

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de la dessiccation et de la diversité clonale d'une population de rotifères bdelloïdes (*Adineta vaga*)

Hanot Mambres, Delphine

Award date:
2010

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude de la dessiccation et de la diversité clonale d'une population de
rotifères bdelloïdes (*Adineta vaga*)**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Delphine HANOT MAMBRES

Janvier 2010

TABLE DES MATIERES

Introduction	3
<i>I. Introduction générale.....</i>	<i>3</i>
1. Généralités.....	3
2. Anatomie	3
3. Répartition géographique	4
4. Régime alimentaire	5
5. Prédateurs et parasites	5
<i>II. L'anhydrobiose.....</i>	<i>5</i>
<i>III. Modes de reproduction dans le monde vivant.....</i>	<i>7</i>
1. Le paradoxe de la sexualité	7
2. La reproduction chez les rotifères	10
3. L'asexualité chez les rotifères bdelloïdes.....	10
3.1. Critères morphologiques et comportementaux	10
3.2. Critères moléculaires connus	11
3.2.1. La méiose	11
3.2.2. L'effet Meselson	11
3.2.3. Eléments transposables	13
3.3. Critères moléculaires à expérimenter	14
3.3.1. Congruence phylogénétique	14
3.3.2. Génétique des populations	14
3.3.3. Génomique comparative	16
4. Diversification et survie à long terme des rotifères bdelloïdes	17
4.1. La capacité de résistance à la dessiccation.....	17
4.2. Les Echanges horizontaux d'ADN.....	18
<i>IV. Les marqueurs moléculaires.....</i>	<i>19</i>
1. Généralités.....	19
2. Les SSR ou microsatellites.....	20
<i>V. Les microsatellites et les systèmes de reproduction</i>	<i>20</i>
<i>VI. Objectifs du mémoire.....</i>	<i>21</i>
Matériel et méthodes	23
<i>I. Matériel biologique.....</i>	<i>23</i>
1. Culture de rotifères bdelloïdes.	23
2. Lancement d'une culture de <i>Adineta vaga</i>	23
3. Culture de <i>Escherichia coli</i>	23
4. Collecte de <i>Adineta vaga</i>	24
<i>II. Extraction de l'ADN.....</i>	<i>24</i>
1. Lavage des œufs de rotifères.	24
2. Préparation de l'ADN génomique à partir d'œufs de rotifères.	24
3. Extraction de l'ADN génomique de rotifères à partir d'une faible quantité d'adultes.	25
3.1. Chelex :	25
3.2. <i>DNeasy Blood and tissue Kit</i> :	25
3.3. <i>QiAamp DNA MicroKit</i> :	25

4. Plugs agarose et extraction de l'ADN	26
<i>III. Marqueur CO1 pour l'identification de l'espèce.</i>	27
1. Amplification du marqueur CO1	27
2. Electrophorèse en gel d'agarose	27
3. Séquençage	27
4. Identification des gènes	27
<i>IV. Dessiccation et analyse génétique</i>	28
1. Dessiccation lente	28
2. Réhydratation	28
3. Dessiccation rapide	28
4. Evaluation du taux de survie	28
5. Pulsed Field Gel électrophorèse (PFGE).	29
<i>V. Analyse de la génétique des populations</i>	30
1. Microsatellites et conception des amorces.	30
2. Amplification des microsatellites	30
3. Amplification des microsatellites pour le génotypage.	30
4. Génotypage via l'électrophorèse capillaire ABI 3130xl	31
5. Analyse des données de génétique de population	31
6. Analyse phylogénétique	31
Résultats et discussion	32
<i>I. Phénomène de dessiccation</i>	32
1. Condition de dessiccation et taux de survie	32
2. Extraction de l'ADN et migration PFGE	35
<i>II. Projet génoscope</i>	37
<i>III. Génétique des populations</i>	38
1. Collecte et détermination de l'espèce.....	38
2. Culture et extraction de l'ADN	39
3. Conception des amorces des microsatellites	39
4. Test des microsatellites par PCR classique	40
5. Génotypage des microsatellites avec des dntps fluorescents	40
6. Genotypage des microsatellites avec des amorces fluorescentes.....	40
Conclusions et perspectives	45
<i>I. Dessiccation et Survie à long terme</i>	45
<i>II. Projet Génoscope</i>	48
<i>III. Génétique des populations</i>	49
<i>IV. Conclusion générale</i>	50
Références	51
<i>I. Texte</i>	51
<i>II. Figures</i>	58

