour des acides aminés polaires ont déjà été observés leur conférant une activité plus grande à faible température (D'Amico *et al.*, 2001; Siddiqui & Cavicchioli, 2006). Or, d'autres analyses sur les séquences d'Hsp70 du krill d'antarctique ont révélé ce type de modifications, notamment chez *E. crystallorophias* (Cascella *et al.*, 2014 soumis). Le suivi de la renaturation protéique par les Hsp70 de *E. superba* en comparaison avec d'autres Hsp70, à différentes températures, apporterait des éléments de réponse à cette hypothèse.

La réponse cellulaire à un stress n'implique pas uniquement les Hsp70. Il existe au sein de la réponse Hsp une multitude d'autres Hsp ayant une masse moléculaire différente, agissant seul

ou en synergie avec les Hsp70. L'ensemble de ces protéines chaperonnes constitue les principaux de la réparation des protéines lors d'un stress cellulaire. L'analyse de l'action d'autres Hsp70 (110, 100, 90, 40, 27…etc) lors de chocs thermiques révélerait sans doute la présence d'autres types de régulation de HSR.

La réponse cellulaire à un stress fait intervenir de nombreuses régulations comprenant la réparation des dommages des protéines, de l'ADN, mais aussi la régulation du cycle cellulaire et du métabolisme (Kültz, 2005). Autant de niveau de régulation qui comportent chacun ses marqueurs, qu'il serait intéressant de quantifier afin de compléter les informations fournies par les réponses Hsp70 sur l'état de stress de l'organismes.

L'étude de la thermotolérance d'un organisme comprend donc autant de niveaux d'étude qu'il y a de types de réponses. La réponse Hsp70, malgré ses variations intra et interspécifiques, est un moyen efficace, mais cependant limité, d'estimer cette capacité, et d'amener un début de réponse sur les mécanismes impliqués dans la tolérance de ces organismes polaires au réchauffement climatique.

Bibliographie

Anisimov O, Vaughan D, Callaghan T (2007) Polar regions (Arctic and Antarctic). *Climate change*, 653–685.

Arrigo A-P (2005) Chaperons moléculaires et repliement des protéines. *Medecine/sciences*, **21**, 619–25.

Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, Rothery P (2004a) Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. *Nature*, **432**, 100–3.

Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, Rothery P (2004b) Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. *Nature*, **432**, 100–3.

Atkinson a, Siegel V, Pakhomov E et al. (2008) Oceanic circumpolar habitats of Antarctic krill. *Marine Ecology Progress Series*, **362**, 1–23.

Atkinson a., Siegel V, Pakhomov E a., Jessopp MJ, Loeb V (2009) A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **56**, 727–740.

Baker A de C, Boden BP, Brinton E (1990) *A practical Guide to the Euphausiids of the World*. British Museum (Natural History), London.

Benton MJ, Twitchett RJ (2003) How to kill (almost) all life: the end-Permian extinction event. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 358–365.

Bettencourt BR, Feder ME (2001) Hsp70 duplication in the Drosophila melanogaster species group: how and when did two become five? *Molecular biology and evolution*, **18**, 1272–82.

Bettencourt BR, Feder ME, Cavicchi S (1999a) Experimental Evolution of Hsp70 Expression and Thermotolerance in Drosophila melanogaster. *Evolution*, **53**, 484.

Bettencourt BR, Feder ME, Cavicchi S (1999b) Experimental Evolution of Hsp70 Expression and Thermotolerance in Drosophila melanogaster. *Evolution*, **53**, 484.

Bettencourt BR, Hogan CC, Nimali M, Drohan BW (2008) Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in Drosophila melanogaster but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. *BMC biology*, **6**, 5.

Blamowska M, Neupert W, Hell K (2012) Biogenesis of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *The Journal of cell biology*, **199**, 125–35.

Brattstrom BH (1968) Thermal acclimation in Anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **24**, 93–111.

Buchholz F, Buchholz C, Weslawski JM (2009) Ten years after: krill as indicator of changes in the macro-zooplankton communities of two Arctic fjords. *Polar Biology*, **33**, 101–113.

Buchholz F, Werner T, Buchholz C (2012) First observation of krill spawning in the high Arctic Kongsfjorden, west Spitsbergen. *Polar Biology*, **35**, 1273–1279.

Cascella K, Jollivet D, Papot C et al. (2014) Diversification, evolution and sub-functionalization of 70kDa heat-shock proteins in two sister species of Antarctic krill: Differences in thermal habitats, responses and implications under climate change. *Molecular ecology*.

Clark MS, Peck LS (2009) HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. *Marine genomics*, **2**, 11–8.

Clark M, Fraser K, Peck L (2008a) Lack of an HSP70 heat shock response in two Antarctic marine invertebrates. *Polar Biology*, **31**, 1059–1065.

Clark MS, Fraser KPP, Peck LS (2008b) Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response. *Cell stress & chaperones*, **13**, 39–49.

Clark MS, Thorne M a S, Toullec J-Y, Meng Y, Guan LL, Peck LS, Moore S (2011) Antarctic krill 454 pyrosequencing reveals chaperone and stress transcriptome. *PloS one*, **6**, e15919.

