

Mémoire

Auteur : Bellot, Fanny

Promoteur(s) : Thelen, Nicolas; Thiry, Marc

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18612>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège
Département des Sciences de la Vie
Faculté des Sciences
Laboratoire de Biologie Cellulaire et Tissulaire

**Étude de la morphologie ultrastructurale de différentes
espèces de tardigrades lors du passage en cryptobiose**

Sous la direction du Docteur THELEN Nicolas et du Professeur THIRY Marc

Lecteurs : Professeur BAURAIN Denis
 Professeur MICHEL Loïc
 Docteur COMPÈRE Philippe

Mémoire présenté par Bellot Fanny

En vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie Biologie Moléculaire et Cellulaire

Année académique 2022 – 2023

**Étude de la morphologie ultrastructurale de différentes
espèces de tardigrades lors du passage en cryptobiose**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement mon promoteur Nicolas THELEN qui m'a encadrée, aidée, soutenue et motivée tout au long de ce mémoire.

Je voudrais remercier aussi le Professeur Marc THIRY qui m'a permis de réaliser mon mémoire au sein de son laboratoire au Département de Biologie Cellulaire et Tissulaire et qui m'a consacré du temps pour de riches explications.

Outre mes promoteurs, je remercie également les Professeurs Alain VANDERPOORTEN et Nicolas MAGAIN et le Docteur Philippe COMPERE pour leur aide et leur participation à cette étude.

Je remercie également Patricia PISCICELLI pour sa formation et son aide à la réalisation de mes manipulations.

Je remercie le stagiaire de Master 1 Biochimie Biologie Moléculaire et Cellulaire, Florent DUBOIS, pour son aide lors de la réalisation de certaines manipulations.

Mes prochains remerciements s'adressent à ma famille, mes amis, mes proches pour leur soutien durant ces années.

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Tissulaire

Sous la direction du Dr. THELEN Nicolas et du Prof. THIRY Marc

Mémoire présenté par Bellot Fanny

Étude de la morphologie ultrastructurale de différentes espèces de tardigrades lors du passage en cryptobiose

Les tardigrades sont de microscopiques ecdysozoaires faisant partie du clade monophylétique des panarthropodes. Proches des arthropodes et des onychophores, ils forment un embranchement à part entière encore très discuté de nos jours (Von Kennel 1891 in Schill 2018). Ils sont représentés par deux grandes classes ; les eutardigrades et les hétérotardigrades (Arakawa 2022). Ce sont des animaux terrestres, marins et limnoterrestres, présents au sein d'environnements variés à travers le monde. Les tardigrades ont besoin d'un film d'eau pour être actifs (Nelson 2010). Ces animaux extrémophiles sont particulièrement connus pour leur capacité cryptobiotique en formant des « tun » ou tonnelets. En effet, lors de contraintes environnementales, les tardigrades peuvent arrêter leur métabolisme de manière réversible pouvant se maintenir tel quel au cours d'une durée aléatoire et prolongée (Wright 1992 in Schill 2018). Nous avons mis au point une méthode rapide d'isolement et de mise en cryptobiose artificielle de deux espèces de tardigrades, *Ramazzottius oberhaeuseri* et *Milnesium tardigradum*. La morphologie ultrastructurale est comparée entre les individus actifs et en « tun » en microscopie électronique à transmission (TEM). Le contraste entre ces deux états est principalement observé au niveau des différences de tailles et de contenu des cellules de réserves appelées cœlomocytes. La taille des cœlomocytes des individus en « tun » est nettement diminuée par rapport aux actifs chez l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. Concernant *Milnesium tardigradum*, une légère diminution et une grande variabilité de la taille des cœlomocytes des individus en « tun » est observée. Une réduction du nombre de grains de sécrétion est également visible chez les individus en « tun » quelle que soit l'espèce étudiée.

Mots clés : tardigrades – cryptobiose – *Ramazzottius oberhaeuseri* & *Milnesium tardigradum*

Année académique 2022 – 2023

Cellular and Tissue Biology Department

Under the supervision of Dr. THELEN Nicolas and Prof. THIRY Marc

Submitted by Bellot Fanny

Study of the ultrastructural morphology of different tardigrade species during the transition to cryptobiosis

Tardigrades are microscopic ecdysozoans belonging to the monophyletic panarthropod clade. Closely related to arthropods and onychophores, they form a phylum in their own right that is still much debated today (Von Kennel 1891 in Schill 2018). They are represented by two major classes: eutardigrades and heterotardigrades (Arakawa 2022). They are terrestrial, marine and limnoterrestrial animals, found in a variety of environments around the world. Tardigrades require a film of water to be active (Nelson 2010). These extremophilic animals are particularly well known for their cryptobiotic ability to form "tun", similar to barrels. Indeed, under environmental stress, tardigrades can reversibly shut down their metabolism and remain as such for random and prolonged periods (Wright 1992 in Schill 2018). We have developed a rapid method for the isolation and artificial cryptobiosis of two tardigrade species, *Ramazzottius oberhaeuseri* and *Milnesium tardigradum*. Ultrastructural morphology is compared between active and "tun" individuals using transmission electron microscopy (TEM). The contrast between these two states is mainly observed in the differences in size and content of the reserve cells called coelomocytes. In *Ramazzottius oberhaeuseri*, the coelomocytes of individuals in "tun" are significantly smaller than those of active individuals. In the case of *Milnesium tardigradum*, there was a slight reduction in coelomocyte size in tuned individuals, with considerable variability. A reduction in the number of secretion grains was also observed in tuned individuals, regardless of species.

Key words : tardigrades – cryptobiosis – *Ramazzottius oberhaeuseri* & *Milnesium tardigradum*

Academic year 2022 – 2023

TABLE DES MATIERES

1. Introduction.....	1
1.1. Tardigrades	1
1.2. Cryptobiose.....	5
1.3. Objectifs.....	8
2. Matériel et méthodes.....	9
2.1. Récolte et isolement.....	9
2.2. Détermination des espèces.....	10
2.3. Mise en cryptobiose.....	11
2.4. Microscopie électronique à transmission (TEM) et photonique	12
2.4.1. Préparation des échantillons	12
2.4.2. Observation des échantillons	14
3. Résultats.....	15
3.1. Identification des espèces	15
3.1.1. Hétérotardigrades	15
3.1.2. Eutardigrades.....	17
3.2. Expérience de mise en cryptobiose	23
3.3. Observation de l'ultrastructure	24
3.3.1. <i>Ramazzottius oberhaeuseri</i>	25
3.3.2. <i>Milnesium tardigradum</i>	29
3.3.3. Etude quantitative préliminaire sur les coelomocytes	32
4. Discussion.....	34
4.1. Résultats de la mise en cryptobiose artificielle	34
4.2. Résultats des observations ultrastructurales	35
5. Perspectives	36
5.1. Culture en laboratoire	36
5.2. Identification des espèces par séquençage.....	36
5.3. Amélioration de la préparation des échantillons pour la TEM.....	37
5.4. Protéomique.....	37
5.5. Intérêt médical, pharmaceutique, alimentaire et biotechnologique.....	38
6. Bibliographie	34

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1** : Phylogénie des tardigrades (repris de <https://urlz.fr/mfNc>). 2
- Figure 2** : Schéma de l'anatomie interne des tardigrades (repris de <https://urlz.fr/nl84>). 3
- Figure 3** : Passage d'un tardigrade de l'état actif (gauche) à l'état déshydraté en forme de "tun" (droite) et vice versa. Images obtenues en microscopie électronique à balayage (Arakawa 2022)..... 7
- Figure 4** : Représentation de l'expérience d'isolement des tardigrades par la méthode du shaker aux dimensions d'un Falcon de 50 ml. Avec en **A**) : le filtre imprimé en 3D, en **B**) : le filtre contenant l'échantillon de mousse ou de lichen dans le Falcon et en **C**) : le culot obtenu après agitation et centrifugation dans lequel les tardigrades sont recherchés (images prises par Fanny Bellot)..... 10
- Figure 5** : Caractéristiques morphologiques du genre d'hétérotardigrade, *Eschiniscus*. Images obtenues au microscope photonique. En **A**) description du corps entier et en **B**) vue à plus fort grossissement sur la première moitié du corps..... 16
- Figure 6** : Caractéristiques morphologiques de l'espèce d'eutardigrade, *Ramazzottius oberhaeuseri*. Images obtenues au microscope photonique. En **A**) description du corps entier, en **B**) un seul œuf de cette espèce et en **C**) formation de « tun » par contraction de l'axe antéro-postérieur de l'ensemble du corps. 19
- Figure 7** : Caractéristiques morphologiques de l'espèce d'eutardigrade, *Milnesium tardigradum*. Images obtenues au microscope photonique. En **A**) description du corps entier et en **B**) dix œufs dans l'exuvie de cette espèce. 20
- Figure 8** : Caractéristiques morphologiques d'un des deux genres d'eutardigrade, *Macrobotus/Mesobotus*. Images obtenues au microscope photonique. En **A**) description du corps entier et en **B**) un seul œuf de cette espèce..... 21
- Figure 9** : Coupe semi-fine au niveau de l'appareil digestif d'un individu de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. **c** : cuticule, **co** : cœlomocyte, **go** : gonade, **it** : intestin et **ph** : pharynx..... 25
- Figure 10** : Coupe ultra-fine au niveau de l'appareil digestif d'un individu de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. Cette coupe est en correspondance avec la coupe semi-fine de figure 9. Les deux encadrés supérieurs représentent un zoom des organes majeurs du l'appareil digestif. **c** : cuticule, **co** : cœlomocyte, **go** : gonade, **it** : intestin, **l** : lumière, **m** : muscle, **mp** : macroplacoïde, **mv** : microvillosité et **ph** : pharynx. 26

- Figure 11** : Coupe ultra-fine au niveau de la cuticule d'un individu actif de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. L'encadré supérieur est un schéma repris de la littérature illustrant les différentes couches de la cuticule observées chez cette espèce (Czernekova 2021). **ct** : couche trilaminaire, **ei** : épicuticule interne, **ex** : épicuticule externe, **ic** : intracuticule et **p** : procuticule. 27
- Figure 12** : Coupes ultra-fines au niveau des cellules de réserves ou cœlomocytes de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. En **A**) Représentation d'un cœlomocyte au sein d'un individu actif et en **B**) Représentation d'un coelomocyte au sein d'un individu en « tun ». **gs** : grains de sécrétion, **n** : noyau et **nu** : nucléole. 28
- Figure 13** : Coupes ultra-fines de différentes sections de l'appareil digestif de l'espèce *Milnesium tardigradum*. En **A**) le tube buccal, en **B**) le pharynx et en **C**) l'intestin. **c** : cuticule, **gs** : glande à stylet, **l** : lumière, **m** : muscle, **mv** : microvillosité et **s** : septulum. 29
- Figure 14** : Coupe ultra-fine au niveau de la cuticule d'un individu actif de l'espèce *Milnesium tardigradum*. L'encadré supérieur est un schéma repris de la littérature illustrant les différentes couches de la cuticule observées chez cette espèce (Czernekova 2021). **ct** : couche trilaminaire, **ei** : épicuticule interne, **ex** : épicuticule externe, **ic** : intracuticule et **p** : procuticule. 30
- Figure 15** : Coupes ultra-fines au niveau des cellules de réserves ou cœlomocytes de l'espèce *Milnesium tardigradum*. En **A**) Représentation d'un cœlomocyte au sein d'un individu actif et en **B**) Représentation d'un coelomocyte au sein d'un individu en « tun ». **gs** : grains de sécrétion, **m** : mitochondrie, **n** : noyau et **nu** : nucléole..... 31
- Figure 16** : Graphique de comparaison de l'aire des cœlomocytes entre l'état actif et anhydrobiotique au sein des deux espèces.....32
- Figure 17** : Graphique de comparaison du nombre de grains de sécrétion des cœlomocytes entre l'état actif et anhydrobiotique au sein des deux espèces.....33

Tableau 1 : Représentation des différentes familles et espèces de lichens obtenues aux différents points géographiques. Identification des espèces par le Professeur Nicolas Magain.	9
Tableau 2 : Représentation des différentes familles et espèces de mousses obtenues à un point géographique. Identification des espèces par le Professeur Alain Vanderpoorten.	9
Tableau 3 : Représentation des différents sels accompagnés du pourcentage d'humidité relative (% HR) correspondant (Laboratoire de lutte biologique UQÀM d'Eric Lucas 2017).	12
Tableau 4 : Résumé des caractéristiques de chacune des quatre espèces de tardigrades (images provenant de Bingemer 2017).	22
Tableau 5 : Résultats de réveils suite aux différentes conditions de mise en cryptobiose artificielle.	24

LISTE DES ABREVIATIONS

Å : angström.

°C : degré centigrade.

µm : micromètre.

ADN : acide désoxyribonucléique.

COI : sous-unité I de la cytochrome oxydase c.

h : heure.

HR : humidité relative.

kV : kilovolt.

LEA : embryogenèse tardive abondante.

min : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

mM : millimolaire.

nm : nanomètre.

o/n : toute la nuit.

pb : paire de bases.

PCR : réaction de polymérisation en chaîne.

PSM : poste de sécurité microbiologique.

TDP : protéine intrinsèquement désordonnée des tardigrades.

TEM : microscope/microscopie électronique à transmission.

1. Introduction

1.1. Tardigrades

Les tardigrades sont présents sur Terre depuis plusieurs millions d'années. Ce n'est qu'en 1773 que Johann August Ephraim Goeze a publié une première description de ceux-ci (Greven 2015). Les fossiles de tardigrades sont extrêmement rares, le plus ancien fossile présumé se trouve dans des roches du Cambrien moyen (- 497 à - 504 millions d'années) en Sibérie et partage plusieurs similitudes avec les tardigrades récents (Maas 2001 in Schill 2018). Leur nom émane du latin signifiant « marcheur lent ». Les tardigrades sont communément appelés « oursins d'eau », ils ont besoin d'un film d'eau pour être actifs. Étant probablement d'origine marine, ces animaux proviennent d'environnements variés à travers le monde, allant de l'Arctique à l'Antarctique, des déserts aux calottes glaciaires du Groenland, des forêts à la toundra, des sommets montagneux aux vallées. Plus de 1500 espèces ont été recensées dans des micro-habitats terrestres, marins et d'eau douce (Arakawa 2022). La majorité des espèces décrites dans nos sols européens sont retrouvées dans divers lichens et mousses (Nelson 2010). En fonction de leurs micro-habitats spécifiques, des différentes espèces et des stades de développement au sein d'une même espèce, la source de nourriture est très variable (Nelson 2020).

Leur place exacte dans le monde animal est encore très controversée. Ils forment un embranchement à part entière dans le règne animal, avec les arthropodes et les onychophores. Ils représentent à eux trois le clade monophylétique des panarthropodes (**Figure 1**). Les tardigrades peuvent être subdivisés en deux grandes classes : les *Eutardigrada* et les *Heterotardigrada*. Chacune de ces deux classes sont composées de deux ordres : *Apochela* et *Parachela* pour les eutardigrades et *Arthrotardigrada* et *Echiniscoidea* pour les hétérotardigrades (Von Kennel 1891 in Schill 2018). Ces derniers sont le plus souvent retrouvés dans les milieux marins, tandis que les eutardigrades sont d'ordinaire retrouvés dans les milieux terrestres et limnoterrestres, bien qu'il existe quelques exceptions (Nelson 2010). L'identification des différentes espèces de tardigrades repose sur des traits morphologiques et morphométriques particuliers appuyés par des méthodes moléculaires.

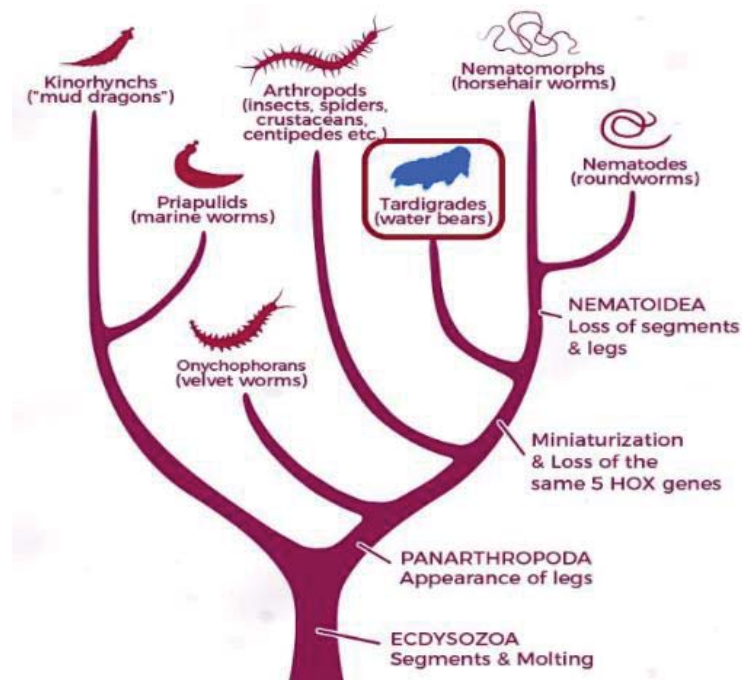


Figure 2 : Phylogénie des tardigrades (repris de <https://urlz.fr/mfNc>).