Etude de la dessiccation et de la diversité clonale d'une population de rotifères bdelloïdes (*Adineta vaga*)

HANOT MAMBRES Delphine

Résumé

Les organismes eucaryotes asexués disparaissent généralement précocement car ils ne s'adaptent pas aussi rapidement à l'environnement changeant que les organismes sexués. Les rotifères bdelloïdes semblent cependant déroger à cette règle. Ces microorganismes aquatiques et semi-aquatiques, résistants à la dessiccation, semblent persister depuis plus de 40 millions d'années sans sexe, et présentent une diversité spécifique élevée. Des études menées sur la bactérie *Deinococcus radiodurans* ont prouvé que les radiations ionisantes et la dessiccation déclenchent des cassures double-brins dans l'ADN (DSBs), qu'elle est capable de réparer. Il a aussi été démontré que les rotifères bdelloïdes résistent à de hautes doses de radiations ionisantes en réparant les DSBs qu'elles génèrent. Ceci serait une adaptation à la dessiccation comme chez *D. radiodurans*. La dessiccation engendrerait-elle aussi des DSBs chez les rotifères bdelloïdes ? Et, suite à des cycles répétés de dessiccation dans leur habitat temporaire, la réparation imparfaite des DSBs pourrait-elle générer de la variabilité génétique, leur assurant une adaptation à long terme ?

Notre intérêt s'est porté sur l'étape préliminaire de la résolution de cette hypothèse. L'impact de la dessiccation sur l'intégrité du génome du rotifère bdelloïde *Adineta vaga* a été étudié à l'aide de la *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Pour se faire, les mises au point des conditions de dessiccation, d'extraction de l'ADN et de la PFGE ont été nécessaires. Les profils génomiques obtenus pour *A. vaga*, suite à une dessiccation de 1 à 14 jours, n'ont pas mis en évidence de DSBs. Afin de confirmer l'absence de cassures d'ADN suite à la dessiccation, le profil génomique de l'ADN des bdelloïdes desséchés doit être étudié suite à une période de sécheresse supérieure à 14 jours.

Parallèlement à cela, une étude de la diversité génétique d'une population d'*A. vaga* d'une mousse temporaire a été réalisée. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer la variabilité clonale dans une population et de vérifier les caractéristiques génétiques pouvant suggérer le mode de reproduction. Ceci représente la première étude de génétique de population d'une espèce de bdelloïde à l'aide de microsatellites. La première étape a été la caractérisation et l'optimisation de microsatellites polymorphes. Ensuite, le génotypage a pu être effectué sur des individus *A. vaga* de la population. La diversité génétique élevée révèle la présence de plusieurs clones dans une mousse temporaire. Les caractéristiques génétiques obtenues indiquent que, s'ils sont asexués, ils ont développé un mécanisme leur assurant les avantages génétiques des organismes sexués. La résistance à la dessiccation pourrait en être l'origine.

Mémoire de Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur : K. Van Doninck

INTRODUCTION

I. Introduction générale

1. Généralités

Les rotifères sont des microorganismes métazoaires aquatiques ou semi-aquatiques que l'on retrouve dans toutes les régions du monde (1). Ils ont été découverts pour la première fois par Leeuwenhoek à la fin du 17^e Siècle (2). Ils se subdivisent en 3 classes : les seisonides, les monogonontes et les bdelloïdes (3). Les rotifères bdelloïdes, asexués, sont répartis en 461 espèces (4). Les monogonontes se reproduisent par parthénogenèse cyclique et représentent le groupe le plus large avec plus de 1500 espèces. Enfin, les seisonides, exclusivement sexués, ne sont représentés que par 3 espèces marines connues : *Seison annulatus*, *Seison nebaliae* et *Seison africanus* (3, 5).