Clarke A (1983) Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanography and marine biology*, **21**, 341–453.

Clarke A (2003) Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 573–581.

Clarke A, Tyler P a (2008) Adult antarctic krill feeding at abyssal depths. *Current biology : CB*, **18**, 282–5.

Clarke A, Murphy EJ, Meredith MP, King JC, Peck LS, Barnes DK., Smith RC (2007) Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **362**, 149–166.

Colson-Proch C, Morales A, Hervant F, Konecny L, Moulin C, Douady CJ (2010) First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: a study of the HSP70 gene expression. *Cell stress & chaperones*, **15**, 259–70.

Cottin D, Shillito B, Chertemps T, Thatje S, Léger N, Ravaux J (2010) Comparison of heat-shock responses between the hydrothermal vent shrimp Rimicaris exoculata and the

related coastal shrimp Palaemonetes varians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **393**, 9–16.

Cuculescu M, Hyde D, Bowler K (1998) Thermal tolerance of two species of marine crab, Cancer pagurus and Carcinus maenas. *Journal of Thermal Biology*, **23**, 107–110.

Cui Z, Liu Y, Luan W, Li Q, Wu D, Wang S (2010) Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (Portunus trituberculatus). *Fish & shellfish immunology*, **28**, 56–64.

D'Amico S, Gerday C, Feller G (2001) Structural determinants of cold adaptation and stability in a large protein. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 25791–6.

Dalpadado P, Skjoldal HR (1996) Abundance , maturity and growth of the krill species Thysanoessa inermis and T . longicaudata in the Barents Sea. **144**, 175–183.

Deane EE, Woo NYS (2005) Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and biophysical research communications*, **330**, 776–83.

Demand J, Lüders J, Höhfeld J, Lu J (1998) The Carboxy-Terminal Domain of Hsc70 Provides Binding Sites for a Distinct Set of Chaperone Cofactors The Carboxy-Terminal Domain of Hsc70 Provides Binding Sites for a Distinct Set of Chaperone Cofactors. *Molecular and cellular biology*, **18**, 2023–2028.

DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S (1982a) The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell*, **31**, 593–603.

DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S (1982b) Heat shock and recovery are mediated by different translational mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 6181–5.

Doney SC, Ruckelshaus M, Emmett Duffy J et al. (2012) Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, **4**, 11–37.

Dunton K (1992) Arctic biogeography: The paradox of the marine benthic fauna and flora. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)*, **7**, 183–189.

Falk-Petersen S, Hagen W, Kattner G, Clarke A, Sargent J (2000) Lipids, trophic relationships, and biodiversity in Arctic and Antarctic krill. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 178–191.

Fawcett J a, Innan H (2011) Neutral and non-neutral evolution of duplicated genes with gene conversion. *Genes*, **2**, 191–209.

Feder ME, Cartaño N V, Milos L, Krebs R a, Lindquist SL (1996) Effect of engineering Hsp70 copy number on Hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat

shock in larvae and pupae of Drosophila melanogaster. *The Journal of experimental biology*, **199**, 1837–44.

Fuertes MA, Pérez JM, Soto M, Menéndez M, Alonso C (2004) Thermodynamic stability of the C-terminal domain of the human inducible heat shock protein 70. *Biochimica et biophysica acta*, **1699**, 45–56.

Gille ST (2002) Warming of the Southern Ocean since the 1950s. *Science (New York, N.Y.)*, **295**, 1275–7.

Gillooly JF, Brown JH, West GB, Savage VM, Charnov EL (2001) Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 2248–51.

Haas IG (1994) BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia*, **50**, 1012–20.

Hemery L (2011) *Diversité moléculaire , phylogéographie et phylogénie des Crinoïdes (Echinodermes) dans un environnement extrême : l'océan Austral* . MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE.

Hill SL, Keeble K, Atkinson A, Murphy EJ (2012) A foodweb model to explore uncertainties in the South Georgia shelf pelagic ecosystem. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **59-60**, 237–252.

Hill SL, Phillips T, Atkinson A (2013) Potential climate change effects on the habitat of antarctic krill in the weddell quadrant of the southern ocean. *PloS one*, **8**, e72246.

Hofmann GE, Buckley BA, Airaksinen S, Keen JE, Somero GN (2000) Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish Trematomus bernacchii (family Nototheniidae). *The Journal of experimental biology*, **203**, 2331–9.

Hutchison VH (1961) Critical Thermal Maxima in Salamanders. *Physiological Zoology*, **34**, 92–125.

Jarman SN, Elliott NG, Nicol S, McMinn A (2000a) Molecular phylogenetics of circumglobal Euphausia species (Euphausiacea: Crustacea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 51–58.

Jarman SN, Nicol S, Elliott NG, McMinn A (2000b) 28S rDNA evolution in the Eumalacostraca and the phylogenetic position of krill. *Molecular phylogenetics and evolution*, **17**, 26–36.

Jarman SN, Elliott NG, Nicol S, McMinn A (2002) Genetic differentiation in the Antarctic coastal krill Euphausia crystallorophias. *Heredity*, **88**, 280–7.

Jeffery NW (2011) The first genome size estimates for six species of krill (Malacostraca, Euphausiidae): large genomes at the north and south poles. *Polar Biology*, **35**, 959–962.

Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**, 137–43.

Karlin S, Brocchieri L (1998) Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *Journal of molecular evolution*, **47**, 565–77.

Kawaguchi S, King R, Meijers R, Osborn JE, Swadling KM, Ritz DA, Nicol S (2010) An experimental aquarium for observing the schooling behaviour of Antarctic krill (Euphausia superba). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **57**, 683–692.

Kawai A, Nishikawa S, Hirata A, Endo T (2001) Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells. *Journal of cell science*.

Krebs R a, Feder ME (1997) Tissue-specific variation in Hsp70 expression and thermal damage in Drosophila melanogaster larvae. *The Journal of experimental biology*, **200**, 2007–15.

Kültz D (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual review of physiology*, **67**, 225–57.

Laursen JR, di Liu H, Wu XJ, Yoshino TP (1997) Heat-shock response in a molluscan cell line: characterization of the response and cloning of an inducible HSP70 cDNA. *Journal of invertebrate pathology*, **70**, 226–33.

Lefebvre V, Donnadieu Y (2012) Deciphering the role of southern gateways and carbon dioxide on the onset of the Antarctic Circumpolar Current. *Palaeoceanography*, **27**, 1–9.

Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, **55**, 1151–91.

Liu J, Yang W, Zhu X, Karouna-Renier NK, Rao RK (2004) Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, Macrobrachium rosenbergii. *Cell Stress & Chaperones*, **9**, 313.

Luan W, Li F, Zhang J, Wen R, Li Y, Xiang J (2010) novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses. *Cell Stress and Chaperones*, 83–93.

Mackey a. P, Atkinson A, Hill SL, Ward P, Cunningham NJ, Johnston NM, Murphy EJ (2012) Antarctic macrozooplankton of the southwest Atlantic sector and Bellingshausen Sea: Baseline historical distributions (Discovery Investigations, 1928–1935) related to temperature and food, with projections for subsequent ocean warming. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **59-60**, 130–146.

Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, Chrousos GP (2007) Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **18**, 190–8.

Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **62**, 670–84.

Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, **12**, 3788–3796.

Morris JP, Thatje S, Hauton C (2013) The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. *Molecular Ecology*, **22**, 1494–1502.

Murphy E., Watkins J., Trathan P. et al. (2007) Spatial and temporal operation of the Scotia Sea ecosystem: a review of large-scale links in a krill centred food web. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **362**, 113–148.

Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry*, **76**, 723–49.

NICOL S (2006) Krill, Currents, and Sea Ice: Euphausia superba and Its Changing Environment. *BioScience*, **56**, 111.

Noisette F (2014) *Impacts de l'acidification des océans sur les organismes benthiques calcifiants des milieux côtiers tempérés*. Université Pierre et Marie Curie Paris VI.

Pakhomov EA, Perissinotto R (1996) Antarctic neritic krill Euphausia crystallorophias: spatio-temporal distribution, growth and grazing rates. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **43**, 59–87.

Parsell D, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual review of genetics*, 437–496.

Patarnello T, Bargelloni L, Varotto V, Battaglia B (1996a) Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. *Marine Biology*, **126**, 603–608.

Patarnello T, Bargelloni L, Varotto V, Battaglia B (1996b) Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. *Marine Biology*, 603–608.

Peck L (2002) Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. *Polar Biology*, **25**, 31–40.

Peck LS, Morley SA, Pörtner H-O, Clark MS (2007) Thermal limits of burrowing capacity are linked to oxygen availability and size in the Antarctic clam Laternula elliptica. *Oecologia*, **154**, 479–84.

Peck LS, Clark MS, Morley SA, Massey A, Rossetti H (2009) Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology*, **23**, 248–256.

Peck LS, Morley SA, Clark MS (2010) Poor acclimation capacities in Antarctic marine ectotherms. *Marine Biology*, **157**, 2051–2059.

Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochimica et biophysica acta*, **1833**, 410–6.

Place SP, Hofmann GE (2005) Comparison of Hsc70 orthologs from polar and temperate notothenioid fishes: differences in prevention of aggregation and refolding of denatured proteins. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **288**, R1195–202.

Polyakov I V., Timokhov LA, Alexeev VA et al. (2010) Arctic Ocean Warming Contributes to Reduced Polar Ice Cap. *Journal of Physical Oceanography*, **40**, 2743–2756.

Pörtner HO, Peck L, Somero G (2007a) Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **362**, 2233–58.

Pörtner H, Peck L, Somero G (2007b) Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2233–2258.

Prince VE, Pickett FB (2002) Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nature reviews. Genetics*, **3**, 827–37.

Ravaux J, Toullec J-Y, Léger N, Lopez P, Gaill F, Shillito B (2007) First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, Mirocaris fortunata and Rimicaris exoculata: characterization and sequence analysis. *Gene*, **386**, 162–72.

Ravaux J, Léger N, Rabet N, Morini M, Zbinden M, Thatje S, Shillito B (2012) Adaptation to thermally variable environments: capacity for acclimation of thermal limit and heat shock response in the shrimp Palaemonetes varians. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, **182**, 899–907.