Ces animaux microscopiques mesurent entre 50 et 1200 μm . Leur corps est segmenté et présente une symétrie bilatérale. La partie céphalique comprend des appendices sensoriels ainsi qu'un système nerveux. Selon les espèces, il peut y avoir présence ou non de structures péribuccales et/ou de deux yeux simples à cupule pigmentaire. La partie plus centrale comprend trois paires de pattes servant à la locomotion et chaque patte est munie de griffes. La partie caudale comprend la quatrième paire de pattes assurant l'accrochage au substrat mais sur ces dernières, certaines espèces ne possèdent pas de griffe (Bingemer 2017). L'entièreté du corps mais aussi les organes internes de l'appareil digestif sont recouverts par un tégument perméable. Ce dernier étant composé d'une cuticule divisée en trois couches, d'un épiderme sous-jacent qui sécrète cette cuticule et d'une mince membrane basale collagénique. En allant de l'extérieur vers l'intérieur la cuticule est ordonnée comme suit ; l'épicuticule externe et interne suivies de l'intracuticule et enfin de la procuticule. L'épicuticule est principalement composée de polysaccharides et de protéines. L'intracuticule quant à elle contient des glycoprotéines et des lipides. La chitine est le composant principal de la procuticule lui conférant résistance et souplesse (Wright juillet 1988). Une grande variation est observée dans la structure, l'épaisseur et l'ornementation de cette cuticule entre mais aussi au sein des différentes lignées évolutives, ainsi qu'entre la face dorsale et ventrale des espèces individuelles (Bingemer 2017). Ce tégument délimite la cavité corporelle remplie d'un fluide dans lequel les nutriments, les gaz, les électrolytes, l'eau et les cellules de stockage appelées cœlomocytes circulent (Halberg 2012

in Schill 2018). La taille de ces cœlomocytes est positivement corrélée à la quantité de réserves nutritives accumulées. Ces réserves sont constituées de polysaccharides et de lipides (Marcus 1929). C'est également dans ce fluide que baigne les organes internes tels que le tube buccal, le pharynx, l'œsophage, l'intestin mais aussi toutes sortes de glandes telles que les glandes à griffes et les glandes salivaires. Le tube buccal attenant à la bouche peut être court ou long, rigide ou flexible en fonction des espèces (Bingemer 2017). Proche de ces organes, il peut y avoir deux stylets qui permettent la perforation des aliments au niveau de la bouche (Dewel 1973). Le pharynx quant à lui est très musculueux ce qui pourrait aider certaines espèces à exercer le phénomène de succion pour se nourrir. Également selon les différentes espèces, il peut exister au centre du pharynx des placoïdes (macroplacoïde et/ou microplacoïde) qui sont des épaissements cuticulaires sur lesquels viennent se fixer les muscles de ce pharynx (Eibye 2001). Les muscles somatiques traversent tout le corps des tardigrades en se fixant à la cuticule. La contraction de ces muscles additionnée à l'afflux constant de fluide dans la cavité corporelle participent à l'activité locomotrice (Halberg 2013 in Schill 2018). La partie caudale des tardigrades comporte un orifice excrétoire défini comme un anus ou un cloaque (Dewel 1979) (**Figure 2**). Certaines espèces possèdent ou acquièrent une coloration spécifique provenant soit de la cuticule, soit de l'appareil digestif ou soit des cellules de réserves (Nelson 2010).

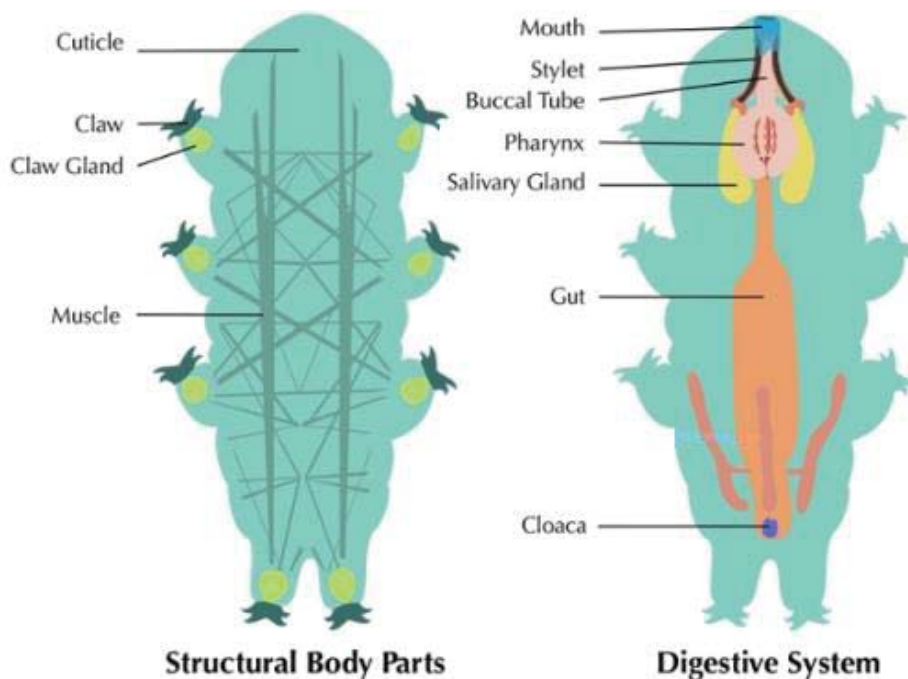


Figure 3 : Schéma de l'anatomie interne des tardigrades (repris de <https://urlz.fr/nl84>).

En ce qui concerne la sexualité, les tardigrades peuvent être gonochoriques ou hermaphrodites. Le dimorphisme sexuel est basé sur des critères très délicats tels que les mâles matures légèrement plus petits que les femelles matures, les appendices céphaliques qui peuvent être plus grandes chez les mâles que chez les femelles, certains mâles matures qui possèdent une griffe basale modifiée en forme de crochet ou certaines femelles matures possèdent des griffes modifiées plus petites sur les pattes postérieures afin de ne pas endommager la ponte de leurs œufs. Les tardigrades exploitent plusieurs modes de reproduction ; l'amphimixie, l'autofécondation et la parthénogenèse. Ces modes sont souvent en étroite relation avec l'environnement colonisé (Bertolani 2001 in Schill 2018). Leur reproduction se fait uniquement au moyen de gamètes, par le biais d'œufs fécondés ou non. En fonction des espèces, les œufs ont une apparence ornée ou plutôt lisse, ils peuvent être de coloration différente et ils sont soit pondus dans l'exuvie, soit pondus librement dans le substrat (Bertolani 1992 in Schill 2018). Ces descriptions nettement générales permettent de mieux apprivoiser cet être vivant longuement négligé.

Les tardigrades sont des ecdysozoaires caractérisés par une mue régulière de leur cuticule du tégument mais aussi de la cuticule qui tapisse les organes internes et les griffes. La mue est un processus aidant à leur développement, cependant ce mécanisme nécessite un coût énergétique important (Schill 2018). Ce phénomène de mue est le point de départ de l'évolution de deux principes de dormance, à savoir la diapause et la cryptobiose. La diapause est une succession de phases de transformations morphologiques profondes suite à une réponse facultative aux changements environnementaux, néanmoins elle peut aussi être un élément obligatoire du cycle de vie. Lors de cette diapause, il y a une suspension de la croissance et du développement, accompagnée d'une réduction de l'activité métabolique, ce qui est alors associé à des mues non conventionnelles (Guidetti 2011). La cryptobiose quant à elle, est un phénomène de résistance aux conditions environnementales stressantes. Tant au commencement de la diapause que de la cryptobiose, les tardigrades contractent leur corps longitudinalement et réduisent progressivement leurs mouvements (Halberg 2013). Certains tardigrades peuvent entrer dans ces deux formes de dormance, toutefois ces deux phénomènes sont indépendants. L'apparition simultanée de plusieurs stratégies adaptatives chez les tardigrades a largement accru la résistance de ces animaux énigmatiques à des conditions environnementales extrêmes (épuisement des réserves, altération du pH, stress osmotique, variations de températures, diminution du taux d'humidité relative, etc.) (Guidetti 2011).

1.2. Cryptobiose

La cryptobiose est décrite comme étant un arrêt réversible du métabolisme déclenché par des conditions environnementales défavorables. Cet état de vie suspendu peut se maintenir tel quel pour une durée aléatoire et prolongée tout en conservant cette résistance à de nombreux stress abiotiques tels que la dessiccation, les radiations, les fortes variations de températures, de pressions, etc. Une fois la disparition des contraintes écologiques, l'organisme est capable de retrouver la cohérence de ses processus vitaux et ce, tant qu'il n'y a pas eu d'entraves extérieures (Wright 1992 in Schill, 2018). Des contraintes environnementales peuvent ainsi induire les bactéries, protistes, champignons, végétaux et animaux à se mettre en état cryptobiotique notamment comme certains tardigrades, rotifères, nématodes, crustacés et insectes. La cryptobiose n'est pas plésiomorphe mais plutôt une apomorphie de certaines lignées évolutives (Guidetti 2011). Les avantages sélectifs de la cryptobiose sont multiples : elle permet l'utilisation de nouvelles niches écologiques, la présence simultanée d'individus de différentes générations protégeant ainsi une partie du patrimoine génétique, d'échapper à temps aux conditions d'habitats hostiles à la vie active, de réduire l'impact de la sélection naturelle ou de la dérive génétique tout en conservant la diversité génétique et de réduire les concurrents, prédateurs et parasites (Ellner 1994). Il existe différents modes de cryptobiose dont cinq sont décrits ci-dessous :

- l'anhydrobiose, qui est un stress hydrique suite à une baisse drastique de l'eau environnante ;
- l'anoxybiose, qui est un stress anoxique suite à une diminution du taux d'oxygène ;
- la chimiobiose, qui est un stress chimique suite à de hauts taux de toxines environnementales ;
- la cryobiose, qui est un stress thermique suite à une importante baisse de la température externe ;
- l'osmobiose, qui est un stress osmotique suite à la décroissance du potentiel hydrique.

Dans les environnements terrestres, la disponibilité en eau est l'un des facteurs écologiques les plus importants. La présence d'eau permet aux organismes de maintenir leur homéostasie et leur métabolisme intracellulaire, mais les rend sensibles aux effets des changements environnementaux (Arakawa 2022). Comme mentionné plus haut, les tardigrades ont besoin d'un film d'eau pour être actifs. Une fois l'évaporation de l'eau environnante, les tardigrades rentrent alors en anhydrobiose. C'est un état amétabolique accompagné d'une perte

quasi-totale par évaporation d'eau libre et liée (95 %) (Halberg 2013 in Schill 2018). Antonie van Leeuwenhoek a décrit pour la première fois le phénomène de l'anhydrobiose en 1702 et l'application aux tardigrades a été établie quelques années plus tard (Tunnacliffe 2003). En réponse à cette déshydratation, les tardigrades vont présenter une contraction importante le long de l'axe antéro-postérieur formant ainsi un « tun » ou tonnelet immobile (**Figure 3**). Sous cette forme de « tun », les tardigrades sont très résistants aux facteurs environnementaux extrêmes (Jönsson 2008). Tous les eutardigrades peuvent entrer en état anhydrobiotique contrairement aux hétérotardigrades où seules les espèces appartenant à l'ordre *Echiniscoididae* ont cette capacité (Nelson 2010). Ce mécanisme de résistance n'est pas un phénomène cyclomorphique, il peut avoir lieu à n'importe quel stade de leur vie. Seuls les tardigrades terrestres et limnoterrestres ont cette capacité de survie (Guidetti 2011). Une gamme complexe de facteurs agissant comme bioprotecteurs au niveau moléculaire, physiologique et structurel sont mis en place afin de résister à cette déshydratation. Ces bioprotecteurs peuvent interagir directement avec les structures macromoléculaires telles que les membranes, l'ADN et les protéines, ou agir comme des osmolytes en cas de stress osmotique ou de déshydratation. Certains invertébrés cryptobiotiques accumulent le tréhalose pendant la dessiccation. Celui-ci étant un disaccharide qui se vitrifie afin d'empêcher la fusion des membranes, la dénaturation et l'agrégation des protéines. Cependant, seulement certains tardigrades accumulent un très faible taux de tréhalose durant l'anhydrobiose. Ce qui laisse suggérer que l'accumulation de tréhalose ne représente pas l'unique mécanisme de protection contre la déshydratation (Boothby 2017). Compte tenu de l'évolution des outils génomiques et bioinformatiques, des données sur les séquences de certains tardigrades ont révélé l'existence de protéines thermosolubles intrinsèquement non structurées (TDP), c'est-à-dire qu'elles ne se dénaturent pas lors de stress abiotiques et qu'elles sont dépourvues de structure tertiaire persistante. L'expression de ces protéines serait considérablement augmentée durant l'anhydrobiose. Elles auraient des propriétés semblables aux protéines LEA (late embryogenesis abundant). Ces protéines formeraient des solides amorphes avec un état vitrifié lors de la dessiccation (Møbjerg 2020). Au regard de ces découvertes, la connaissance des voies de signalisation régissant la stabilité de l'architecture cellulaire et de la machinerie métabolique pendant la déshydratation est encore fragmentaire et mal comprise. Malgré leur impressionnante résistance, cette étape d'anhydrobiose reste délicate pour les tardigrades. Tout d'abord, les phases initiales et finales de l'anhydrobiose sont cruciales pour le succès du processus. Il a été démontré que le temps dont disposent les animaux pour effectuer de manière coordonnée les étapes morphologiques, physiologiques et biochimiques nécessaires lors de la dessiccation et de la réhydratation varie fortement en

fonctions des espèces. Cet ensemble d'adaptations se produit vraisemblablement en cascade et la mise en œuvre correcte de chaque étape est directement liée au niveau de disponibilité en eau (Boothby 2018). Ensuite, la survie et la quantité de dommages moléculaires accumulés après un évènement anhydrobiotique sont directement liées au temps passé dans cet état, aux paramètres abiotiques environnementaux auxquels les animaux sont maintenus pendant cet état et les conditions abiotiques et biotiques présentes durant les phases initiales ou finales de cette anhydrobiose. Même si la dessiccation ne semble pas avoir d'effet sur le vieillissement et la longévité des tardigrades, les dommages s'accroissent proportionnellement au temps passé au sec. Il y a également un lien entre le temps passé en anhydrobiose et le temps nécessaire aux tardigrades pour retrouver leur vie active. Ce temps de récupération peut donc être associé aux activités métaboliques nécessaires pour réparer les dommages de cette déshydratation (Guidetti 2011). Enfin, les conditions du micro-habitat influencent fortement les phases anhydrobiotiques, réduisant ou augmentant les taux de dessiccation chez les tardigrades. Toutes ces constatations soulignent l'importance des transformations morphologiques et physiologiques survenant dans l'évolution des stades de repos des tardigrades (Arakawa 2022).

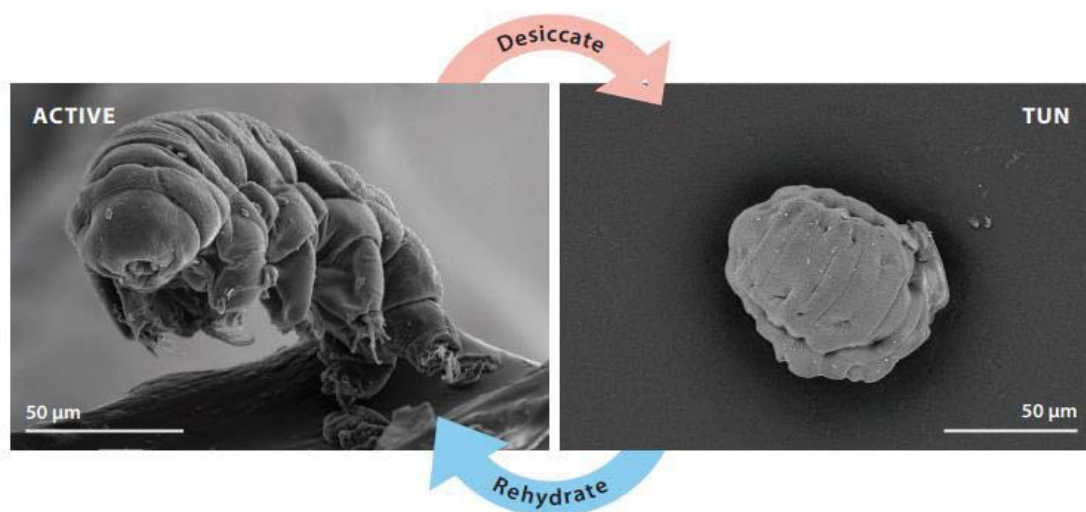


Figure 4 : Passage d'un tardigrade de l'état actif (gauche) à l'état déshydraté en forme de "tun" (droite) et vice versa. Images obtenues en microscopie électronique à balayage (Arakawa 2022).

1.3. Objectifs

L'objectif principal de ce mémoire est d'étudier la morphologie ultrastructurale de différentes espèces de tardigrades lorsque ceux-ci sont actifs et lorsqu'ils sont en condition de stress formant ainsi des « tun » suite à une déshydratation. La morphologie ultrastructurale est-elle différente entre leur état actif et lorsqu'ils sont déshydratés ? Afin d'essayer de répondre à cette question, nous avons isolé ces différentes espèces, celles-ci ont été déshydratées artificiellement à l'aide de différents sels à saturation afin d'obtenir progressivement une humidité relative (HR) déterminée. Une fois l'obtention de tardigrades en forme de « tun » et de tardigrades actifs, ceux-ci sont préparés dans le but de pouvoir observer les différences ultrastructurales entre l'état actif et la dormance au microscope électronique à transmission (TEM).

2. Matériel et méthodes

2.1. Récolte et isolement

Parmi nos régions européennes, les tardigrades sont notamment retrouvés au sein de spécimens de mousses et de lichens différents représentés ci-dessous (**Tableaux 1 et 2**). Principalement en février et en mai, ces mousses et lichens ont été récoltés sur des bois morts en parc et forêt dans la Province de Liège. Ceux-ci ont été conservés dans une pièce intérieure à température ambiante aux environs de 20 °C et avec une HR aux alentours de 50 %.