2. Anatomie

(Figure 1) Les rotifères sont des triploblastes eutrochozoaires (6). Si des plis apparaissent sur leur tégument syncytial, ils sont pourtant non métamérisés (7). Ce tégument syncytial contient une lamina intracytoplasmique composée de deux protéines filamenteuses keratine-like, liées par des ponts disulfures. Les espèces possédant une lamina épaisse qui rend le corps peu flexible s'appellent les loricates. Celles ayant une lamina très fine sont appelées les illoricates (2) L'espèce qui nous intéresse ici, *Adineta vaga*, est un rotifère bdelloïde illoricate. Cette particularité rend la détermination de l'espèce difficile car aucune fixation n'est possible pour l'observation microscopique.

Les rotifères peuvent avoir une taille allant de 40 à 2000 µm. Les rotifères bdelloïdes ne dépassent généralement pas 700 µm (8). Les rotifères sont eutéliques (9), cela signifie que le nombre de leurs cellules est fixé dès la naissance. Ils grandissent ensuite par grossissement cellulaire (10). Les membranes cytoplasmiques disparaissent dans les tissus post-embryonnaires, donnant naissance à des syncytia (7). Etant eutéliques, mais présentant des tissus syncytiaux, on ne peut pas évaluer le nombre de cellules mais uniquement le nombre de noyaux, estimé à 1000 (7, 11).

Ces microorganismes se distinguent de tous les autres métazoaires par la structure ciliée qu'ils présentent au niveau de la tête, la corona, et par la présence d'un mastax au niveau du pharynx (7). Chez certaines espèces, la corona est développée en deux anneaux concentriques que sont le trochus et le cingulum (2). La corona, caractérisée par la présence de rotors chez ces espèces, a donné le nom au phylum rotifera, du latin rota « roue » et ferre « porter » (2) (figure 2). Chez d'autres espèces, telle que les bdelloïdes du genre *Adineta*, la corona est seulement constituée d'un champ de cils ventraux (figure 3) (8).

La corona a non seulement une fonction locomotrice chez certaines espèces, mais les cils, créant un courant, dirigent également les particules alimentaires vers l'entonnoir buccal puis le pharynx modifié en appareil masticateur caractéristique, le mastax (7, 12). Ce dernier est une structure fortement musculeuse constituée de plusieurs pièces chitineuses dures et complexes appelées les trophi. L'ensemble forme un jeu de mâchoires sclérosées internes. Les

aliments passent ensuite dans un tube digestif complet, excepté chez certains genres (*Asplanchna*, *Asplanchnopus*) où l'intestin et l'anus sont absents. Ceux-ci ont un estomac aveugle et les excréments sont rejetés par la bouche (7, 13). La plupart des rotifères ont des glandes annexes au tube digestif : des glandes salivaires au niveau du mastax et des glandes gastriques dans l'estomac. Les rotifères sont dépourvus de système circulatoire (1, 12) : après la digestion, les substances nutritives traversent la paroi du tube digestif et circulent dans le pseudocoelome où elles alimentent les cellules du rotifère. Les déchets sont alors rejetés du métabolisme cellulaire dans le liquide pseudocoelomique et passent par des tubules protonéphridiens qui servent de système excréteur. Les déchets sont filtrés au niveau des cellules-flammes qui assurent à la fois l'excrétion et l'osmorégulation du milieu intérieur (14). Chez certains genres tels que *Habrotrocha* (bdelloïde) et *Ascomorpha*, il n'y a ni cavité dans l'estomac ni glande gastrique car la digestion n'est pas extracellulaire. Chez ces derniers, les aliments sont digérés dans des vacuoles circulant dans la masse syncytiale de l'estomac (7).