Rensing SA, Maier U-G (1994) Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution*, **39**.

Rignot E, Mouginot J, Morlighem M, Seroussi H, Scheuchl B (2014) Widespread, rapid grounding line retreat of Pine Island, Thwaites, Smith and Kohler glaciers, West Antarctica from 1992 to 2011. *Geophysical Research Letters*, n/a–n/a.

Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, **18**, 571–573.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.

Siddiqui KS, Cavicchioli R (2006) Cold-adapted enzymes. *Annual review of biochemistry*, **75**, 403–33.

Siegel V (2000) Krill (Euphausiacea) life history and aspects of population dynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 130–150.

Smith WO, Ainley DG, Arrigo KR, Dinniman MS (2014) The oceanography and ecology of the Ross Sea. *Annual review of marine science*, **6**, 469–87.

Somero GN (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine "winners" and "losers". *The Journal of experimental biology*, **213**, 912–20.

Sørensen JG, Loeschcke V (2007) Studying stress responses in the post-genomic era: its ecological and evolutionary role. *Journal of biosciences*, **32**, 447–456.

Sørensen J, Kristensen T, Loeschcke V (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 1025–1037.

Stillman JH, Somero GN (2000) A Comparative Analysis of the Upper Thermal Tolerance Limits of Eastern Pacific Porcelain Crabs, Genus Petrolisthes: Influences of Latitude, Vertical Zonation, Acclimation, and Phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*, **73**, 200–2008.

Terblanche JS, Deere J a, Clusella-Trullas S, Janion C, Chown SL (2007) Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **274**, 2935–42.

Tomanek L (2010) Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *The Journal of experimental biology*, **213**, 971–9.

Toullec J-Y, Corre E, Bernay B et al. (2013) Transcriptome and peptidome characterisation of the main neuropeptides and peptidic hormones of a euphausiid: the Ice Krill, Euphausia crystallorophias. *PloS one*, **8**, e71609.

Tremblay N (2014) *Tolerance mechanisms and responses of krill species of different latitudes to oxygen minimum zones*. Universität Bremen.

Velazquez JM, Lindquist S (1984) hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell*, **36**, 655–662.

Voos W (2013) Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochimica et biophysica acta*, **1833**, 388–99.

Zane L, Patarnello T (2000) Krill: a possible model for investigating the effects of ocean currents on the genetic structure of a pelagic invertebrate. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 16–23.

Zane L, Ostellari L, Maccatrozzo L, Bargelloni L, Battaglia B, Patarnello T (1998) Molecular evidence for genetic subdivision of Antarctic krill (Euphausia superba Dana) populations. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **265**, 2387–91.

Zuiderweg ERP, Bertelsen EB, Rousaki A, Mayer MP, Gestwicki JE, Ahmad A (2013) Allostery in the Hsp70 chaperone proteins. *Topics in current chemistry*, **328**, 99–153.

Annexes - Amorces PCR *E. superba* et *E. crystallorophias*

Amorces pour l'amplification des ADNc d'*Hsp70* chez *E. superba et E. crystallorophias.* Toutes les amorces ont une température d'hybridation de 60°C.

Amorces pour PCR internes

HSP70ABF1	TGCAAATGACCAGGGTAACC
HSP70AR2*	ATGGTTGGTCCAGCTGATC
HSP70BR2*	GAAGACTGATAAGCGGAATGAG
HSP70CF1	CCAAGATGTCTGCTCCAGT
HSP70CR2*	CTGAAGTCTCTTTGCCAGC
HSP70DF1*	GCAAAATTTATCGCCACCAATG
HSP70DR2*	GCTTCCACGCTATAATTAGTTCT

Amorces pour PCR quantitatives

EucHSP70A_3'F	AATCATTACCAAGATGTACCAGGC
EucHSP70A_3'R	ATAAATTTCAACATTATATTGTAGATGTGATAGC
EuC-HSP70A_3'R-bis	CTGGGGCACTTGCGTC
EucHSP70B_3'F	AGAGATCGAACAAATTTGCAATCC
EucHSP70B_3'R	TGCTGAAGACTGATAAGCGGA
EucHSP70C_3'F	AAGAAGAGAAAGGATCAATCAGTAGTCAG
EucHSP70C_3'R	AGTTATGAATCTTAGCAGCAAGTGG
EucHSP70D_3'F	TCTGCAACAATCTTCACTGAAACTC
EucHSP70D_3'R	AACTAAATGCCAATTTATTGTTTGCCAC
EucHSP70E_3'F	AAAGGTGTGCAGTCCTATCATCAC
EucHSP70E_3'R	ATCCTAAATCAACTTATAATTGGTCCTTTAGTC
Euc18S_F	TTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGC
Euc18S_R	CCCTAGTTCTAACCATAAACGATGC

Annexes - Amorces PCR *T. inermis*

Amorces pour l'amplification des ADNc d'*Hsp70* chez *T.inermis.* Toutes les amorces ont une température d'hybridation de 60°C.