Tableau 1 : Représentation des différentes familles et espèces de lichens obtenues aux différents points géographiques. Identification des espèces par le Professeur Nicolas Magain.

Localisations	Familles et espèces de lichens
50.621861,5.564515 (Boulevard Gustave Kleyer, Cointe)	<i>Parmeliaceae – Flavoparmelia caperata</i>
	<i>Parmeliaceae – Parmelia sulcata</i>
	<i>Parmeliaceae – Parmotrema perlatum</i>
50.583547,5.590063 (Chemin de Château, Tilff)	<i>Physciaceae – Physconia perisidiosa</i>
	<i>Parmeliaceae – Punctelia subrudecta</i>

Tableau 2 : Représentation des différentes familles et espèces de mousses obtenues à un point géographique. Identification des espèces par le Professeur Alain Vanderpoorten.

Localisation	Famille et espèces de mousses
50.583547,5.590063 (Chemin de Château, Tilff)	<i>Brachytheciaceae – Brachythecium rutabulum</i>
	<i>Brachytheciaceae – Brachythecium salebrosum</i>
	<i>Hypnaceae – Hypnum cupressiforme</i>
	<i>Brachytheciaceae – Kindbergia praelonga</i>

Après la récolte des différentes espèces de mousses et de lichens, ces spécimens ont été placés séparément dans un nouveau dispositif mis en place par nos soins. Il s'agit d'un système de shaker où un filtre imprimé en 3D a été conçu aux dimensions d'un Falcon de 50 ml. Le filtre possède plusieurs fentes de 0,7 mm de large sur 1 cm de long (**Figure 4 A**). Le dispositif de filtration est d'abord placé dans le Falcon, il s'en suit des échantillons de mousses ou de lichens et le tout recouvert d'eau de ville (**Figure 4 B**). Le Falcon avec ses constituants est refermé et secoué vigoureusement quelques minutes, pour ensuite être centrifugé. Le culot

récupéré est constitué d'eau, d'une méiofaune capable de traverser le filtre et de quelques débris venant des mousses ou des lichens. Ce mélange est transvasé dans une boîte de Pétri afin d'être observé au binoculaire (Nikon SMZ445 C-LEDS). La recherche de tardigrades est l'étape limitante de cette manipulation, sachant que tout ce qui a été récupéré dans le culot a une dimension égale ou inférieure à la dimension des fentes du filtre (**Figure 4 C**). Dès qu'un tardigrade est repéré, il est isolé à l'aide d'une micropipette et placé dans une autre boîte de Pétri contenant du milieu Chalkley composé de 1,7 mM de NaCl, 0,054 mM de KCl et 0,054 mM de CaCl₂ adapté de « Chalkley's Medium Plus Soil Extract », 2018. Les tardigrades ne sont pas conservés dans ce milieu plus de 24 h.

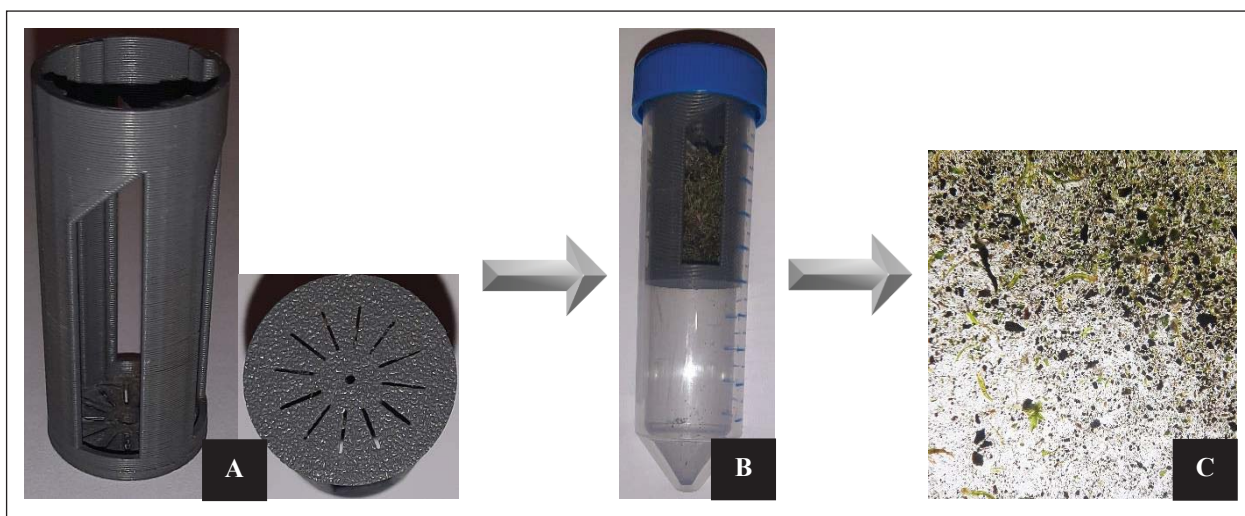


Figure 5 : Représentation de l'expérience d'isolement des tardigrades par la méthode du shaker aux dimensions d'un Falcon de 50 ml. Avec en **A**) : le filtre imprimé en 3D, en **B**) : le filtre contenant l'échantillon de mousse ou de lichen dans le Falcon et en **C**) : le culot obtenu après agitation et centrifugation dans lequel les tardigrades sont recherchés (images prises par Fanny Bellot).

2.2. Détermination des espèces

Les tardigrades récoltés et isolés aux différentes localisations ont été soumis à la clé de détermination datant de 2017 de Jana Bingemer et Karin Hohberg. Cette clé se base exclusivement sur les tardigrades répertoriés sur nos sols européens, c'est-à-dire principalement les eutardigrades. Afin de tenter d'identifier les différentes espèces, il faut se baser sur cinq critères morphologiques :

- la taille du corps à l'âge adulte ;
- la coloration de la cuticule, de l'appareil digestif ou des cœlomocytes ;
- la forme et l'orientation des griffes, ainsi que la présence de structures particulières ;

- la structure et la disposition des organes de l'appareil digestif (tube buccal, pharynx, stylets, placoïdes, etc.) ;
- la présence et la disposition des ornements à la surface des œufs.

Au binoculaire (Nikon SMZ445 C-LEDS), seule la coloration peut être observable. Le microscope photonique (Nikon ECLIPSE Ci-L) permet quant à lui d'observer les détails au niveau des griffes et de l'appareil digestif. En ce qui concerne les œufs, la ponte dans l'exuvie ou librement dans le substrat donne déjà une information sur le genre voire l'espèce. Mais c'est seulement au TEM (JEOL 1400) que les détails sur l'ornementation pourront donner des informations précises sur l'espèce. Cependant, malgré cette clé d'identification assez détaillée, il est parfois difficile de déterminer précisément le genre et surtout l'espèce des tardigrades observés.

2.3. Mise en cryptobiose

Pour la réalisation de cette expérience, la cryptobiose et plus précisément l'anhydrobiose est induite artificiellement par l'intermédiaire de différents sels à saturation (**Tableau 3**). Le but étant de mettre en place la dessiccation des échantillons en diminuant graduellement ou drastiquement le taux d'HR de l'air ambiant. Les échantillons dans leur contenant sont placés au sein d'une enceinte hermétique fermée avec un récipient qui contient un des sels à saturation et en plus un récipient de sable humidifié. Ceci permet un maintien constant de la température et de l'HR testée à l'intérieur de cette enceinte. La dessiccation au pourcentage d'HR désiré est réalisée par palier de 24 h (Wexler 1954). Après ces 24 h et avant de commencer une nouvelle manipulation, il y a toujours une vérification de la mise en « tun » des tardigrades. Pour assurer la validité de cette expérience le pourcentage d'HR et la température dans l'enceinte ont été mesurés grâce à un hygromètre/thermomètre (Honeywell HHY70E).

L'expérience se déroule comme suit ; une fois les tardigrades isolés dans le milieu Chalkley, ils sont transférés dans des Eppendorfs. Ce milieu liquide est retiré à l'aide d'une micropipette afin qu'il en reste le moins possible pour faciliter la dessiccation. Les Eppendorfs sont placés au-dessus d'un portoir et les deux récipients contenant un des sels à saturation et le sable humide se trouvent en-dessous. Le tout installé dans une boîte hermétique en frigolite. Chaque sel a été testé seul pendant 24 h et également en combinaison les uns à la suite des autres par des paliers de 24 h chacun. Après chacune des conditions testées, nous procédons

toujours à un contrôle morphologique de la mise en « tun ». Par la suite, les tardigrades sont réveillés avec quelques gouttes d'eau de ville dans le but d'observer un retour d'activité. Si les tardigrades se mettent à bouger, alors le processus d'anhydrobiose a été correctement mis en place, si ce n'est pas le cas alors on considère la mort de l'animal après une semaine sans mouvement. Pour chaque condition réalisée, des tripliqués de dix individus ont été testés.

Tableau 3 : Représentation des différents sels accompagnés du pourcentage d'humidité relative (% HR) correspondant (Laboratoire de lutte biologique UQÀM d'Eric Lucas 2017).

Sels	Pourcentage d'humidité relative (HR)
Chlorure de potassium KCl	86 %
Chlorure de sodium NaCl	76 %
Bicarbonate de sodium NaHCO ₃	55 %
Chlorure de magnésium MgCl ₂	33 %

Pour la préparation des échantillons à observer au TEM, nous avons besoin de tardigrades actifs et en état anhydrobiotique. Ces « tun » sont obtenus en plaçant les tardigrades comme mentionné plus haut, c'est-à-dire dans des Eppendorfs avec le moins de milieu Chalkley possible au sein d'une enceinte hermétique fermée. Ils seront d'abord en présence de NaCl à saturation pendant 24 h, suivi de NaHCO₃ à saturation pendant 24 h également.

2.4. Microscopie électronique à transmission (TEM) et photonique

2.4.1. Préparation des échantillons

Les tardigrades actifs isolés la veille et les tardigrades formant des « tun » de la mise en cryptobiose artificielle sont fixés. En travaillant sous le poste de sécurité microbiologique (PSM) et sur glace, les échantillons sont placés en séparant la forme active de la forme dormante dans des tubes à essai en verre. Quelques gouttes du fixateur composé de 2,5 % de glutaraldéhyde (Ladd) dans de l'acétone sont placées dans chaque tube pendant 2 h. Le maximum du fixateur est retiré en limitant les pertes d'échantillons. Les rinçages suivants sont effectués successivement : 75 % d'acétone pour 25 % d'eau pure, 50 % d'acétone pour 50 % d'eau pure, 25 % d'acétone pour 75 % d'eau pure et enfin deux derniers bains dans 100 % d'eau pure, chaque bain dure 10 min. Toujours sous le PSM et sur glace, placer quelques gouttes dans

chaque tube pendant 1 h de 4 % de tétroxyde d'osmium (OsO_4) (Sigma Aldrich) dans de l'eau pure. Eventuellement une fois le dernier bain de rinçage à l'eau pure effectué, les échantillons peuvent être inclus dans de l'agar 3 %. Cette étape n'est pas obligatoire mais elle permet une manipulation plus aisée avec une diminution du risque de perte des échantillons de petite taille. Un maximum d'osmium est retiré dans chaque tube pour effectuer par la suite quatre rinçages successifs de 10 min chacun avec de l'eau pure. Quelques gouttes d'éthanol 70 % sont placées dans chaque tube pendant minimum 15 min en répétant cette opération une deuxième fois (c'est à cette étape que les échantillons peuvent être laissés à 4 °C plusieurs heures en veillant à ce que tous les tubes soient bien fermés). L'éthanol est retiré de chaque tube. L'expérience se poursuit à température ambiante, en plaçant dans chaque tube quelques gouttes d'éthanol 96 % durant 10 min. Par la suite cet éthanol est retiré en faisant toujours attention d'éviter la perte d'échantillons. Enfin, placer dans chaque tube quelques gouttes d'éthanol 100 % pour terminer la déshydratation en réalisant trois bains de 20 min chacun. L'éthanol pur est retiré afin de pouvoir démarrer l'étape d'inclusion. Quelques gouttes d'oxyde de propylène ($\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich) sont placées dans chaque tube en deux bains de 10 min chacun. Une fois l'oxyde de propylène retiré, placer dans chaque tube un mélange de 2 ml d'oxyde de propylène et de 1 ml d'Epon qui correspond à un assemblage de 50 % de milieu d'enrobage époxy avec 25 % de méthyl-5-norbornène-2,3-dicarboxylique anhydre NMA ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$) (Ladd), 25 % de dodécénylsuccinique anhydre DDSA ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_3$) (Ladd) et 1,5 % de 2,4,6-tridiméthylaminométhyl phénol DMP-30 ($\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$) (Ladd) pendant 2 h. Le maximum possible de ce mélange est retiré pour ensuite ajouter le mélange suivant de 1,5 ml d'oxyde de propylène avec 1,5 ml d'Epon durant 2 h également. Ce deuxième mélange est retiré afin de placer 1 ml d'oxyde de propylène avec 2 ml d'Epon pour le troisième mélange durant 2 h. Pour achever cette inclusion, il faut retirer le troisième mélange et ajouter quelques gouttes d'Epon 100 % en laissant reposer toute la nuit. Les tardigrades vont être placés à une extrémité de moules conçus à cet effet en prenant soin que ces moules soient recouverts d'une couche d'Epon 100 % et qu'il n'y ait pas de bulles d'air. La polymérisation des échantillons enchâssés dans ces petits blocs de résine est induite à 60 °C durant minimum 48 h. Ultérieurement, ces blocs de résine vont être taillés afin de pouvoir obtenir des coupes semi-fines (200-300 nm) et ultra-fines (60-70 nm) à l'aide de l'ultramicrotome (Ultracut S Leica) muni d'un couteau de diamant (Drukker). Pour les coupes semi-fines, celles-ci sont récupérées et mises sur des lames porte-objets pour être observées grâce à une coloration au bleu de toluidine. Tandis que pour les coupes ultra-fines, elles sont recueillies et placées sur des grilles de cuivre et de palladium. Le contraste de ces coupes ultra-fines est effectué par dépôts préférentiels de sels de métaux tels

que l'acétate d'uranyle et de citrate du plomb sur les différents constituants cellulaires selon Reynolds (1963). Les grilles sont mises au contact d'une solution d'acétate d'uranyle pendant 10 min. Il s'en suit d'un rinçage dans trois bains d'eau désionisée. Ensuite les grilles sont mises au contact d'une solution de citrate de plomb pendant 10 min. Les grilles sont à nouveau rincées dans trois bains consécutifs d'eau désionisée et sont mises à sécher à l'abris des poussières.

2.4.2. Observation des échantillons

Le microscope photonique (Nikon ECLIPSE Ci-L) permet d'examiner des organismes entiers ainsi que des coupes semi-fines.

Le microscope électronique à transmission est un instrument très sensible qui se présente sous la forme d'une colonne dont l'intérieur doit être absolument mis sous vide par l'intermédiaire de valves et de pompes. Le modèle du microscope utilisé lors de ce mémoire est le JEOL 1400. Tout d'abord, il faut générer les électrons dans un canon à électrons qui est composé d'un filament de tungstène dans lequel on fait passer un courant. L'énergie produite sous forme de chaleur permet aux électrons de s'éjecter naturellement à la pointe du filament. Ce nouveau courant généré a une différence de potentiel de -80 kV, ce qui permet une accélération des électrons vers l'anode qui est reliée à la terre. Pour avoir une bonne qualité de faisceau, une diminution progressive de la différence de potentiel de l'anode à la terre est générée afin d'accélérer les électrons de la manière la plus droite possible. La source d'électrons doit être cohérente spatialement, c'est-à-dire que les électrons doivent partir du point le plus petit possible pour avoir le faisceau le plus focalisé possible. Cette source doit être aussi cohérente temporairement, c'est-à-dire que tous les électrons doivent avoir la même vitesse pour ne pas causer de divergence du faisceau. Ensuite, les électrons étant produits et accélérés dans le canon à électrons vont venir se focaliser dans un système de condenseur, puis dans un système de focalisation tous deux composés de déflecteurs et de lentilles permettant de corriger le faisceau incident. La résolution en TEM est de l'ordre de l'ångström (3 à 4 Å). Enfin, le dernier système est un système de projection et de détection permettant d'obtenir une image à deux dimensions agrandie. L'image est rendue visible grâce à un système de caméra de 11 mégapixels (Quemesa, Olympus). Des photos de parties de coupes peuvent être prises pour des analyses ultérieures avec iTEM v5.2 (Olympus, Tokyo) à l'aide du programme Image J v1.52a.

3. Résultats

3.1. Identification des espèces

Lors de la recherche de tardigrades au sein des culots précédemment agités et centrifugés, nous avons repéré quatre espèces différentes. Parmi ces quatre espèces, trois eutardigrades et un hétérotardigrade ont été isolés et observés au binoculaire, ainsi qu'au microscope photonique. Seulement pour cette étude, nous avons préféré nous concentrer sur les espèces d'eutardigrades plus fréquemment retrouvées sur nos sols européens. C'est pourquoi, les recherches plus approfondies sur l'ultrastructure réalisées au TEM ne porteront que sur les deux espèces suivantes : *Ramazzottius oberhaeuseri* et *Milnesium tardigradum*. L'ensemble des caractéristiques de chaque espèce est rassemblé dans le **Tableau 4**.