En plus de la tête et du tronc, les rotifères possèdent un pied et éventuellement des « orteils » connectés à des glandes pédieuses leur permettant de se fixer au substrat. Ils ont des muscles lisses et striés et, bien que certains rotifères soient sessiles, la plupart ont des structures leur permettant de ramper ou de nager.

Le système nerveux est simple. Leur ganglion cérébral est situé dorsalement sous la corona. Ce système se compose de moins de 200 neurones et moins de 50 interneurons. Ils possèdent des organes sensoriels tactiles et photosensibles. Les rotifères bdelloïdes ont une antenne sensitive située dorsalement entre la tête et le tronc, au niveau du col (7, 15). Le système respiratoire est absent chez ces microorganismes (12, 1).

Le système reproducteur dépend de la classe de rotifère. Cependant, toutes les femelles présentent des oocytes produits par des ovaires appelés vitellaria. Les rotifères sont généralement ovipares mais certains genres sont ovovivipares (par exemple: *Asplanchna* et *Cupelopagis*) (7).

Il n'est pas évident de connaître l'espérance de vie des rotifères dans leur milieu naturel, mais des études ont permis d'évaluer la longévité des rotifères bdelloïdes en laboratoire. L'équipe du professeur C. Ricci a évalué l'espérance de vie de chacun des 9 genres de bdelloïdes en condition de laboratoire (24 °C, 12 h lumière/12 h obscurité) (16) Celle-ci s'étend de 17 jours pour *Adineta vaga* à 76 jours pour *Matrotrachela insolita* (16).

3. Répartition géographique

Les rotifères sont communs en milieux aquatiques dulcicole et marin. Certaines espèces vivent également dans des habitats terrestres humides. Les monogonontes se retrouvent en eaux douces comme en eau marine, tandis que les seisonides ne vivent qu'en milieu marin. Étant dotés d'une grande capacité de survie en milieux éphémères, la majorité des rotifères bdelloïdes peuple les habitats semi-aquatiques que sont les mousses, les lichens et le sol (7). La répartition géographique de ces derniers est particulièrement étendue vu leur résistance à la dessiccation et au gel. Quelques espèces de rotifères bdelloïdes font aussi partie du zooplancton (*Rotaria*) (8, 17).

Il semblerait qu'il existe une zonation latitudinale lorsqu'on analyse les aires de distribution des espèces de rotifères les plus communes. Mais d'une manière générale, c'est la nature du

biotope et non la région géographique qui est déterminante pour la répartition de la plupart des espèces de rotifères. Le cosmopolitisme est donc très important. Il faut toutefois noter que quelques rares espèces sont endémiques à une région particulière (notamment *Keratella reducta* connue uniquement en Afrique du sud) (17, 18).

4. Régime alimentaire

Les rotifères se nourrissent de microorganismes tels que des bactéries, des spores de champignons, des petites algues vertes et des diatomées et de micro détritus proches de 15 μm (19, 20). Peu de recherches ont été menées à ce sujet, mais on peut évaluer l'alimentation des rotifères en étudiant la longueur de l'entonnoir buccal et donc la profondeur du mastax (12). Ce dernier a d'ailleurs une grande importance taxonomique (7). Il existe six types de mastax. Comme vu précédemment, cet organe caractéristique des rotifères est constitué de pièces dures de formes variées. Le type moyen, appelé mallée (figure 4) est composé de deux ramis qui s'articulent sur une lame impaire, le fulcrum. Deux unci dentés prolongés par un manubrium sont rattachés aux ramis par un repli cuticulaire. Grâce à une bonne musculature, l'ensemble peut bouger tant dans le plan vertical qu'horizontal. Cela permet au rotifère de saisir la nourriture et de la broyer (figure 5). Les autres types de mastax dérivent tous de ce type moyen, par réduction ou hypertrophie de différentes pièces (18). Le type ramé, commun à la plupart des espèces bdelloïdes, accentue le caractère broyeur de l'animal (17). Le type virgé est adapté à la succion. Les types forcipé et incubé permettent une adaptation à la préhension. Enfin, certains rotifères sont adaptés à la dilacération grâce à un mastax de type unciné (18).