Amorces pour PCR internes

Thi Hsp70 B F	GGAATTGATCTGGGTACCACC
Thi Hsp70 B R	CGGTTCTCCTATAAGCACTTCT
Thi Hsp70 C1 F	CATTGACCTCGGCACTACC
Thi Hsp70 C1 R	GAGAGGGTCAGGGTCATCA
Thi Hsp70 C2 F	CATTGACCTCGGCACTACC
Thi Hsp70 C2 R	GCTCAGAAAGTACATCTGCC
Thi Hsp70 D F	TGAATAAGGCTGCTGTTCCC
Thi Hsp70 D R	GCTCGCTAACAAGGATACTATTG

Amorces pour PCR quantitatives

Thi_hsp70_B_#1-F	GTTCAAGGCTGATGACGAGA
Thi_hsp70_B_#1-R	CCACTTGATAGCCTCATTGC
Thi_hsp70_C1_#2-F	GTGGCATCCAGCAAGTTG
Thi_hsp70_C1_#2-R	CTCCAGTGGTGCTTTATGC
Thi_hsp70_C2_#2-F	CTGCATCCAACAAGTTGACA
Thi_hsp70_C2_#2-R	CGGTATTGTGAATCTTAGCAGC
Thi_hsp70_E_#2-F	TCATGGAGAAGTGTAATGAGACC
Thi_hsp70_E_#2-R	GCATATCACCTGGCATACCA
Thi_hsp70_D_#1-F	GGAGAGTCAATCATACATGACAC
Thi_hsp70_D_#1-R	CAATAGTATCCTTGTTAGCGAGC
Thi_18S_#2-F	TTGATTACGTCCCTGCCC
Thi_18S_#2-R	CTACGGAAACCTTGTTACGAC
RPL8_F_qPCR	TCGTGCCTATCATAAATACAGGG
RPL8_R_qPCR	CAATAAGACCAACCTTGCGG

Annexes – Articles soumis

Diversification , evolution and sub-functionalization of 70kDa heat-shock proteins in two sister species of Antarctic krill : Differences in thermal habitats, responses and implication under climate change.

K. Cascella[1,2], D. Jollivet[1,2], C. Papot[3], N. Léger[4,5], E. Corre[6,7], J. Ravaux[4,5], M.S. Clark[8], and J.-Y. Toullec[1,2]

1- Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR 7144 CNRS, Equipe ABICE, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France.

2- CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

3- Université Lille 1, Equipe GEPV, Cité Scientifique, 59650 Villeneuve d'Ascq

4- Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR 7208 CNRS, Equipe AMEX, 75005 Paris, France.

5- CNRS 7208, BOREA, UPMC Université Paris 06, 75005 Paris, France,

6- Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, FR 2424 CNRS, ABiMS, Analysis and Bioinformatics for Marine Science, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France.

7- CNRS, FR 2424, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

8- British Antarctic Survey, Natural Environment Research Council, High Cross, Madingley Road, Cambridge, CB3 0ET, UK.

Soumis

Gene expression and physiological changes of the Antarctic krill *Euphausia superba* under different hypoxia intensities

Nelly Tremblay[1], Kévin Cascella[2,3], Jean-Yves Toullec[2,3], Christoph Held[1], Sophie Fielding[4], Geraint A. Tarling[4], Doris Abele[1*]

1- Alfred Wegener Institute, Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, Functional Ecology, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

2- Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR 7144 CNRS, Equipe ABICE, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

3- CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

4- British Antarctic Survey, Natural Environment Research Council, High Cross, Cambridge, CB3 0ET**,** United Kingdom

Soumis

Transcriptome and peptidome characterisation of the main neuropeptides and peptidic hormones of a Euphausiid: the ice krill, Euphausia crystallorophias.

J.-Y. Toullec[1,4], E. Corre [2], B. Bernay[7,8], M.A.S. Thorne[9], K. Cascella [1,4], C. Ollivaux[3,5], J. Henry [7,8] and M.S. Clark, [9]

1- UPMC University of Paris 06, UMR 7144 CNRS, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

2- CNRS, UPMC, FR 2424, ABiMS, Analysis and Bioinformatics for Marine Science, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

3- UPMC University of Paris 06, UMR 7150 CNRS, Mer et Santé, UEB, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

4- Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

5- Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

6- Université Européenne de Bretagne, UEB, France

7- University of Caen Basse Normandie, FRE 3484 CNRS, Biologie des Mollusques Marins et des Ecosystèmes Associés, 14032 Caen Cedex, France

8- University of Caen Basse Normandie, Plateforme PROTEOGEN, 14032 Caen Cedex, France, SF ICORE 4206.

9- British Antarctic Survey, Natural Environment Research Council, High Cross, Madingley Road, Cambridge, CB3 0ET, UK.

Publié - Toullec J-Y, Corre E, Bernay B, Thorne M a S, Cascella K, et al. (2013) Transcriptome and peptidome characterisation of the main neuropeptides and peptidic hormones of a euphausiid: the Ice Krill, Euphausia crystallorophias. PLoS One 8: e71609. Accessed 9 July 2014.

Contrasting patterns of selection across duplicates shaped gene diversity of heat shock proteins in two species of Antarctic krill and their potential to adapt global warming

C. Papot, K. Cascella, J-Y. Toullec and D. Jollivet

CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

A soumettre.