3.1.1. Hétérotardigrades

Les hétérotardigrades étant généralement marins, nous avons isolé une espèce faisant partie du seul ordre terrestre/limnoterrestre : *Echiniscoidae*. Cet ordre comprend les familles des *Echiniscidae* et des *Oreellidae* dont toutes les espèces sont anhydrobiotiques (Guidetti 2011). Mais par simple curiosité, nous avons observé cet hétérotardigrade au microscope photonique et selon la littérature, nos observations se tourneraient vers le genre *Echiniscus*. Ils sont retrouvés principalement dans certains spécimens de lichens et dans très peu de mousses. Leur corps à l'âge adulte mesure environ 200 à 500 μm avec une apparence de couleur orange vif venant des coelomocytes. Ils possèdent deux yeux simples à cupule pigmentaire rouge/brun, ainsi que plusieurs appendices sensoriels céphaliques appelés cirres et claves. Ils disposent de quatre griffes placées les unes à côté des autres terminant chaque patte, ce qui est caractéristique de ce genre (**Figures 5 A et B**). En ce qui concerne l'appareil digestif, le tube buccal est court, non flexible et est suivi d'un pharynx rond sans macroplocoïde (Nelson 2010). Les œufs sont pondus dans l'exuvie et ceux-ci sont d'apparence légèrement grisâtre et lisse avec une transparence où on observe la couleur orangée du juvénile à l'intérieur.

Echiniscus

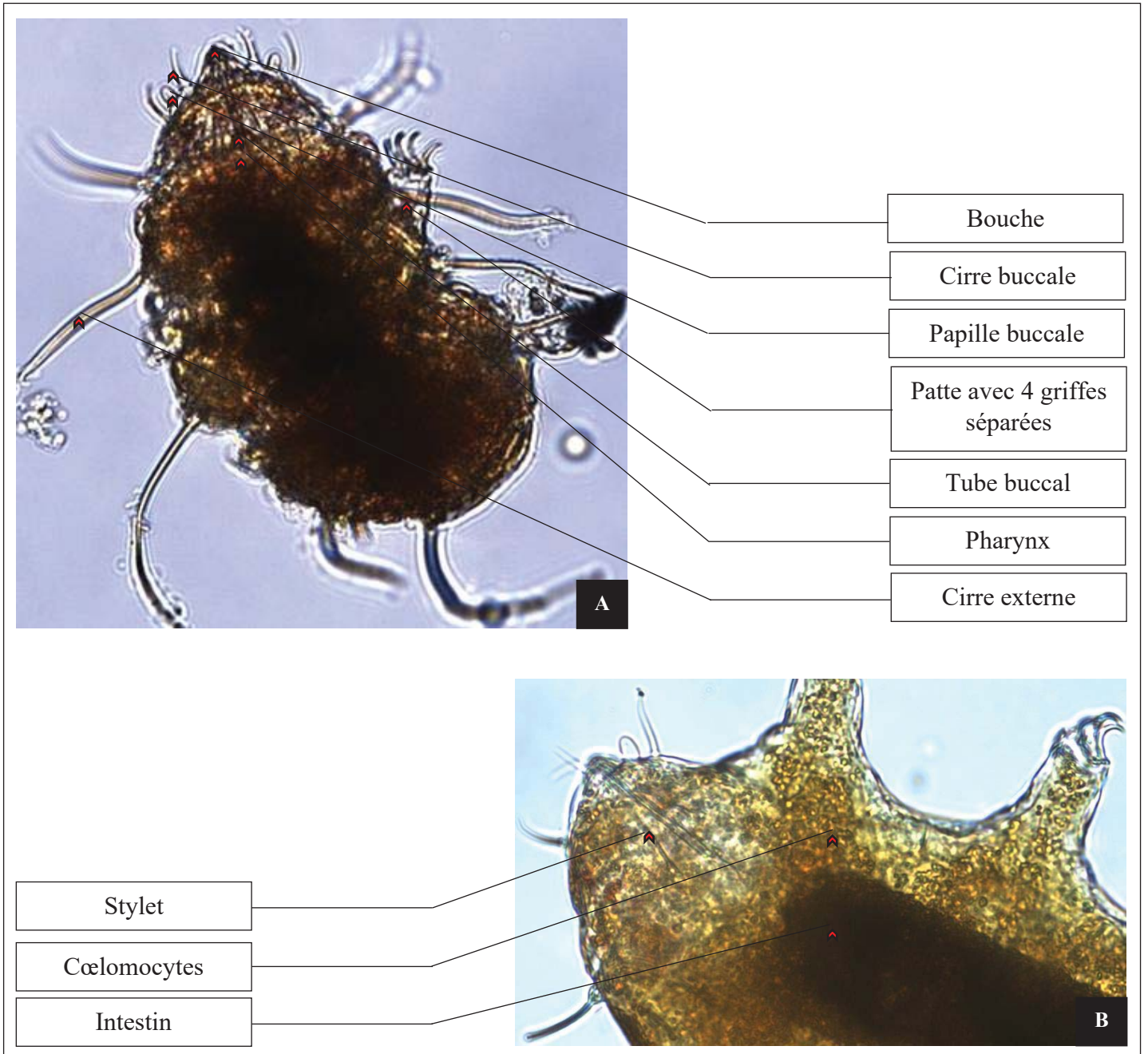


Figure 6 : Caractéristiques morphologiques du genre d'hétérotardigrade, *Echiniscus*. Images obtenues au microscope photonique. En **A**) description du corps entier et en **B**) vue à plus fort grossissement sur la première moitié du corps.

3.1.2. Eutardigrades

Les eutardigrades sont quant à eux terrestres/limnoterrestres, les trois espèces isolées se répartissent au sein des deux ordres : *Parachela* et *Apochela*. La différence principale entre ces deux ordres est l'absence de placoïde chez les *Apochela*. Pour une identification la plus précise possible des trois espèces isolées, nous nous sommes basés sur la clé de détermination « An illustrated identification key to the eutardigrade species (Tardigrada, Eutardigrada) presently known from European soils (2017) » de Jenna Bingemer et Karin Hohberg. Cette clé d'identification est purement morphologique, ce qui ne permet pas toujours la détermination formelle de l'espèce trouvée.

Cependant, l'espèce d'eutardigrade la plus abondamment retrouvée dans tous nos échantillons de mousses et de lichens est : *Ramazzottius oberhaeuseri*. Cette espèce fait partie de l'ordre des *Parachela* et de la famille des *Hypsibiidae*. En suivant minutieusement la clé, l'identification de cette espèce n'a pas été complexe. De plus, seul *Ramazzottius oberhaeuseri* a été signalé sur nos sols européens. La longueur du corps adulte est de 200 à 500 μm avec une pigmentation brunâtre disposée en bande longitudinale. Il y a une absence totale de papille céphalique et péribuccale ainsi que d'organe photorécepteur. Cette espèce possède deux griffes sur chaque patte avec une disposition et une forme particulière au genre *Ramazzottius*, c'est-à-dire une organisation des griffes asymétrique, avec les griffes internes courtes et robustes et les griffes externes composées d'une longue et fine branche primaire et d'une petite branche secondaire incurvée. L'appareil digestif est composé d'un tube buccal rigide n'étant pas suivi d'un tube pharyngé flexible et le pharynx est rond à ovale avec deux macroplacoïdes et pas de microplacoïde (**Figure 6 A**). Les œufs ont une coquille grisâtre et ornementée, ceux-ci sont pondus librement dans le substrat (**Figure 6 B**).

L'autre espèce facilement identifiable et retrouvée en certaine quantité au sein de nos mousses et lichens est : *Milnesium tardigradum*. Elle fait partie de l'ordre des *Apochela* et de la famille des *Milnesiidae*. Cette espèce est nettement plus grande que la précédente, avec une longueur du corps adulte allant de 500 à 800 μm avec une pigmentation rougeâtre disposée en bande longitudinale. La présence de dix lamelles péribuccales, de deux papilles sensorielles céphaliques et six papilles péribuccales est très caractéristique de cette espèce ce qui permet donc d'être assez rapidement sur la bonne voie d'identification. En plus de sa grande taille, l'existence de deux yeux simples à cupule pigmentaire rouge/brun nous permet de différencier cette d'espèce de la précédente simplement au binoculaire. Ils possèdent deux griffes sur chaque patte avec une disposition et une forme de ces griffes particulière au genre *Milnesium*, c'est-à-

dire une séparation distincte entre les branches primaires et secondaires dont l'extrémité des branches primaires est recourbée. La structure de l'appareil digestif est la suivante : un tube buccal rigide et large n'étant pas suivi d'un tube pharyngé flexible en continuité avec un pharynx ovale sans macroplacoïde, ni microplacoïde (**Figure 7 A**). Les œufs grisâtres et lisses sont pondus dans l'exuvie (**Figure 7 B**). *Ramazottius oberhaeuseri* est la seule espèce des quatre observées qui forment réellement des « tun » comme décrit dans la littérature, c'est-à-dire une contraction de l'axe antéro-postérieur de l'ensemble du corps où les pattes et les parties céphalique et caudale sont rétractées, n'étant plus visibles (Jönsson 2008) (**Figure 7 C**).

Les derniers individus recensés dans nos échantillons de mousses et de lichens n'est actuellement toujours pas identifiée avec précision. Au vu des caractères morphologiques repris dans la clé, nos observations se tourneraient vers le genre *Macrobotus* ou *Mesobotus*. Cette clé de détermination ne différencie pas les deux genres dû aux faibles différences entre ceux-ci. Ces deux genres font partie de l'ordre des *Parachela* et de la famille des *Macrobotidae*. Les individus de ce genre ont une longueur du corps adulte allant de 200 à 500 μm avec une légère coloration grise uniforme. Ils possèdent dix lamelles péribuccales mais aucune papille céphalique et péribuccale. Comme *Milnesium tardigradum*, ils disposent de deux yeux simples à cupule pigmentaire rouge/brun. Ils portent deux griffes sur chaque patte qui sont très semblables en taille et en forme. L'organisation des griffes est symétrique avec les branches primaires et secondaires courbées qui s'unissent dans un tractus commun rigide. La particularité est telle que ce tractus n'est pas continu, il comporte une partie peu sclérifiée nommée septum. L'appareil digestif est formé d'un tube buccal rigide n'étant pas suivi d'un tube pharyngé flexible et d'un pharynx rond comprenant deux à trois macroplacoïdes et un microplacoïde (**Figure 8 A**). Les œufs ont une coquille grisâtre et ornementée, ceux-ci sont pondus librement dans le substrat (**Figure 8 B**).

Pour ces trois espèces d'eutardigrades, le développement de l'état juvénile à la morphologie adulte a été observé séparément au binoculaire. Les juvéniles ayant moins de 24 h apparaissent complètement transparents avec une taille bien inférieure à 200 μm . Les espèces ayant des organes photorécepteurs, ceux-ci sont présents dès la naissance.

Ramazzottius oberhaeuseri

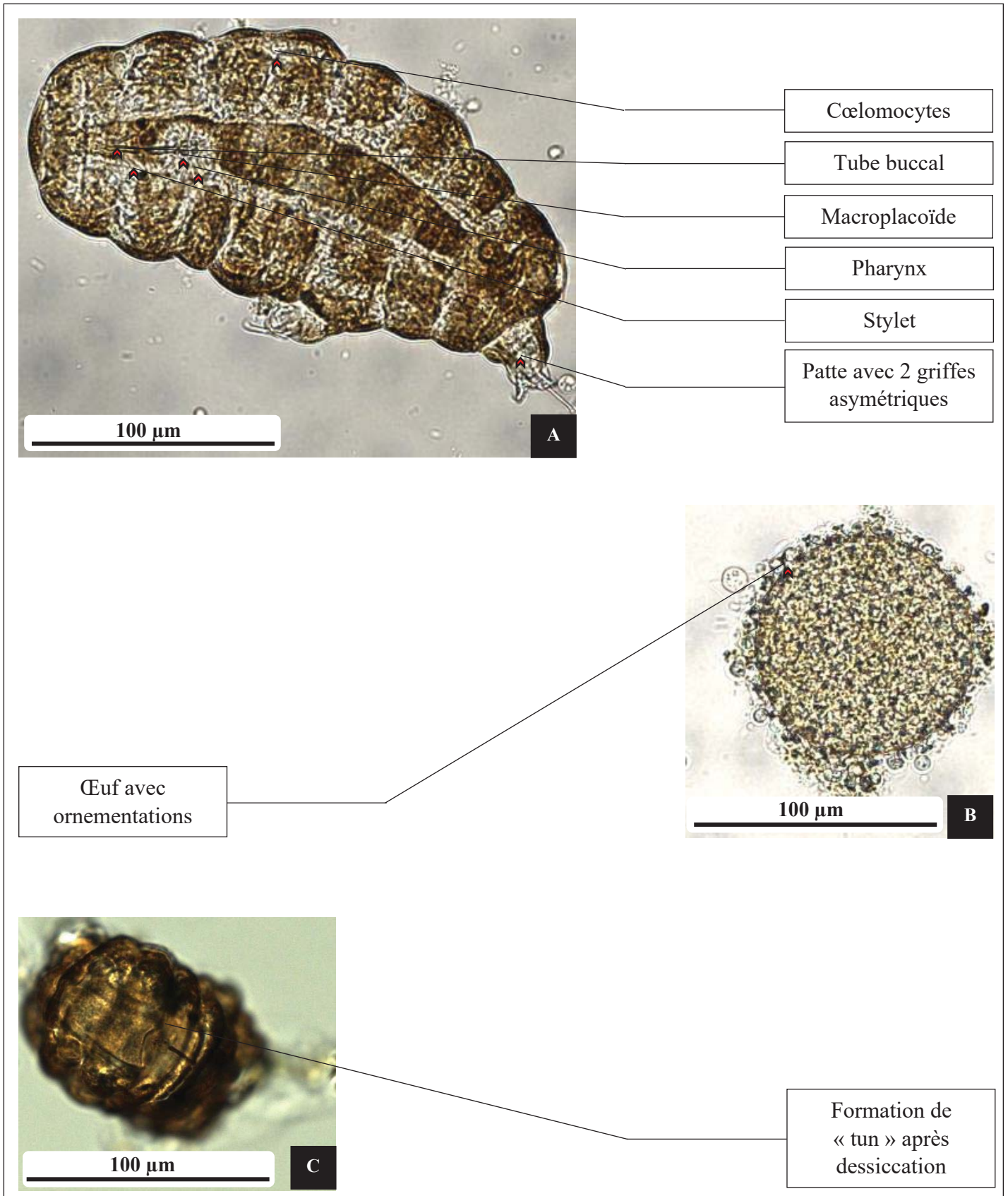


Figure 7 : Caractéristiques morphologiques de l'espèce d'eutardigrade, *Ramazzottius oberhaeuseri*. Images obtenues au microscope photonique. En **A)** description du corps entier, en **B)** un seul œuf de cette espèce et en **C)** formation de « tun » par contraction de l'axe antéro-postérieur de l'ensemble du corps.

Milnesium tardigradum

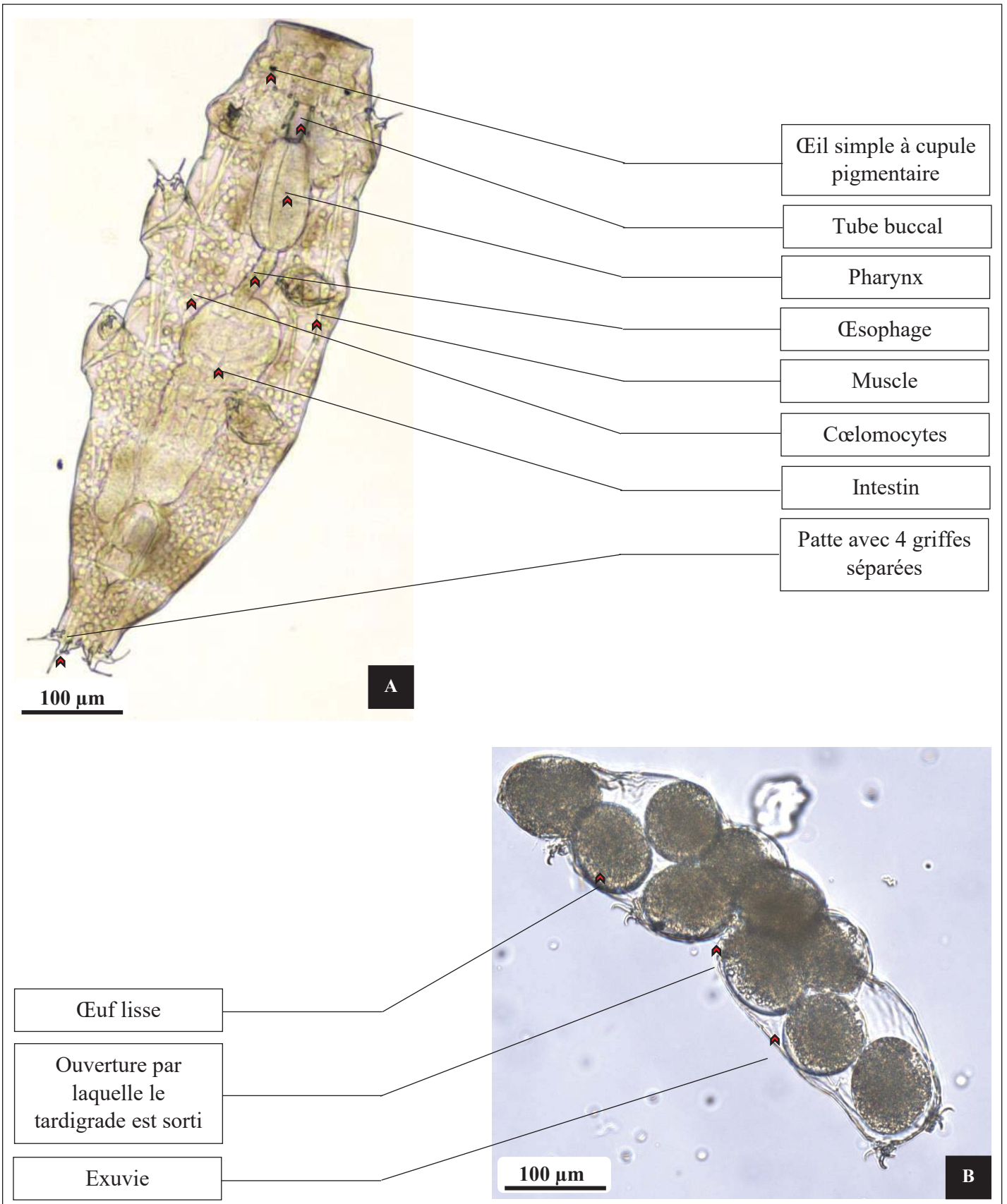


Figure 8 : Caractéristiques morphologiques de l'espèce d'eutardigrade, *Milnesium tardigradum*. Images obtenues au microscope photonique. En **A**) description du corps entier et en **B**) dix œufs dans l'exuvie de cette espèce.