5. Prédateurs et parasites

Les rotifères aquatiques jouent un rôle important dans la chaîne alimentaire aquatique car ils forment les organismes majoritaires du zooplancton (2). Ils sont la proie de nombreux invertébrés, de larves de poissons, ainsi que de poissons adultes planctonivores. Bien qu'ils aient développés une série de défenses variant selon les espèces, telles que la transparence, la vitesse de nage, les épines, la taille ou la vitesse de croissance de la population, ils constituent la majeure partie du régime alimentaire des alevins (7).

Concernant les rotifères bdelloïdes, semi-aquatiques, ils sont les proies de petits prédateurs tels que les rhizopodes, les tardigrades, les nématodes et les turbellariés (20). Ils servent également d'hôte pour plus d'une soixantaine d'espèces de mycètes. Parmi celles-ci, le genre *Rotiferophthora*, érigé par le docteur G. L. Barron, comporte des espèces parasites spécifiques des rotifères bdelloïdes (21). Les mycètes sont les seuls parasites connus capables de s'attaquer aux rotifères bdelloïdes. Mais l'utilisation de techniques d'appât et de plus amples analyses sur les populations naturelles pourrait permettre de découvrir de nouveaux types de prédateurs et parasites (19). Ainsi, à la fois proies et prédateurs, les rotifères bdelloïdes jouent un rôle significatif dans la formation de la biocénose du sol.

II. L'anhydrobiose

La dessiccation, privant les organismes de l'eau qu'ils renferment, est un événement qui entraîne la mort chez la plupart des êtres vivants. Les rotifères bdelloïdes vivent dans des milieux aquatiques éphémères et possèdent la capacité d'y résister à n'importe quel stade de

leur vie (22). Ce phénomène fut découvert pour la première fois au début du 18^{ème} Siècle (1702) par le scientifique A. van Leewenhoek (23).

En cas de dessiccation, l'évaporation déclenche, chez les rotifères bdelloïdes, l'entrée dans un état de dormance appelé l'anhydrobiose (23). Cet état modifie toute l'organisation cellulaire. Une série de modifications physiologiques et morphologiques est nécessaire pour la préparation à l'anhydrobiose (22). Le rotifère se contracte en adoptant une forme appelée « tun » (Figure 6). Le volume du pseudocoelome est réduit de 50 %, les cellules et les organes sont condensés et le volume du cytoplasme diminue. L'animal desséché ne fait plus que 30 à 40 % de sa taille initiale (7) et ne dépasse pas 30 % de sa masse hydratée (22, 24, 25). Durant l'anhydrobiose, la respiration, le métabolisme et le vieillissement semblent s'arrêter (23, 26, 27, 28). Les bdelloïdes ne sont pas morts pour autant puisque l'anhydrobiose est réversible et qu'ils peuvent à nouveau se reproduire après cet état de dormance. Leur existence, et donc leur vieillissement reprennent là où ils s'étaient arrêtés avant l'anhydrobiose, ignorant le temps passé sous cet état (29). Ce phénomène a été dénommé le « *sleeping beauty* » ou « la belle au bois dormant » (23, 27). Les rotifères bdelloïdes sont capables de survivre à une dessiccation de plusieurs années (23, 24). Le taux de survie dépend des conditions dans lesquelles ils se trouvent avant et pendant la dessiccation. Ainsi, l'état de nutrition, la vitesse de dessiccation, la température, l'humidité et la durée de dessiccation influencent le taux de survie de l'animal (7).

Les mécanismes moléculaires précis de cette capacité de résistance restent encore à découvrir chez les rotifères bdelloïdes (30). Ils ne sont d'ailleurs pas les seuls à tolérer ces conditions défavorables. Plusieurs stratégies de résistance existent dans le monde vivant. Les paragraphes suivants décrivent certaines de ces stratégies rencontrées dans la nature.