Table des illustrations

Figure 1-1 : Schéma représentant le réchauffement climatique par accumulation de gaz à effet de serre. Le rayonnement solaire reste emprisonné par l'atmosphère (flèche rouge). Est aussi représenté la meilleure capacité de réflexion des rayons lumineux par des surfaces blanches (albédo fort). 7
Figure 1-2 : Système du carbone et des carbonates**.** A : avant l'augmentation massive de la pCO2. B : dans un contexte d'acidification des océans. Les flèches rouges montrent le déplacement de l'équilibre et la diminution de pH induite par l'augmentation des ions H^+. (Noisette, 2014) 9
Figure 1-3 : Représentation du courant circum polaire, schématique (à droite) (Anisimov *et al.*, 2007), et par satellite (à gauche)(source : *earth wind map*) 10
Figure 1-4 : Carte des courants marins froids (bleu) et chauds (rouge) de l'océan Arctique .. 12
Figure 1-5 : Schéma général d'un euphausiacé montrant les caractères morphologiques principaux. (Baker *et al.*, 1990) 13
Figure 1-6 : vue ventrale d'un krill mettant en évidence les photophores à la lumière (à droite) et dans l'obscurité. 14
Figure 1-7 : Cartes montrant la répartition des espèces de krill les plus abondantes. 15
Figure 1-8 : répartition de deux espèces de Krill d'Antarctique (à gauche) et leur morphologie (à droite), *Euphausia superba* et *Euphausia crystallorophias* (Jarman et al., 2000) 17
Figure 1-9 : Répartition de deux espèces de krill d'Arctique (à gauche) et leur morphologie, (à droite) *Meganyctiphanes* norvégica et *Thysanoessa inermis*. 19
Figure 1-10 : Relation hypothétique entre la fitness et la quantité de stress appliquée a un organismes. Lorsque le niveau de stress atteint un certain seuil, l'organisme devient stressé. Le niveau de stress est le produit de la quantité, du temps d'exposition et de la sensibilité des espèces et du stade de vie. (Sørensen & Loeschcke, 2007) 20
Figure 1-11 : Consommation d'oxygène (µmol O2 h-1 g DM-1) en chambre de respiration, avec une saturation en oxygène contrôlée (% saturation) d'*Euphausia superba* (a), *Euphausia mucronata* (b), and *Euphausia pacifica* (de courants chaud : c, et froid: d); moyenne ± erreur standard. (Tremblay, 2014) 23
Figure 1-12 : Activation transcriptionnelle des gènes codant pour les HSP. Les protéines présentent plusieurs états de repliement. Entre la forme native et l'état agrégé, il existe des états intermédiaires comme les structures du type globule fondu. Dans des conditions de choc thermique, la concentration en globules fondus augmente de manière significative. Les globules fondus sont reconnus par Hsc70 et Hsp90, des protéines chaperons résidentes de la cellule non stressée ; le complexe formé entre Hsp90, Hsc70 et les globules fondus est plus stable que celui que formaient dans la cellule non stressée ces Hsp avec le facteur de transcription HSF-1. Celui-ci est alors modifié (phosphorylation, trimérisation) et migre dans le noyau où il interagit avec les motifs HSE (heat shock element) localisés dans les promoteurs des gènes codant pour les *Hsp*. La grande quantité de Hsp produite permet de replier les globules fondus, et d'agir négativement sur HSF-1 (heat shock transcription factor-1) en le maintenant à nouveau inactif dans le cytoplasme, ce qui explique la réversibilité du phénomène. (Arrigo, 2005) 25
Figure 1-13 : Modèle de la limitation thermique et du fonctionnement optimale d'une espèce (Pörtner *et al.*, 2007a) 26
Figure 2-1 : Bathymétrie de la mer Dumont d'Urville et de la côte Adélie. Les zones de pêche approximatives sont représentées par des cercles : *E. superba* (rouge) *E. crystallorophias* (bleu) *C .antarcticus* (violet) (D'après la thèse de L. Hemery, 2011) 32