Macrobiotus/Mesobiotus

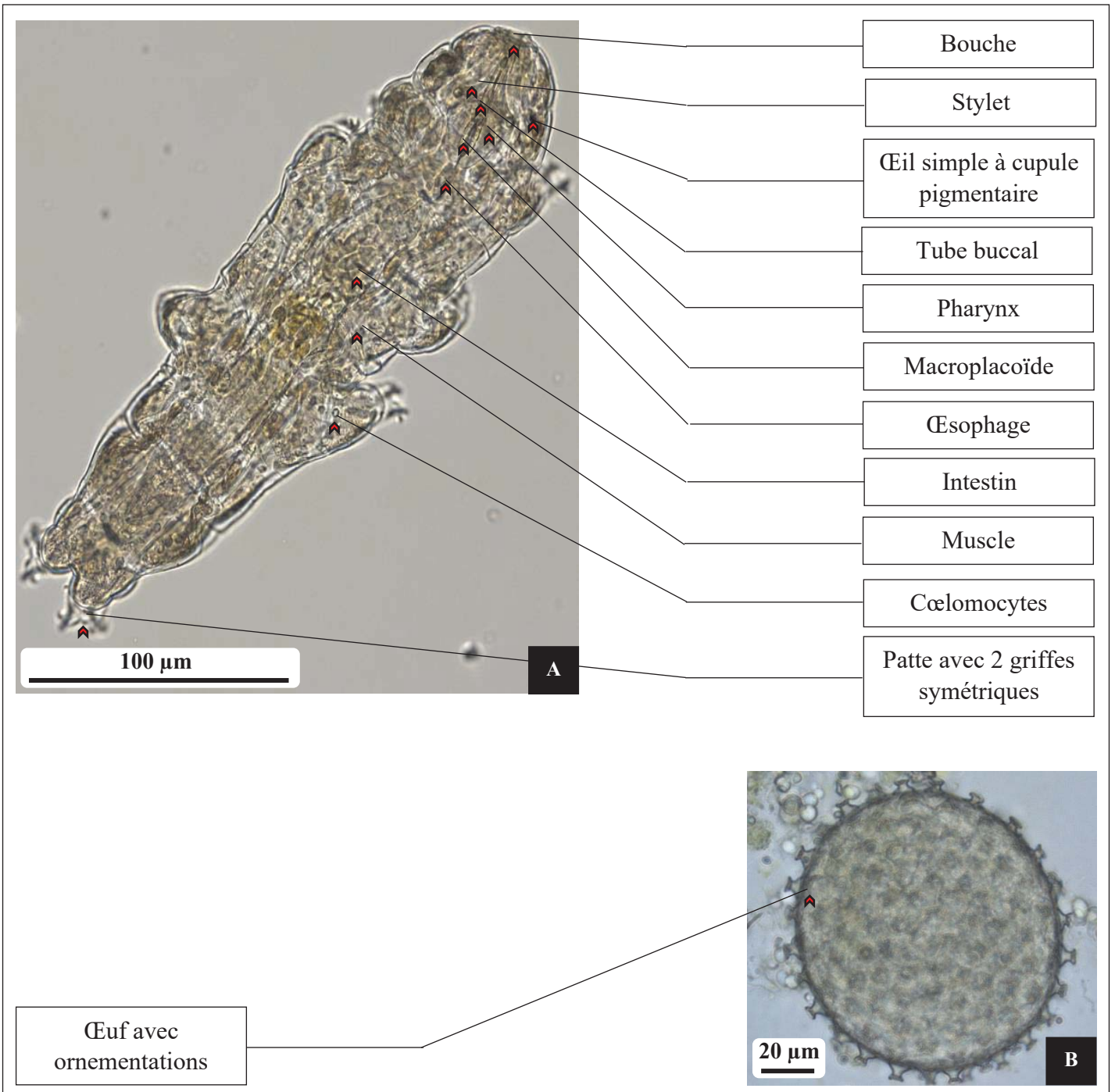


Figure 9 : Caractéristiques morphologiques d'un des deux genres d'eutardigrade, *Macrobiotus/Mesobiotus*. Images obtenues au microscope photonique. En **A)** description du corps entier et en **B)** un seul œuf de cette espèce.

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques de chacune des quatre espèces de tardigrades (images provenant de Bingemer 2017).

	Ramazottius oberhaeuseri	Milnesium tardigradum	Macrobiotus/Mesobiotus	Echiniscus
Classification	<i>Eutardigrada – Parachela – Hypsibiidae.</i>	<i>Eutardigrada – Apochela – Milnesiidae.</i>	<i>Eutardigrada – Parachela – Macrobiotidae.</i>	<i>Heterotardigrada – Echiniscoidea – Echiniscidae.</i>
Taille adulte	200-500 µm.	500-800 µm.	200-500 µm.	200-500 µm.
Coloration de la cuticule	Rouge/Brun formant des lignes. Les juvéniles sont complètement transparents.	Rouge/Brun formant des lignes. Les juvéniles sont complètement transparents.	Gris/Transparent. Les juvéniles sont complètement transparents.	Orange/Rouge. Les juvéniles ont déjà cette couleur orange vif.
Yeux/Ocelles/Photorécepteurs	Aucun.	2 sur le 2 ^e segment.	2 sur le 2 ^e segment.	2 sur le 2 ^e segment.
Griffes	4 paires de pattes avec 2 griffes asymétriques sur chaque paire de pattes.	4 paires de pattes avec 4 griffes sur chaque paire de pattes (branche primaire séparée de la secondaire).	4 paires de pattes avec 2 griffes symétriques sur chaque paire de pattes avec septum.	4 paires de pattes avec 4 griffes séparées sur chaque patte.
Structures péri-buccales	Aucune.	Lamelles péri-buccales. Papilles sensorielles céphaliques et péri-buccales.	Lamelles péri-buccales.	Papilles péri-buccales. Cirres et claves.
Tube buccal Pharynx	Tube buccal court et non flexible. Pharynx rond avec 2 macroplacoïdes.	Tube buccal court et non flexible. Pharynx allongé sans macroplacoïde.	Tube buccal court et non flexible. Pharynx rond avec 2 ou 3 macroplacoïdes et 1 microplacoïde.	Tube buccal court et non flexible. Pharynx rond sans macroplacoïde.
Œufs	Œufs grisâtres, ornés, pondus librement dans le substrat.	Œufs grisâtres, lisses, pondus dans l'exuvie.	Œufs grisâtres, ornés, pondus librement dans le substrat.	Œufs orangés, pondus dans l'exuvie.
Habitat	Lichens et mousses.	Lichens et un peu mousses.	Mousses et très peu lichens.	Lichens et un peu mousses.

3.2. Expérience de mise en cryptobiose

Pour cette expérience de mise en cryptobiose artificielle, le stagiaire de Master 1 Biochimie Biologie Moléculaire et Cellulaire Florent Dubois a procédé à plusieurs tests sur des tripliquas de dix individus de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri* pour chaque condition saline saturante suivante :

- 1) au sein d'une enceinte hermétique fermée 10 *Ramazzottius oberhaeuseri* ont été placés dans un Eppendorf avec une concentration saturante de KCl (86 % d'HR) pendant 24 h ;
- 2) au sein d'une enceinte hermétique fermée 10 *Ramazzottius oberhaeuseri* ont été placés dans un Eppendorf avec une concentration saturante de NaCl (76 % d'HR) pendant 24 h ;
- 3) au sein d'une enceinte hermétique fermée 10 *Ramazzottius oberhaeuseri* ont été placés dans un Eppendorf avec une concentration saturante de NaHCO₃ (55 % d'HR) pendant 24 h ;
- 4) au sein d'une enceinte hermétique fermée 10 *Ramazzottius oberhaeuseri* ont été placés dans un Eppendorf avec une concentration saturante de MgCl₂ (33 % d'HR) pendant 24 h ;
- 5) au sein d'une enceinte hermétique fermée 10 *Ramazzottius oberhaeuseri* ont été placés dans un Eppendorf avec une concentration saturante de NaCl puis de MgCl₂ chacune pendant 24 h ;
- 6) au sein d'une enceinte hermétique fermée 10 *Ramazzottius oberhaeuseri* ont été placés dans un Eppendorf en passant par toutes les conditions les unes à la suite des autres à concentration saturée chacune pendant 24 h.

Après chacune de ces expériences, tous les individus observés étaient sous forme de « tun ». Tous ont été réveillés avec quelques gouttes d'eau désionisée et observés au binoculaire à des temps multiples. Les individus n'ayant pas exécutés le moindre mouvement une semaine après la réhydratation sont considérés comme morts. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Résultats de réveils suite aux différentes conditions de mise en cryptobiose artificielle.

Expériences	Nombre d'individus en mouvement après réhydratation (triplicatas)			Temps après la réhydratation (en h)			Pourcentage d'individus en mouvement
1)	1/10	0/10	0/10	24 h	/	/	3,3 %
2)	1/10	2/10	5/10	16 h	16 h	16 h	26,7 %
3)	10/10	2/10	0/10	1 h	16 h	/	40 %
4)	3/10	5/10	0/10	3 h	5 h	/	26,7 %
5)	0/10	0/10	0/10	/	/	/	0 %
6)	0/10	0/10	0/10	/	/	/	0 %

Les expériences 1, 5 et 6 présentent les moins bons taux de réveils où seul un individu s'est révélé actif. L'expérience 3 dévoile les meilleurs résultats de par son rapprochement avec les conditions retrouvées sur le terrain. C'est pourquoi nous avons utilisé tout au long de ce mémoire cette condition pour la fixation d'individus en « tun ». Les expériences 2 et 4 révèlent des taux de réveils intermédiaires, ce qui est probablement dû aux taux d'HR proches de celui de l'expérience 3.

3.3. Observation de l'ultrastructure

Pour continuer à améliorer nos connaissances sur le sujet et de répondre à nos objectifs, nous nous sommes concentrés sur l'ultrastructure de certains composants cellulaires des espèces *Ramazzottius oberhaeuseri* et *Milnesium tardigradum*. La difficulté première va être de se repérer au sein des coupes semi-fines et ultra-fines, à savoir si nous sommes plutôt au niveau de la partie céphalique, centrale ou caudale. Ensuite pouvoir orienter ces coupes, grâce notamment à la position des organes. Et enfin d'observer des différences entre l'état actif et l'état en forme de « tun » et entre les deux espèces.

3.3.1. *Ramazzottius oberhaeuseri*

- **Vue d'ensemble**

Afin d'avoir une vue d'ensemble de cette espèce, une coupe semi-fine et une ultra-fine du même individu actif sont présentées dans les figures 9 et 10 ci-dessous. Ces deux coupes se situent au niveau de la partie centrale du corps passant par l'appareil digestif avec des illustrations de ces principaux constituants (**encadrés Figure 10**).

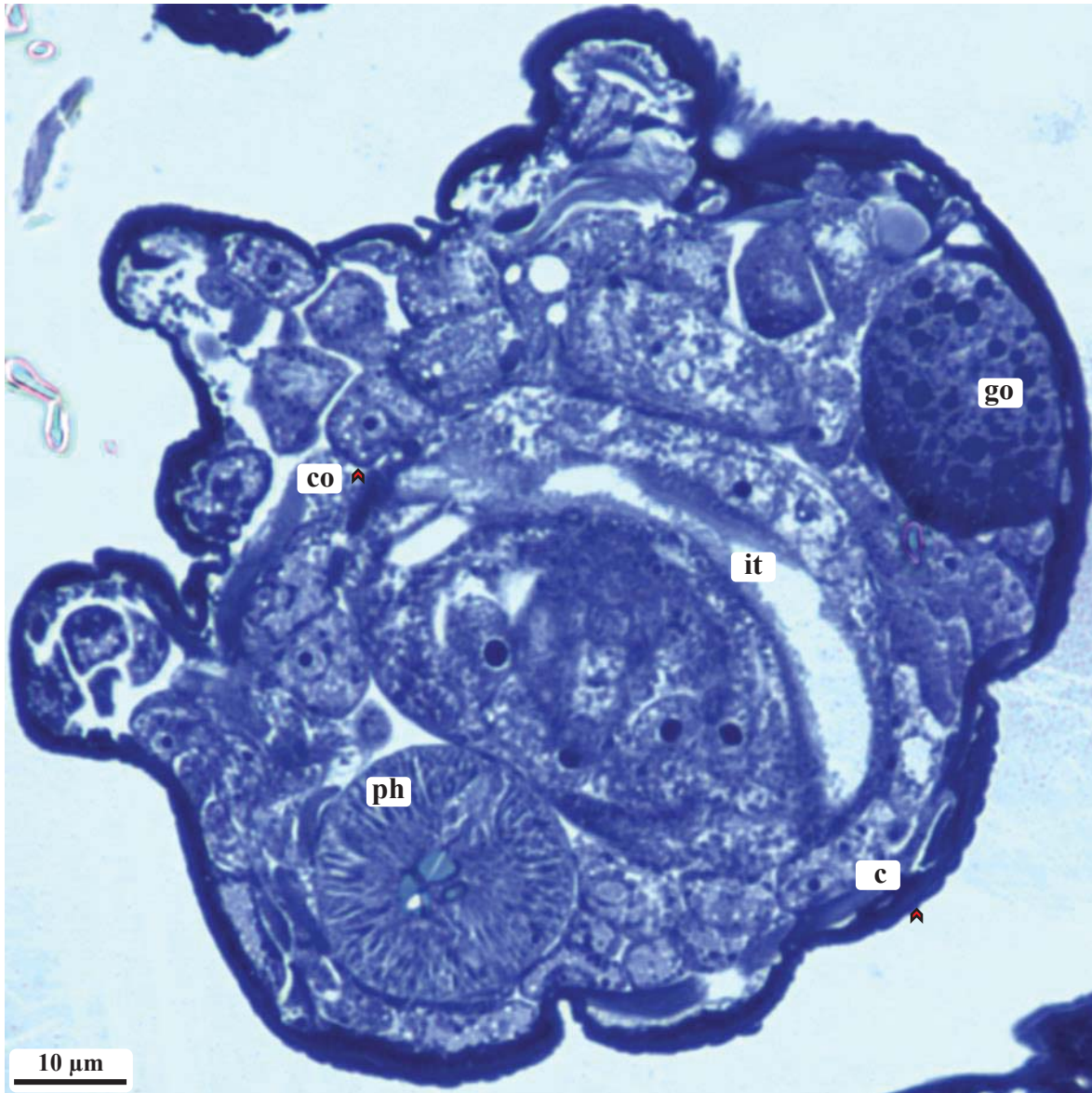


Figure 10 : Coupe semi-fine au niveau de l'appareil digestif d'un individu de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. *c* : cuticule, *co* : cœlomocyte, *go* : gonade, *it* : intestin et *ph* : pharynx.