Un mécanisme très répandu, pour tolérer la déshydratation, est la surproduction de tréhalose chez certains animaux et champignons ou d'autres sucres tels que le sucrose chez les plantes (30). La perte en eau entraîne une osmolarité extracellulaire élevée. Les sucres synthétisés s'accumulent dans les cellules et jouent le rôle d'osmorégulateur (23). Ils remplacent les molécules d'eau autour des protéines et des membranes cellulaires en établissant des ponts hydrogènes avec la partie polaire hydrophile des phospholipides membranaires et avec la surface des protéines. Ils évitent ainsi leur dénaturation, leur agrégation et leur inactivation (31, 32, 23). La formation d'un manteau vitrifié autour des membranes et l'inhibition de l'évaporation à l'interface des membranes contribuent aussi à la préservation des membranes lipidiques des cellules en cas d'anhydrobiose (32).

Les disaccharides non réducteurs ne sont pas toujours requis pour la tolérance à la dessiccation. En effet, ils ne semblent pas nécessaires chez la levure et seraient même absents chez les rotifères bdelloïdes (33). Un grand nombre de recherches a donc été réalisé afin de découvrir les gènes clefs et les protéines indispensables dans la tolérance à la déshydratation (30). Ainsi, une nouvelle adaptation a été mise en évidence. On a pu observer l'accumulation de protéines hautement hydrophiles chez de nombreux organismes tolérants à la dessiccation (30). Les polypeptides les mieux caractérisés dans ce domaine sont les protéines LEA (Late Embryogenesis Abondant).

Ces LEA ont été identifiées dans les graines des plantes, chez des invertébrés et des bactéries. Trois groupes ont été décrits. Les protéines du groupe 1 et 2 se trouvent principalement chez les plantes et ont notamment une action au niveau des graines pour ralentir la déshydratation durant leur développement. Les protéines du groupe 3 sont plus

largement répandues puisque pratiquement toutes les protéines LEA des invertébrés appartiennent à ce groupe et qu'on les retrouve aussi chez les végétaux. Ces dernières semblent avoir une fonction essentielle dans la tolérance à la dessiccation. En cas de stress hydrique, elles sont capables de prévenir l'agrégation de nombreuses autres protéines, en évitant l'interaction entre protéines et/ou protègent l'activité des membranes cellulaires probablement en s'y associant (30).

La dessiccation est également néfaste pour le génome. Son intégrité doit donc aussi être préservée. Deux types de stratégies sont envisagés dans la nature : sa protection et sa réparation :

Ainsi, par exemple, certaines bactéries sont capables de former des spores résistantes en cas de stress environnemental qui protègent leur ADN. En effet, par exemple, la bactérie *Bacillus sp.* peut former une spore qui résiste à toutes sortes de stress physiques tels que la dessiccation. Les spores sont capables de détecter les stimuli de l'environnement et si les conditions redeviennent favorables, elles reprennent leur croissance végétative (34). La raison principale de la résistance des spores à la dessiccation semble être la présence en abondance de la petite protéine acide-soluble (SASP) de type a/b qui protège l'ADN des dommages causés par la déshydratation (34). Au contraire, la bactérie gram positive *Deinococcus radiodurans*, découverte en 1956 par le professeur A. W. Anderson, ne protège pas son ADN durant la dessiccation. Elle est capable de résister aux fortes radiations ionisantes comme à la dessiccation. Ces deux phénomènes physiques provoquent des cassures double-brins dans son ADN (figures 7) qu'elle est ensuite capable de réparer grâce à un mécanisme de réparation spécifique, appelé *extended synthesis-dependant strand annealing* (ESDSA) (35, 36, 37, 38).

Concernant les rotifères bdelloïdes, ils ne bénéficient pas d'une accumulation de disaccharides de type tréhalose pour protéger leurs protéines et leurs membranes, mais il a été démontré qu'ils possèdent des protéines LEA (39). Le mécanisme de conservation de l'intégrité du génome pendant ou après la dessiccation reste encore méconnu. Une hypothèse est pourtant émise dans le monde scientifique. Il a été démontré que les rotifères bdelloïdes survivent et reprennent la reproduction après des doses de radiations ionisantes causant des centaines de cassures double-brins dans l'ADN, tout comme chez la bactérie *Deinococcus radiodurans* (figure 8) (40). Ils sont capables de réparer toutes ces cassures dans leur ADN en quelques heures seulement (figure 9). Or, vu l'absence de fortes radiations ionisantes sur la terre, la résistance à ces radiations est considérée comme une adaptation due à la résistance à la dessiccation. La dessiccation pourrait donc provoquer des cassures double-brins dans l'ADN des bdelloïdes qu'ils seraient ensuite capables de réparer efficacement (40).