Figure 2-2 : Détermination de la CT_{50} de *C. antarcticus* (losanges violets) *E. crystallorophias* (triangles bleu) et *E. superba* (ronds rouge) lors d'une incrémentation en température de 1°C/10min. Les points représentent les données expérimentales, et les courbes la tendance théorique. On relève la CT_{50} lorsque 50% des individus perdent leur mobilité lors de l'augmentation de la température. 35
Figure 2-3 : Détermination de la CT_{50} de *T. inermis* lors d'une incrémentation en température de 1°C/10min. Les points représentent les données expérimentales, et la courbe, la tendance théorique. CT_{50} représente la température à laquelle 50% des individus ont perdu leur mobilité..... 38
Figure 2-4 : Détermination de la CT_{50} de *E. superba* lors d'une incrémentation en température de 1°C toutes les 10min (carrés rouges) ; 1°C par jour (triangles verts) et 1°C tous les 3 jours (ronds bleus) . Les points représentent les données expérimentales, et la courbe, la tendance théorique. CT_{50} représente la température à laquelle 50% des individus ont perdu leur mobilité..... 40
Figure 2-5 : Détermination de la CT_{50} de *C. antarcticus* lors d'une incrémentation en température de 1°C toutes les 10min (ronds et ligne pleine bleu) et de 1°C par jour (carrés et ligne pointillée bleus). Les points représentent les données expérimentales, et la courbe, la tendance théorique. CT_{50} représente la température à laquelle 50% des individus ont perdu leur mobilité. 41
Figure 3-1 : Alignement péptitidique (CLC Main Workbench) des isoformes d'*Hsp70* des espèces *E.superba, E. crystallorophias* et *T. inermis* à partir des séquences nucléotidiques obtenues par séquençage direct (Sanger) et séquençage haut-débit du transcriptome (Illuimina). Sont représentés par une coloration des histogrammes de consensus certain motif permettant la caractérisation moléculaire : Les signatures Hsp70 (bleu foncé) ; les motifs attestant de la localisation cytosolique (jaune) ; la signature des Hsp70 mitochondriale (bleu clair) ; les sites de glycolysation (rouge) ; et le signal de translocation nucléaire (gris) 52
Figure 3-2 : Arbre phylogénétique des Hsp70 et Grp78 d'Eucrustacés construit par inférence Bayésienne. Les différentes Hsp70 de krill apparaissent en couleur. 56
Figure 4-1 : Protocole expérimental d'augmentation de la température du milieu sur les trois espèces de Krill, afin d'analyser l'expression des *Hsp70.* La température est augmentée de 3°C et 6°C par rapport a la température où vivent les espèces étudiées (T_{envt}), soit 0°C pour les espèces Antarctiques (*E. superba et E. crystallorophias*) et 4°C pour l'espèces Arctique (*T. inermis*)..... 60
Figure 4-2 : Déroulement d'un cycle de qPCR : (1) Dénaturation à 95°C ; (2) Hybridation à la Tm des amorces (3) Elongation à 72°C (ou 60°C sur LC480 Roche). L'intercalent le SYBR green est emprisonné dans le double brin et émet une fluorescence à chaque cycle. 61
Figure 4-3 : Profil d'amplification lors d'une qPCR. Le « crossing point » (Cp) représente le nombre de cycle auquel la quantité d'amplicon dépasse le seuil du bruit de fond. Celui-ci est déterminé par seconde dérivée maximum. 61
Figure 4-4 *:* Schéma représentant la rétrotranscription, c'est à dire la conversion d'un ARNm en ADN complémentaire grâce a une transcriptase inverse se liant sur la zone poly A de l'ARNm. 65
Figure 4-5 *:* Gamme d'amplification de produit de retro-transcription visant à déterminer l'efficacité d'un couple d'amorce, noté Efficiency. (Courbes obtenues avec le logiciel Light Cycler480 de Roche©)..... 68
Figure 4-6 : Cinétique d'expression des isoformes d'Hsp70 chez *E. crystallorophias* (bleu) et E. superba (rouge) pendant un choc thermique de 3h et 6h à 3°C suivi d'une période de récupération de 6h à 0°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) et les croix (+) indiquent des moyennes

significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn chez respectivement *E. crystallorophias* et *E. superba*. 72
Figure 4-7 *:* Cinétique d'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. crystallorophias* (bleu) et *E. superba* (rouge) pendant un choc thermique de 3h et 6h à 6°C suivi d'une période de récupération de 6h à 0°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) et les croix (+) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn, chez respectivement *E. crystallorophias* et *E. superba.* 78
Figure 4-8 : Cinétique d'expression des isoformes d'Hsp70 chez *T. inermis* pendant un choc thermique de 3h et 6h à 6°C suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn. 83
Figure 4-9 *:* Cinétique d'expression des isoformes d'Hsp70 chez *T. inermis* pendant un choc thermique de 3h et 6h à 10°C suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post hoc de Dunn. 88
Figure 4-10 *:* graphique représentant la consommation en oxygène ($\mu mol.h^{-1}.gMF^{-1}$) de 99
Figure 5-1 : Cinétique de l'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. superba* pendant un choc thermique de 1h et 2h à 3°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post-hoc de Dunn. La figure de ratio d'expression (calculés par rapport au groupe contrôle de chaque expérience) compile les résultats obtenus lors de cette expérience et celle d'un choc de 3h a 3°C (*cf* Partie 4) 105
Figure 5-2 : Cinétiques de l'expression des isoformes d'Hsp70 chez E. superba pendant un choc thermique de 1h et 2h à 6°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post-hoc de Dunn. La figure de ratio d'expression (calculés par rapport au groupe contrôle de chaque expérience) compile les résultats obtenus lors de cette expérience et celle d'un choc de 3h a 6°C (cf Parti 4) 106
Figure 5-3 : Cinétique d'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. superba* pendant un choc thermique de 3h à 9°C et 12°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits. Les étoiles (*) indiquent des moyennes significativement différentes des contrôles après un test de Kruskal-Wallis et un test post-hoc de Tukey. La figure de ratio d'expression (calculés par rapport au groupe contrôle de chaque expérience) compile les résultats obtenus lors de cette expérience et celle d'un choc de 3h à 3°C et 6°C (*cf* Partie 4) 108
Figure 5-4 : Cinétique d'expression des isoformes d'*Hsp70* chez *E. superba* pendant un choc thermique de 6 semaines à 3°C. La MNE (Mean Normalized Expression) représente la concentration relative des transcrits (à gauche). Et ratios des moyennes d'expression par rapport au groupe témoins (0h) pour chaque isoforme (à droite) 111