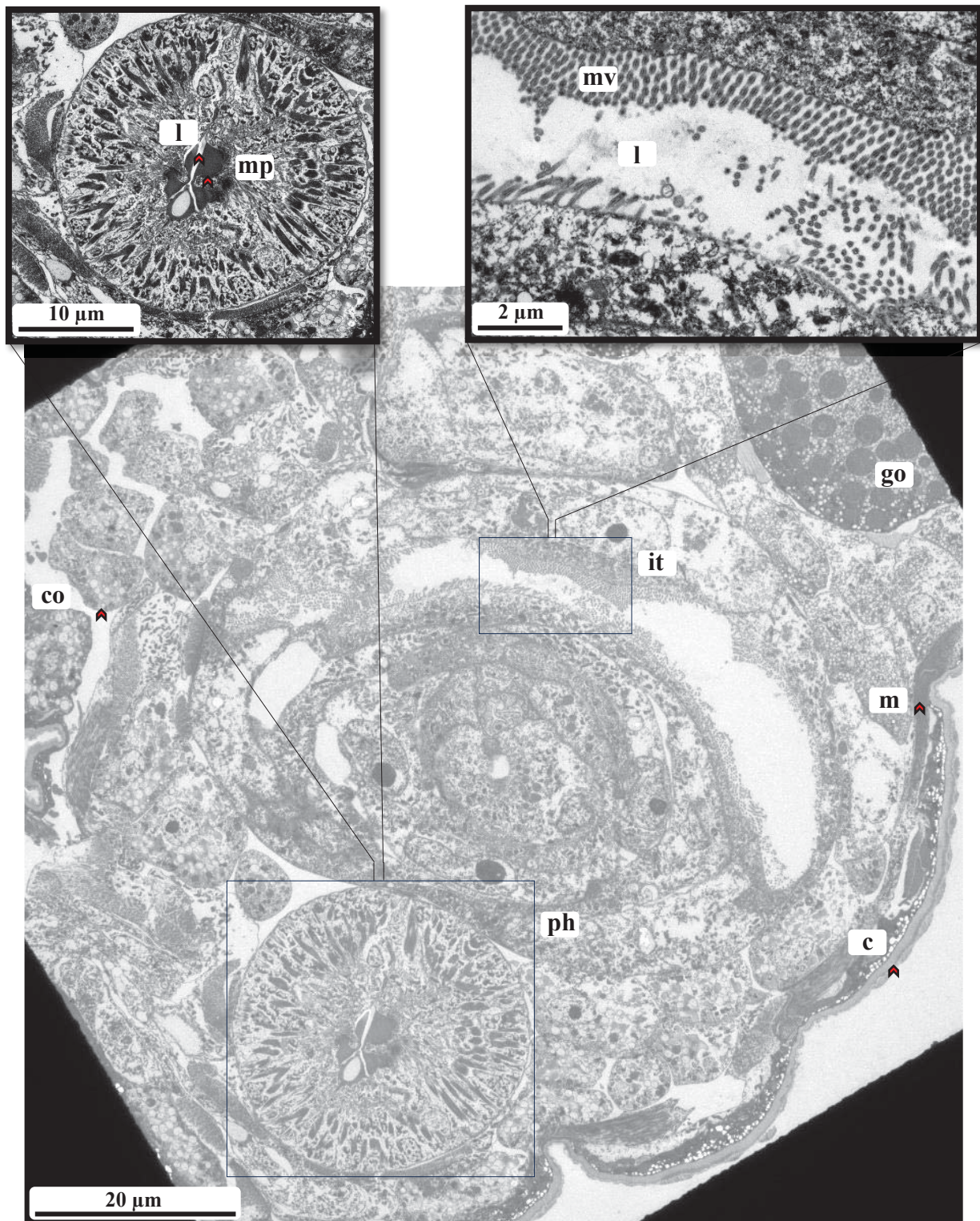


Figure 11 : Coupe ultra-fine au niveau de l'appareil digestif d'un individu de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. Cette coupe est en correspondance avec la coupe semi-fine de figure 9. Les deux encadrés supérieurs représentent un zoom des organes majeurs du l'appareil digestif. **c** : cuticule, **co** : cælomocyte, **go** : gonade, **it** : intestin, **l** : lumière, **m** : muscle, **mp** : macroplocoïde, **mv** : microvillosité et **ph** : pharynx.

- **Cuticule**

La cuticule observée sur nos coupes ultra-fines est morphologiquement similaire à celle décrite dans la littérature (**encadré Figure 11**). La délimitation entre les trois couches principales est clairement apparente (**Figure 11**). Il n'y a aucune différence visible entre la cuticule des tardigrades en « tun » et celle des actifs.

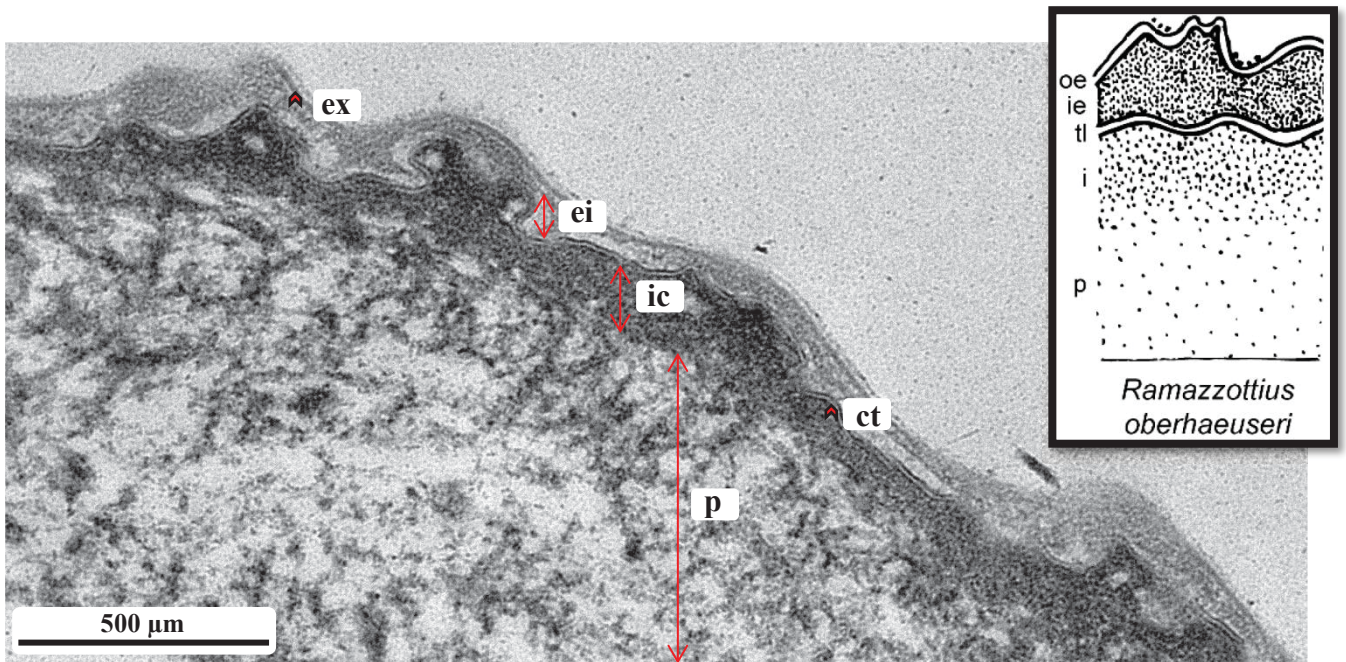


Figure 12 : Coupe ultra-fine au niveau de la cuticule d'un individu actif de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. L'encadré supérieur est un schéma repris de la littérature illustrant les différentes couches de la cuticule observées chez cette espèce (Czernekova, 2021). *ct* : couche trilaminaire, *ei* : épicuticule interne, *ex* : épicuticule externe, *ic* : intracuticule et *p* : procuticule.

- **Cœlomocyte**

Ces cellules de réserves sont le modèle cellulaire principal sur lequel nous nous sommes concentrés pour identifier des différences entre la forme active et « tun » (**Figures 12 A et B**). En analysant premièrement l'aire de chacun des cœlomocytes, nous pouvons ainsi déterminer la taille moyenne de ces cellules grâce au logiciel ImageJ. Pour cette espèce, les cœlomocytes des individus actifs ont tendance à avoir une taille 3 à 10 fois supérieure à celle des individus en dormance (**Figure 16**). Deuxièmement, la proportion de grains de sécrétion par unité de surface est 2 à 3 fois plus importante chez les individus actifs (**Figure 17**). Nous nous sommes aussi intéressés au noyau où le nucléole est bien visible au sein de tous les cœlomocytes des organismes actifs. En revanche chez les « tun », nous devinons très peu le nucléole.

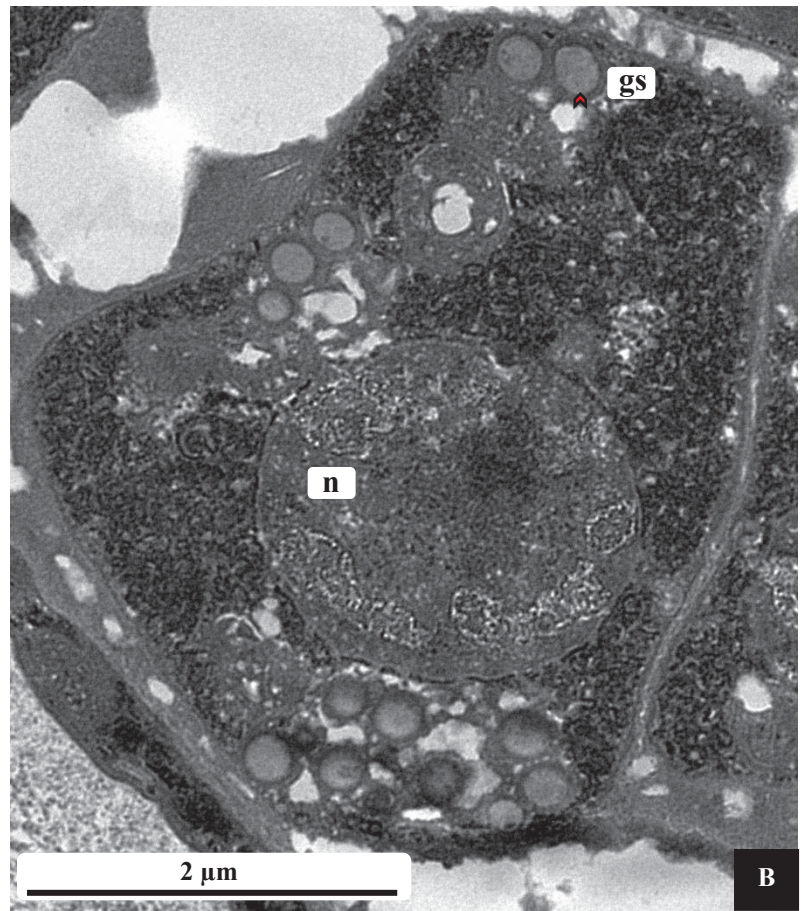
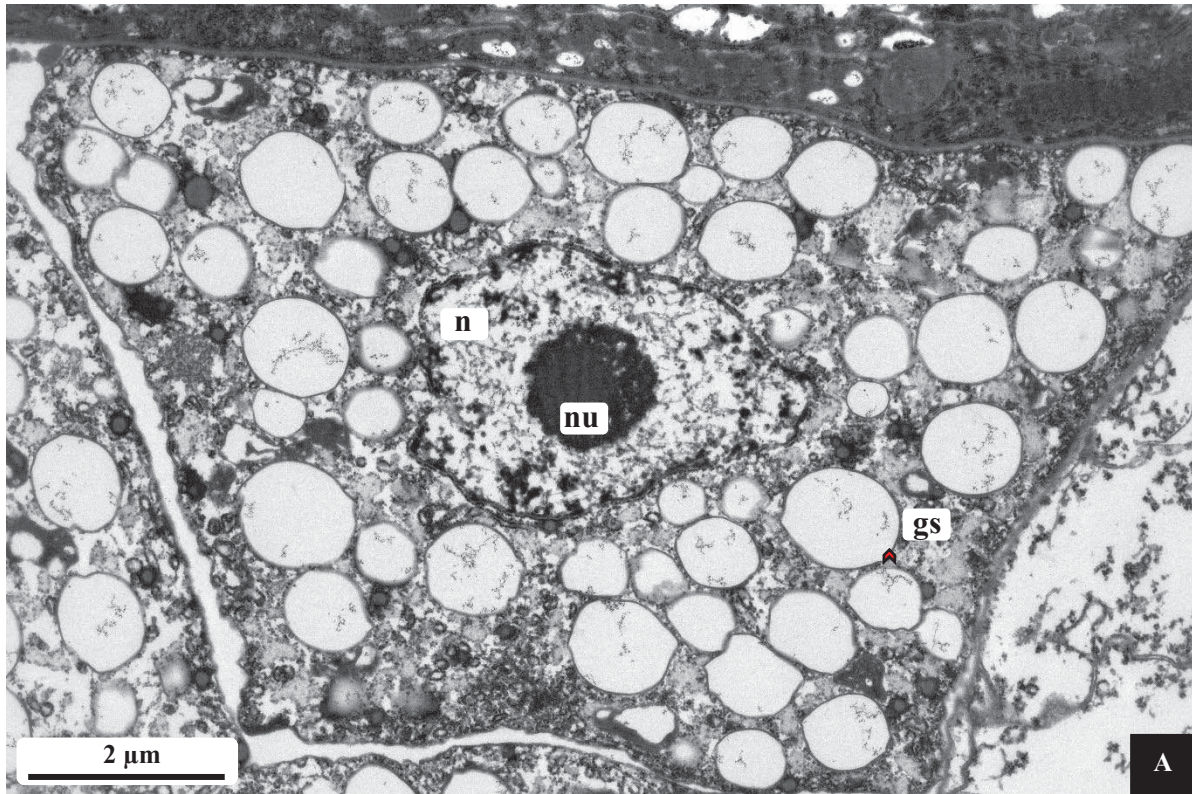


Figure 13 : Coupes ultra-fines au niveau des cellules de réserves ou cœlomocytes de l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. En A) Représentation d'un cœlomocyte au sein d'un individu actif et en B) Représentation d'un cœlomocyte au sein d'un individu en « tun ». gs : grains de sécrétion, n : noyau et nu : nucléole.

3.3.2. *Milnesium tardigradum*

- **Vue d'ensemble**

Pour cette espèce nous n'avons malheureusement pas su obtenir de coupes semi-fines représentatives de l'ensemble d'un individu. Seules des sections caractéristiques du tube digestif au sein de coupes ultra-fines seront illustrées ci-dessous (**Figures 13 A, B et C**).

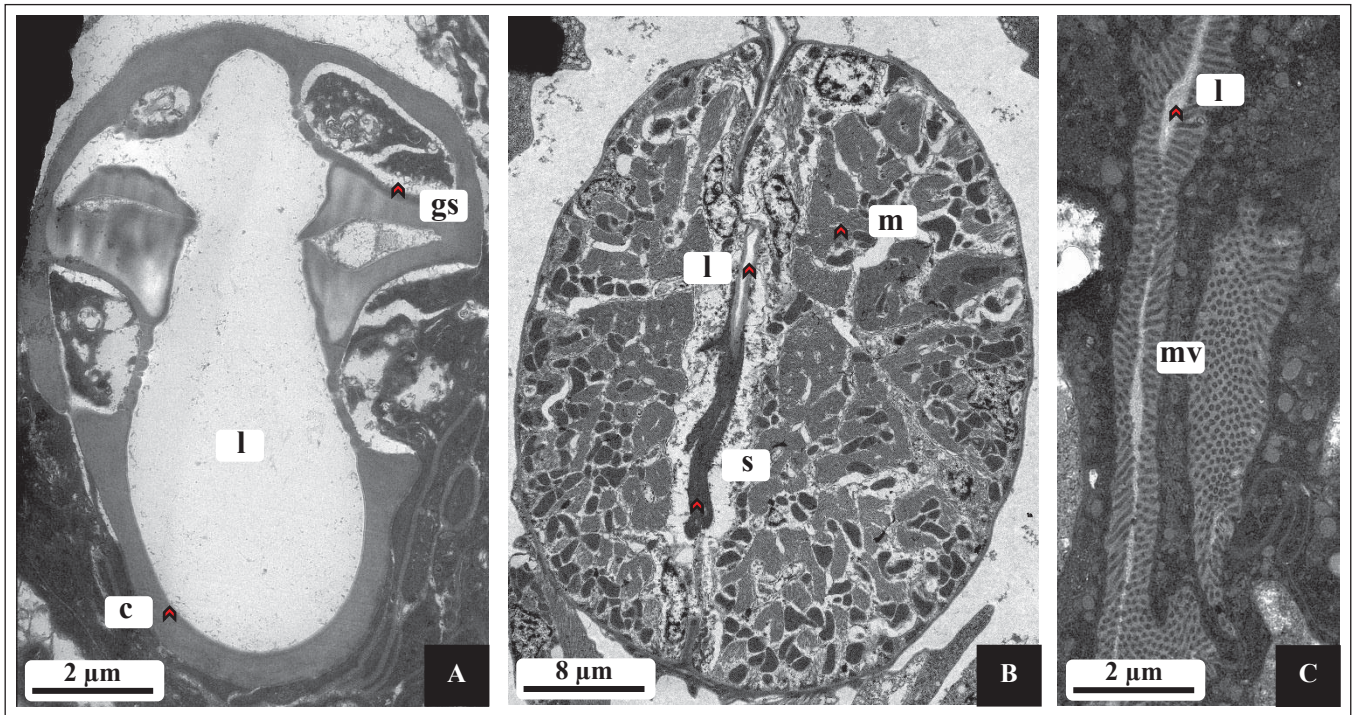


Figure 14 : Coupes ultra-fines de différentes sections de l'appareil digestif de l'espèce *Milnesium tardigradum*. En **A**) le tube buccal, en **B**) le pharynx et en **C**) l'intestin. **c** : cuticule, **gs** : glande à stylet, **l** : lumière, **m** : muscle, **mv** : microvillosité et **s** : septulum.

- **Cuticule**

La cuticule observée sur nos coupes ultra-fines est morphologiquement similaire à celle décrite dans la littérature (**encadré Figure 14**). La délimitation entre les trois couches principales est clairement apparente (**Figure 14**). Il n'y a aucune différence visible entre la cuticule des tardigrades en « tun » et celle des actifs.

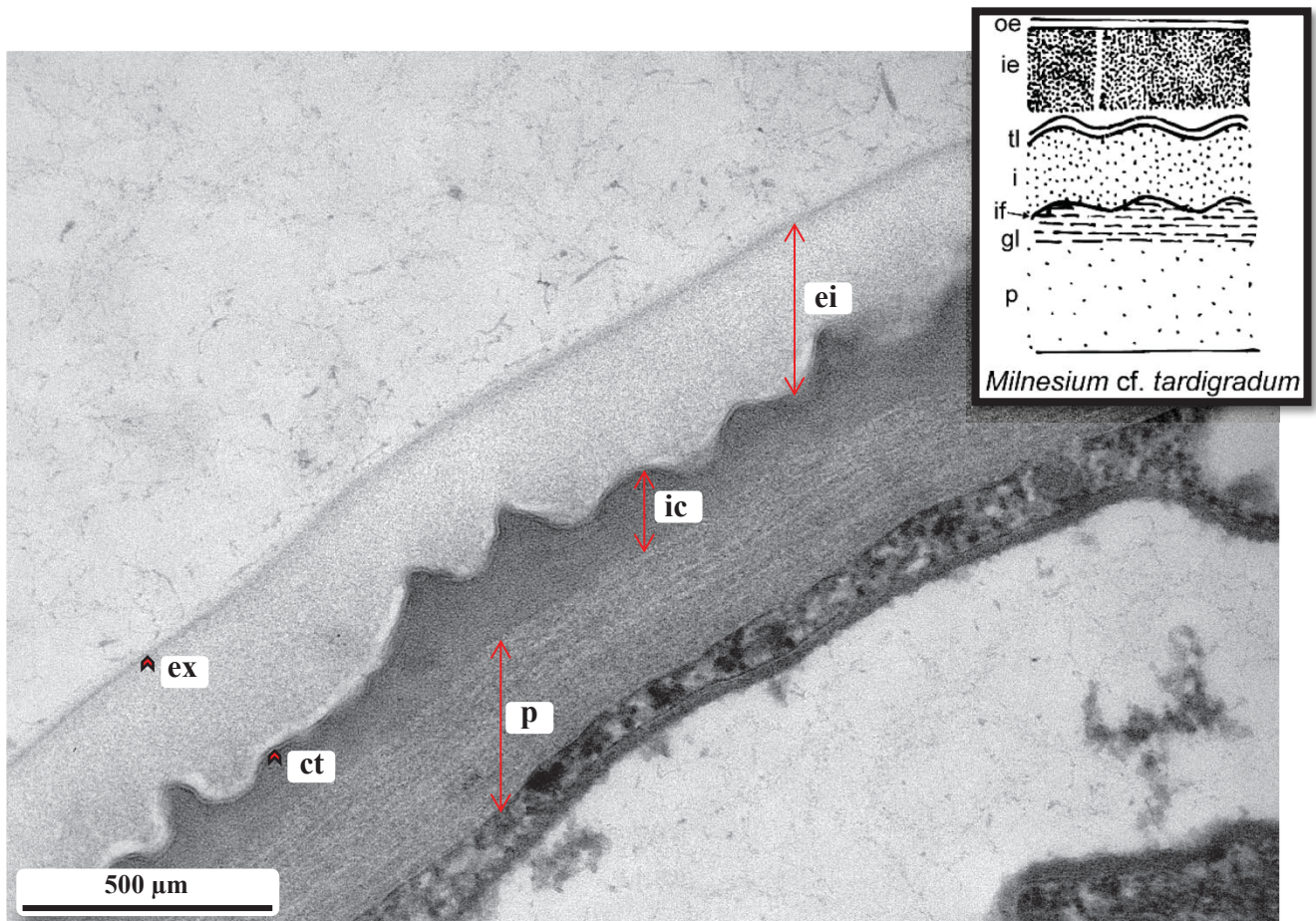


Figure 15 : Coupe ultra-fine au niveau de la cuticule d'un individu actif de l'espèce *Milnesium tardigradum*. L'encadré supérieur est un schéma repris de la littérature illustrant les différentes couches de la cuticule observées chez cette espèce (Czernekova, 2021). *ct* : couche trilaminaire, *ei* : épicuticule interne, *ex* : épicuticule externe, *ic* : intracuticule et *p* : procuticule.

- **Cœlomocyte**

Ces cellules de réserves sont le modèle cellulaire principal sur lequel nous nous sommes concentrés pour identifier des différences entre la forme active et « tun » (**Figures 15 A et B**). En analysant premièrement l'aire de chacun des cœlomocytes, nous pouvons ainsi déterminer la taille moyenne de ces cellules grâce au logiciel ImageJ. Pour cette espèce, les cœlomocytes ont tendance à avoir une taille très similaire chez tous les individus actifs analysés. Alors que pour les individus en « tun » il y a une variabilité de taille. Les différences d'aires entre les actifs et les « tun » sont bien moindres que *Ramazzottius oberhaeuseri*, puisqu'ici il n'y a pas ou peu de différences de tailles. Une légère augmentation de 1,5 fois l'aire des cœlomocytes entre les individus (**Figure 16**). En ce qui concerne la proportion de grains de sécrétion par unité de surface, elle est également 2 à 3 fois plus importante chez les individus actifs

(Figure 17). Le nucléole au sein des noyaux est aussi très peu visible chez les organismes en « tun » contrairement aux actifs.

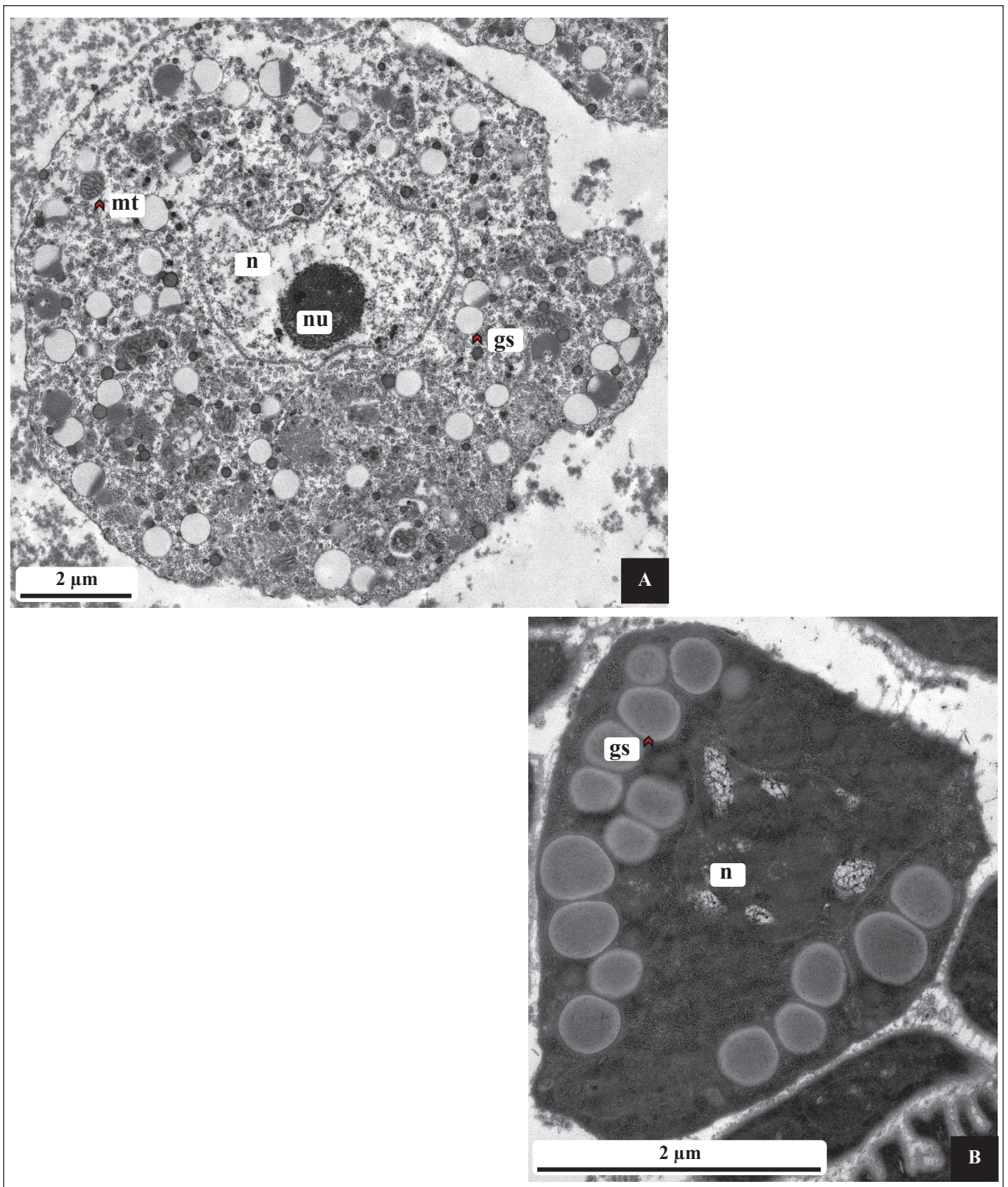


Figure 16 : Coupes ultra-fines au niveau des cellules de réserves ou cœlomocytes de l'espèce *Milnesium tardigradum*. En A) Représentation d'un cœlomocyte au sein d'un individu actif et en B) Représentation d'un cœlomocyte au sein d'un individu en « tun ». gs : grains de sécrétion, m : mitochondrie, n : noyau et nu : nucléole.

3.3.3. Etude quantitative préliminaire sur les coelomocytes

Afin de mieux cerner l'origine de la perte de volume des individus déshydratés par rapport à ceux hydratés, nous avons estimé la taille des coelomocytes dans ces deux états physiologiques et dans les deux espèces. De plus, nous avons quantifiés le nombre de grains de sécrétion par unité de surface du cytoplasme des coelomocytes. Ces analyses ont été réalisées sur nos coupes semi-fines et ultra-fines.

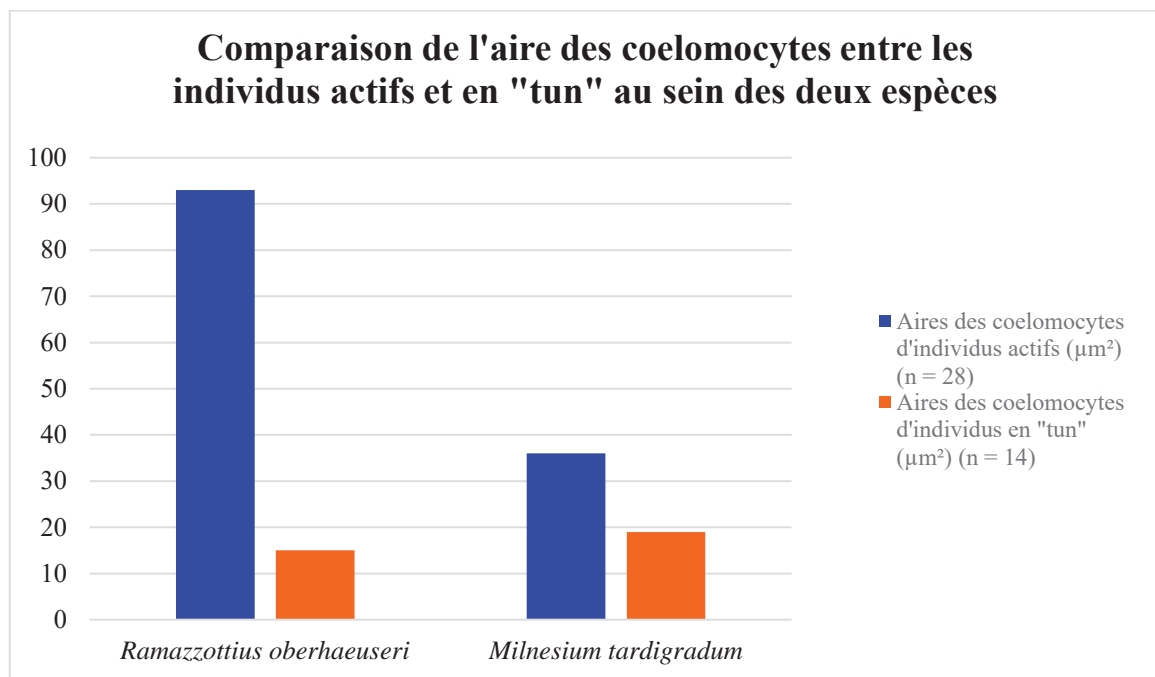


Figure 17 : Graphique de comparaison de l'aire des coelomocytes entre l'état actif et anhydrobiotique au sein des deux espèces.

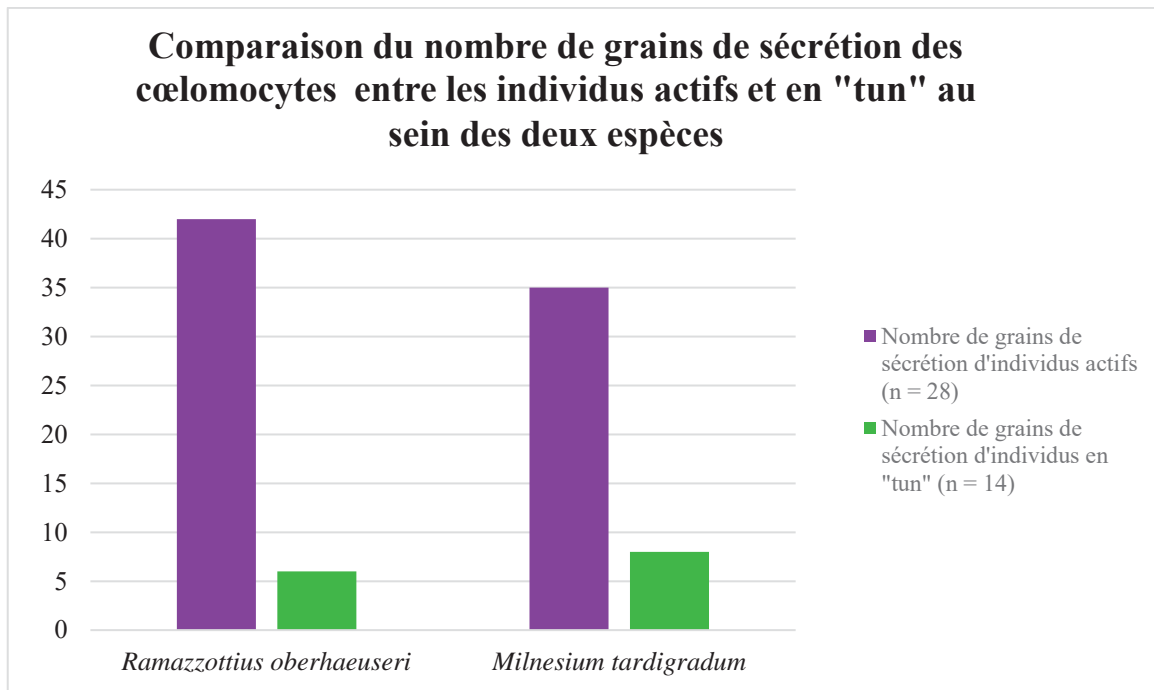


Figure 18 : Graphique de comparaison du nombre de grains de sécrétion des cœlomocytes entre l'état actif et anhydrobiotique au sein des deux espèces.

4. Discussion

4.1. Résultats de la mise en cryptobiose artificielle

Les espèces retrouvées dans divers spécimens de mousses et de lichens sont intéressantes de par leurs caractéristiques morphologiques très probablement liées à leur capacité de résister à une diminution du taux d'HR. Les expériences de mise en cryptobiose artificielle sont concluantes car nous arrivons à obtenir des « tun » facilement. Le taux d'HR de l'air extérieur en Belgique varie entre 60 et 90 % toutes saisons confondues. Cependant par temps très sec, ce taux peut descendre en dessous des 10 % et par temps humide dépasser les 90 % (Eurabo Humidité relative air 2023). Les différentes conditions d'HR testées lors des expériences sont peut-être réalisées sur une trop longue durée. Les tardigrades totalement hydratés se retrouvent dans une atmosphère où le taux d'HR diminue petit à petit durant un délai assez long, ce qui les contraint peut-être à ne pas mettre en place directement tous les mécanismes de protection contre la déshydratation et donc d'épuiser leurs réserves énergétiques. Il sera sûrement préférable de réduire le palier de 24 h utilisé au départ. Également, il faudra privilégier l'utilisation d'eau de ville pour les retours d'activité métabolique afin d'éviter un choc osmotique dû à l'eau désionisée. Précédemment, de petits essais non conventionnels ont été réalisés sur la même espèce avec une réhydratation à l'eau de ville et de meilleurs taux de réveil dans un moindre temps ont été obtenus. Sans oublier qu'il faut prendre en considération que l'état de santé des individus isolés n'est pas du tout maîtrisé. Les deux seules caractéristiques lors de l'isolement de *Ramazzottius oberhaeuseri* sont le choix d'individus pas trop petits et en mouvement, c'est-à-dire pas d'individus morts, en mue ou en « tun » et pas de juvéniles.

Ramazzottius oberhaeuseri est une espèce qui a déjà été étudiée notamment pour son extraordinaire tolérance à l'anhydrobiose. Des expériences précédentes réalisées par Jonathan C. Wright, ont démontré que *Ramazzottius oberhaeuseri* après 15 h de déshydratation à 85 % d'HR, n'a besoin que de 1 h pour récupérer un métabolisme actif (Wright 1989). Cette espèce peut également survivre durant une très longue période en état végétatif sous forme de « tun », des périodes de plus de 1600 jours ayant été enregistrées (Rebecchi 2006). Contrairement à *Hypsibius dujardini*, souvent utilisé en laboratoire mais qui présente pourtant une moins bonne résistance au stress anhydrobiotique, demandant une préparation délicate de la dessiccation

(Boothby 2018). Cette qualité de résistance à une dessiccation brutale lui viendrait apparemment de sa cuticule et plus précisément de son intracuticule qui serait plus épaisse. Cette intracuticule contenant des lipides est considérablement la barrière principale contre la dessiccation. Comme tous les eutardigrades, *Ramazzottius oberhaeuseri* a une épicuticule fine ce qui lui permet de réduire fortement la zone cuticulaire lors de la formation de « tun ». C'est d'ailleurs la seule espèce des quatre espèces observées qui forme réellement des « tun » avec une contraction longitudinale de tout son corps de sorte que les parties céphalique et caudale soient protégées, ainsi qu'une rétractation de toutes les pattes. Par opposition aux hétérotardigrades qui ont une épicuticule assez épaisse ce qui ne leur permet pas un repliement intersegmentaire important. Par conséquent, toute adaptation visant à réduire la surface exposée et donc le taux de transpiration, est une adaptation de l'épaisseur moyenne de l'épicuticule dorsale essentiellement (Wright octobre 1988). Dans une humidité en baisse constante, caractéristique des conditions de dessèchement sur le terrain, l'effondrement de la perméabilité sera de plus en plus retardé. C'est pourquoi les espèces habilitées à une déshydratation brusque, tolèrent une chute plus rapide de l'humidité de l'environnement. La rétention d'eau est un facteur critique pour déterminer la capacité d'un tardigrade à entrer avec succès dans l'anhydrobiose (Wright 1989).