Tables des tableaux

Table 1 : Pourcentage d'identité entre les séquences peptidiques des différentes isoformes d'Hsp70 de *E. superba, E. crystallorophias* et *T.inermis.* 50
Table 2 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc thermique à 3°C et le groupe contrôle. Le dégradé de orange est fonction de la valeur du ratio d'expression 73
Table 3 : Valeurs d'expressions relative (MNE) des différentes *Hsp70* des groupes témoins 76
Table 4 : Valeurs d'expression des isoformes d'*Hsp70* de *E.crystallorophias* et résultats de blast associés. Comp ID : séquences assemblé avec Trinity. Size (aa) : taille séquences codantes déduites en acide aminée. Size (pb) : taille des séquences assemblées en nombre de paire de base. FPKM : « Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped ». Les valeurs de FPKM par isoforme sont notés en gras. 76
Table 5 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc thermique à 6°C et le groupe contrôle. L'intensité du dégradé orange est fonction de la valeur du ratio d'expression 79
Table 6 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc de 3h et 6h à 6°C thermique suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C et le groupe contrôle. Le dégradé de orange est fonction de la valeur du ratio d'expression 84
Table 7 : Valeurs des ratios d'expression entre chaque groupe soumis à un choc de 3h et 6h à 10°C thermique suivi d'une période de récupération de 6h à 4°C et le groupe contrôle. Le dégradé de orange est fonction de la valeur du ratio d'expression 89

Résumé :

Les zones polaires sont les premières à subir les effets du réchauffement climatique. L'estimation de l'impact physiologique d'une augmentation de température sur les espèces de ces régions est capitale afin de prédire l'évolution des écosystèmes polaires. Les conséquences physiologiques de l'augmentation des températures peuvent affecter les capacités de résistance et de survie des organismes. Le krill constitue un maillon clé des écosystèmes polaires, il est aussi à la base de la chaine trophique de ces régions. Dans ce contexte, une étude comparative de la thermotolérance de trois espèces de krill polaires a été effectuée. Deux espèces d'Antarctique *Euphausia superba* et *Euphausia crystallorophias*, et une espèce d'Arctique, *Thysanoessa inermis*. La détermination de la température limite de tolérance (CT_{50}) a été estimée sur ces 3 espèces. *E. superba* et *T. inermis* présentent des tolérances thermiques similaires, alors que *E. crystallorophias* a une CT_{50} légèrement inférieure. Cinq isoformes d'*Hsp70* ont été caractérisées, pour chaque espèce. Leur expression génique a été suivie au cours d'augmentations de la température du milieu. Le suivi de ces biomarqueurs a permis d'estimer la température limite à laquelle les premiers dommages cellulaires apparaissent. Les cinétiques d'expressions de chaque espèce se sont révélées différentes : une forte réponse *Hsp70* a été observée chez *T. inermis*, alors que chez *E. crystallorophias* celle–ci est beaucoup plus faible. Aux mêmes températures *E .superba* ne développe pas de réponse *Hsp70*, malgré sa forte thermotolérance. La multiplication des expériences de choc thermique sur cette espèce (intensité et durée) n'a pas révélé de réponse *Hsp70*, mais confirmé sa grande thermotolérance pour un organisme antarctique.

Mots clés : réchauffement climatique ; Krill; thermotolérance ; CT_{50} ; Réponse *Hsp70*

Global warming impact on polar krill : thermal tolerance and *Hsp70* response

Abstract :
Polar regions are the first to be impacted by global warming. The physiological impact appraisal of a temperature increase over local species is critical to foresee future evolutions of polar ecosystems. Physiological consequences of temperature rises can affect organisms both in their hardness and survival. Krill stands as a key component for polar ecosystems and therefore constitutes the core diet of local predators. In such context, a thermal tolerance comparative analysis of three distinct polar krill species has been carried out: two Antarctic species *Euphausia superba* and *Euphausia crystallorophias*, and one Arctic species, *Thysanoessa inermis*. The determination of thermal tolerance (CT_{50}) was conducted on these three species. *E. superba* and *T. inermis* analysis showed similar thermal tolerances, while *E. crystallorophias* CT_{50} was slightly lower. Five isoforms of Hsp70 have been characterized for each species. Their gene expression has been monitored through temperature increases of their environment. This biomarkers monitoring allowed an estimation of the critical temperature at which cellular damages appear. Kinetic expressions vary for each species: a strong response was observed in *Hsp70 T. inermis*, whereas response is much lower in *E. crystallorophias*. For similar temperatures, *E .superba* does not provide any *Hsp70* response, despite its high thermal tolerance. The accumulation of heat shock experiments on this species, in intensity and duration, still did not provide any *Hsp70* response, although it confirmed its highly noticeable heat tolerance for an Antarctic organism.

Keywords : Global warming ; Krill ; thermal tolerance ; CT_{50} ; *Hsp70* response