4.2. Résultats des observations ultrastructurales

La différence de tailles et de contenu entre les cœlomocytes des individus actifs et ceux en dormance serait peut-être une piste à explorer en continuité de cette étude. Puisqu'on observe une nette diminution de la taille des cœlomocytes des individus en « tun ». La réduction de la taille des cœlomocytes coïnciderait donc avec la diminution de la taille des individus lorsqu'ils se mettent en « tun ». Il serait intéressant de voir par la suite si ce phénomène est présent pour d'autres types cellulaires. Concernant le contenu de ces cœlomocytes, nous pouvons suggérer que ce matériel de réserve est peut-être utilisé par les organismes pour assurer leur résistance à la déshydratation, soit en fournissant l'énergie, soit par la sécrétion de substances de résistance à la déshydratation, soit les deux. La détermination de la nature du contenu de ces grains de sécrétion devrait permettre d'en savoir davantage sur leur rôle. De plus, la quasi disparition des nucléoles dans le noyau des cœlomocytes chez les individus en « tun », semble indiquer clairement une forte diminution de l'expression des gènes ribosomiques ce qui suggère un ralentissement du fonctionnement cellulaire. Cette observation en accord avec l'état quiescent des individus en « tun ».

5. Perspectives

5.1. Culture en laboratoire

Dans le but de continuer cette étude, ce qui va être primordial, ce sera d'établir des conditions de cultures optimales pour au moins une des deux espèces. Le milieu Chalkley utilisé est similaire à l'eau Volvic et semblerait être majoritairement employé dans les études réalisant leurs propres cultures en laboratoire. Ce milieu doit être régulièrement renouvelé afin d'éviter toute contamination. Il est également toujours conseillé que le fond du récipient de culture soit rugueux pour que les tardigrades puissent se déplacer. Ceci peut être permis grâce à une fine couche d'agarose ou de gélose ou simplement en égratignant le fond. Cette culture ne doit pas être recouverte de façon à ce que l'oxygène circule. Il est préférable que la pièce de culture reste à une température constante d'environ 20 °C et à un taux d'HR constant aux alentours de 50 % (Roszkowska 2021). Selon la littérature, *Ramazzottius oberhaeuseri* serait plutôt une espèce phytophage se nourrissant de *Pseudochlorella*, *Chlorella* et de mousses fragmentées, tandis que *Milnesium tardigradum* adulte semblerait être canivore en se nourrissant de rotifères tels que *Philodina citrina* ou *Lecane inermis* (Avdonina 2007). Cependant apparemment les juvéniles de l'espèce *Milnesium tardigradum* ne seraient pas encore aptes à se nourrir de rotifères, il est donc préférable de commencer par des algues (Schokraie 2010). Le contrôle sur les cultures permettrait de pouvoir travailler avec des individus dont l'âge et les réserves énergétiques sont maîtrisés. Nous pourrions alors débiter la préparation des échantillons pour la TEM avec des individus vivants et en « tun » étant dans un état de santé similaire.

5.2. Identification des espèces par séquençage

Les espèces de tardigrades sont décrites sur base de critères morphologiques qui sont récemment complétés par des critères moléculaires grâce aux progrès scientifiques. Cette combinaison avec des outils bioinformatiques pourra donc permettre de mieux comprendre la régulation des gènes qui sous-tendent les fonctions biologiques et la physiologie liées à l'anhydrobiose. Il est essentiel d'avoir la certitude des espèces avec lesquelles nous travaillons, c'est pourquoi l'utilisation de la méthode « DNA barcoding » ou code-barre ADN en français sera la plus adaptée. Cette technique permet d'obtenir des données génétiques standardisées à partir de spécimens référencés dans des bases de données qui ont été identifiés par des taxonomistes. Le nom « code-barre ADN » correspond à un court fragment d'ADN dont la

séquence est caractéristique de l'espèce (Pompanon 2019). Pour les espèces animales, c'est la sous-unité I de la cytochrome oxydase c (COI) qui est utilisée comme fragment de référence du génome mitochondrial. Ce gène mitochondrial COI de 650 pb a l'avantage d'être présent en de nombreuses copies, de plus la variabilité des séquences de ce gène est faible entre les individus d'une même espèce et élevée entre les individus d'espèces différentes. Les fragments d'ADN vont d'abord être extraits des échantillons, puis amplifiés par PCR avec des amorces universelles et enfin séquencés à haut débit pour ensuite être assignés à des espèces par comparaison avec des séquences de référence (Guidetti 2022).

5.3. Amélioration de la préparation des échantillons pour la TEM

Le protocole de fixation utilisé a déjà été adapté pour les tardigrades mais ce n'est toujours pas optimal. Il y a une perte du contenu cellulaire trop importante surement dû à l'acétone. La difficulté étant de devoir utiliser des solvants non hydratés afin de maintenir les individus en « tun ».

5.4. Protéomique

Une description complète des protéines présentes à l'état actif constitue une base précieuse pour la suite de cette étude. Plus important encore, une carte de référence des protéines nous permettra d'entreprendre une analyse protéomique quantitative afin de détecter les protéines dont les niveaux d'expression sont différents dans l'état actif et dans l'état anhydrobiotique. Une proposition de méthodologie serait de lyser par sonication les cellules d'un ensemble d'individus de la même espèce afin de réaliser un gel 2 D à haute résolution pour une comparaison avec les protéines déjà répertoriées dans des bases de données (Schokraie 2010). Le but premier serait d'identifier particulièrement les protéines TDP. Et par la suite d'essayer peut-être de créer un mutant perte de fonction dans le but de pouvoir confirmer la surexpression de ces TDP lors du passage en anhydrobiose.

5.5. Intérêt médical, pharmaceutique, alimentaire et biotechnologique

Le domaine médical va s'intéresser à la conservation des cellules, le besoin de stabiliser les cellules à l'état sec ou congelé est particulièrement urgent pour la préservation des organes et des tissus pour le transport et les applications médicales, ainsi que pour le stockage à long terme. L'industrie alimentaire va également être concernée par la conservation, le stockage et le transport de denrées. Quant à l'industrie pharmaceutique et la biotechnologie, elles vont tenter de prolonger la durée de vie des médicaments et des enzymes à base de protéines. Les progrès de l'ingénierie anhydrobiotique et l'optimisation du processus de dessiccation et de stockage devraient permettre d'améliorer la conservation de tout matériel biologique pendant une longue période à l'état sec. L'utilisation de métabolites non toxiques tels que le tréhalose comme principal lyoprotecteur intracellulaire a déjà fait ses preuves sur le marché. Parmi les études récentes, la micro-injection de tréhalose dans des ovocytes humains a fourni une protection significative contre le stress associé à la congélation (Eroglu 2002). L'anhydrobiose pourrait également être appliquée aux vaccins. Le processus anhydrobiotique peut produire un vaccin sec qui réagit à l'eau, c'est-à-dire une fois qu'il est injecté dans le corps. Cette technologie de vaccins secs pourrait aussi être adaptée pour permettre la libération lente d'un vaccin, éliminant ainsi le besoin de rappels. Cela permettrait de ne plus avoir besoin de réfrigérer les vaccins, ce qui rendrait les vaccins secs plus largement disponibles dans les pays en voie de développement par exemple (Schill 2009). Les tardigrades pourraient peut-être un jour devenir un modèle génétique comme le zebrafish. Des études systématiques sur les moyens d'assouplir et/ou de rendre perméable leur cuticule sans effets négatifs sur la survie, faciliterait grandement la mise au point de techniques telles que l'électroporation, la fixation, etc. La préservation de l'intégrité cellulaire en cas de dessiccation bénéficie d'un intérêt tout particulier (Czernekova 2021).

6. Bibliographie

- Arakawa K. (2022). Examples of Extreme Survival: Tardigrade Genomics and Molecular Anhydrobiology. *Annual Review of Animal Biosciences*, pp. 17-37.
- Avdonina A. M., Biserova N. M., Bertolani R., & Rebecchi L. (2007). Ultrastructure of the digestive system of *Ramazzottius tribulosus* and *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada) in relationship with diet. *J. Limnol.*, pp. 5-11.
- Bertolani R. (1992) Tardigrada. In: Adiyodi KG, Adiyodi RG (eds) Reproductive biology of invertebrates. Sexual differentiation and behaviour, *Wiley*, pp. 255-266
- Bertolani R. (2001) Evolution of the reproductive mechanisms in tardigrades. A review. *Zoologischer Anzeiger*, pp. 247-252.
- Bingemer J., Hohberg K. (2017, December). An illustrated identification key to the eutardigrade species (Tardigrada, Eutardigrada) presently known from European soils. *ResearchGate*, pp. 127-149.
- Boothby T. C., Tapia H., & Brozena A. H. (2017, March 16). Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Molecular Cell*, pp. 975-984.
- Cold Spring Harbor Protocols*. (2018). Récupéré sur Chalkley's Medium Plus Soil Extract: <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2018/11/pdb.rec102889.short>
- Czernekova M., & Vinopal S. (2021). The tardigrade cuticle. *Sciendo*, pp. 127-146.
- Dewel R. A., Clark W. H. (1973) Studies on the tardigrades. II. Fine structure of the pharynx of *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840. *Tissue Cell*, pp. 147-159.
- Dewel R. A., Dewel W. C. (1979) Studies on the Tardigrades. IV. Fine structure of the hindgut of *Milnesium tardigradum* Doyère. *Journal of Morphology*, pp. 79-110.
- Eibye J. J. (2001) Are the supportive structures of the tardigrade pharynx homologous throughout the entire group? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, pp. 1-11.
- Ellner S. P., Hairston Jr., N. G., (1994). Role of overlapping generations in maintaining genetic variation in a fluctuating environment. *American Naturalist*, pp. 403-417.
- Eroglu, A., Toner, M., & Toth, T. L. (2002, January). Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility*, pp. 152-158.

- Guidetti R., Altiero T. & Rebecchi L. (2011, March). On dormancy strategies in tardigrades. *ELSEVIER Journal of Insect Physiology*, pp. 567-576.
- Guidetti R., C. M., G. I., E. C., F. M. I., R. L. & R. O. S (2022, March 10). Morphology and taxonomy of the genus *Ramazzottius* (Eutardigrada; Ramazzottiidae) with the integrative description of *Ramazzottius kretschmanni* sp. nov. *The European Zoological Journal*, pp. 346-370.
- Greven H. (2015) About the little water bear – A commented translation of Goeze’s note „Ueber den kleinen Wasserbär“ from 1773. *Acta Biologica Benrodis*, pp. 1-27.
- Halberg K., Møbjerg N. (2012, February) First evidence of epithelial transport in tardigrades: a comparative investigation of organic anion transport. *Journal of Experimental Biology*, pp. 497-507.
- Halberg K. A., Jørgensen A., Møbjerg N. (2013, December 31) Desiccation Tolerance in the Tardigrade *Richtersius coronifer* Relies on Muscle Mediated Structural Reorganization. *PLOS ONE*.
- Humidité relative (HR %) de l'air au-dessus des solutions salines saturées.* (2017, July).
Récupéré sur Laboratoire de lutte biologique UQÀM d'Eric Lucas:
<https://www.laboluttebio.uqam.ca/wordpress/wp-content/uploads/2017/07/OUTIL-HR-sels.pdf>
- Humidité relative air.* (2023). Récupéré sur eurabo:
<https://www.eurabo.be/fr/lexique/Humidite-relative-air>
- Jönsson K. I., Rabbow E., Schill R. O., Harms-Ringdahl M., Rettberg P. (2008) Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*, pp. 729-731.
- Maas A., Waloszek D. (2001) Cambrian Derivatives of the Early Arthropod Stem Lineage, Pentastomids, Tardigrades and Lobopodians An 'Orsten' Perspective. *Zoologischer Anzeiger*, pp. 451-459.
- Marcus E. (1929) Tardigrada. In: Bronn HG (ed) Klassen und Ordnungen des Tierreichs, vol V. Akademische Verlagsgesellschaft, *Leipzig*, pp. 1-608.
- Møbjerg N., Neves R. C. (2020, December). New insights into survival strategies of tardigrades. *ELSEVIER Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*.
- Nelson D. R., Guidetti R. & Rebecchi L. (2010). Chapter 14: Tardigrada. *ELSEVIER Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, pp. 455-484.
- Nelson D. R., Guidetti R. & Rebecchi L. (2020). Chapter 15: Phylum Tardigrada. *ELSEVIER Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, pp. 505-522.

- Pompanon F., & Shehzad W. (2019, Février 3). Code-barres ADN pour caractériser la biodiversité. *Encyclopédie de l'environnement*.
- Rebecchi L., Guidetti R., Borsari S., Altiero T., Bertolani R. (2006) Dynamics of long-term anhydrobiotic survival of lichen-dwelling tardigrades. *Hydrobiologia*, pp. 23–30.
- Reynolds E. (1963, April 17). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, pp. 208-212.
- Roszkowska M., Wojciechowska D., Kmita H., Cerbin S., Dziuba M. K., Fiałkowska E., . . . Kaczmarek Ł. (2021, March 22). Tips and tricks how to culture water bears: simple protocols for culturing eutardigrades (Tardigrada) under laboratory conditions. *The European Zoological Journal*, pp. 449-465.
- Schill, R. O. (2018). Water Bears: The Biology of Tardigrades (Vol. 2 Zoological Monographs). *Springer*.
- Schill R. O., Mali B., Dandekar T., Schnölzer M., Reuter D., & Frohme M. (2009, February 10). Molecular mechanisms of tolerance in tardigrades: New perspectives for preservation and stabilization of biological material. *Elsevier Biotechnology Advances*, pp. 348-352.
- Schokraie E., Warnken A. H.-W., Mali B., Frohme M., Förster F., Dandekar T., . . . Schnölzer M. (2010, March 3). Proteomic Analysis of Tardigrades: Towards a Better Understanding of Molecular Mechanisms by Anhydrobiotic Organisms. *Plos One*.
- Tunnacliffe A., Lapinski J. (2003). Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, pp. 1755-1771.
- Von Kennel J. (1891) Die Verwandtschaftsbeziehungen und die Abstammung der Tardigraden. *Sitzungsberichte Ges Dorpat*, pp. 504-512.
- Wexler A., Hasegawa S. (1954, July). Relative Humidity-Temperature Relationships of Some Saturated Salt Solutions in the Temperature Range 0° to 50°C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, pp. 19-26.
- Wright J. C. (1988, October 10). Structural Correlates of Permeability and Tun Formation in Tardigrade Cuticle: An Image Analysis Study. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, pp. 23-39.
- Wright J. C. (1988, July 4). The Tardigrade Cuticle. I. Fine Structure and the Distribution of Lipids. *ISSUE & CELL*, pp. 745-758.
- Wright J. C. (1989, March 1). Desiccation Tolerance and Water-Retentive Mechanisms in Tardigrades. *Journal of Experimental Biology*, pp. 267-292.

Wright J. C., Westh P., Ramlov H. (1992) Cryptobiosis in Tardigrada. *Biological Review*, pp.1-29.

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Tissulaire

Sous la direction du Docteur THELEN Nicolas et du Professeur THIRY Marc

Mémoire présenté par Bellot Fanny

Étude de la morphologie ultrastructurale de différentes espèces de tardigrades lors du passage en cryptobiose

Les tardigrades sont de microscopiques ecdysozoaires faisant partie du clade monophylétique des panarthropodes. Proches des arthropodes et des onychophores, ils forment un embranchement à part entière encore très discuté de nos jours (Von Kennel 1891 in Schill 2018). Ils sont représentés par deux grandes classes ; les eutardigrades et les hétérotardigrades (Arakawa 2022). Ce sont des animaux terrestres, marins et limnoterrestres, présents au sein d'environnements variés à travers le monde. Les tardigrades ont besoin d'un film d'eau pour être actifs (Nelson 2010). Ces animaux extrémophiles sont particulièrement connus pour leur capacité cryptobiotique en formant des « tun » ou tonnelets. En effet, lors de contraintes environnementales, les tardigrades peuvent arrêter leur métabolisme de manière réversible pouvant se maintenir tel quel au cours d'une durée aléatoire et prolongée (Wright 1992 in Schill 2018). Nous avons mis au point une méthode rapide d'isolement et de mise en cryptobiose artificielle de deux espèces de tardigrades, *Ramazzottius oberhaeuseri* et *Milnesium tardigradum*. La morphologie ultrastructurale est comparée entre les individus actifs et en « tun » en microscopie électronique à transmission (TEM). Le contraste entre ces deux états est principalement observé au niveau des différences de tailles et de contenu des cellules de réserves appelées cœlomocytes. La taille des cœlomocytes des individus en « tun » est nettement diminuée par rapport aux actifs chez l'espèce *Ramazzottius oberhaeuseri*. Concernant *Milnesium tardigradum*, une légère diminution et une grande variabilité de la taille des cœlomocytes des individus en « tun » est observée. Une réduction du nombre de grannules de sécrétion est également visible chez les individus en « tun » peu importe l'espèce.

Mots clés : tardigrades – cryptobiose – *Ramazzottius oberhaeuseri* & *Milnesium tardigradum*

Année académique 2022 – 2023