III. Modes de reproduction dans le monde vivant

1. Le paradoxe de la sexualité

La reproduction est une fonction par laquelle les êtres vivants produisent d'autres êtres vivants semblables à eux-mêmes. Il existe deux modes de reproduction: la reproduction sexuée par laquelle deux parents transmettent une combinaison unique de gènes à leurs descendants et la reproduction asexuée, par laquelle un individu unique génère des descendants qui lui sont génétiquement identiques (41).

La reproduction sexuée constitue une dépense énergétique importante pour les organismes eucaryotes. La production de mâles signifie que l'on divise en deux la part productive de la population. En effet, seule la moitié des descendants d'un couple d'organismes sexués seront des femelles (41). Ces dernières seront elles-mêmes incapables de procréer seules. De plus, elles ne contribueront qu'à 50 % des gènes de leur descendance (42). *A contrario*, dans une population asexuée, chaque descendant sera capable de donner des descendants à lui seul et leur transmettra l'ensemble de ses gènes (41, 42). Le taux de croissance démographique des populations asexuées est donc double par rapport à celui des populations sexuées, si l'on suppose que les femelles asexuées produisent le même nombre de descendants que les femelles sexuées (42). Ce désavantage reproductif des organismes sexués a été décrit pour la première fois par le professeur J. M. Smith qui l'a nommé le « two-fold cost of sex » (figure 10) (43).

A cela, s'ajoute d'autres désavantages rencontrés par les populations se reproduisant de façon sexuée. La production des systèmes et mécanismes sexuels et la recherche de partenaire avec le risque de ne pas en trouver constituent des coûts non négligeables. Le risque de transmission de maladies et le combat entre individus du même sexe entrent également en compte (44).

Pourtant, la sexualité, reprenant l'ensemble des comportements relatifs à l'instinct sexuels, constitue la stratégie dominante parmi les eucaryotes (45). Pour que cela soit possible, la reproduction sexuée doit sans doute offrir de nombreux avantages qui compensent son coût « double ».

Chez les organismes sexués, la méiose est le mécanisme de division d'une cellule en deux étapes permettant le passage du stade diploïde au stade haploïde au cours de la formation des gamètes. Lors de la reproduction sexuée, le gamète femelle, l'ovule, est fécondé aléatoirement par un gamète mâle, le spermatozoïde. La méiose et la fécondation aléatoire produisent tous deux des descendants génétiquement différents. Ces variations génétiques rendent la population plus résistante aux menaces imprévisibles, telles que les mutations délétères, les parasites, les conditions changeantes de l'environnement ou la compétition, en permettant la sélection naturelle et l'adaptation de la population (41, 46).

L'anisogamie, correspondant à la reproduction sexuée par deux gamètes de morphologie différente, est responsable de la sélection sexuelle qui limite également le coût du sexe car elle assure la sélection des gènes parentaux avantageux et optimise donc le fitness des descendants. En effet, la sélection sexuelle correspond au choix du mâle par la femelle (et moins fréquemment au choix de la femelle par le mâle) et à la compétition entre les mâles pour conquérir la femelle et ainsi transmettre leurs gènes à la descendance (47). Les mâles arborent souvent des parures extravagantes, des couleurs voyantes et/ou des appendices encombrants. Il leur arrive également de chanter, de se battre et/ou de parader. Ces traits et comportement peuvent constituer un handicap pour leur survie. Mais le mâle montre à la femelle qu'il est capable de survivre malgré ces risques et donc qu'il possède un patrimoine génétique efficace pour assurer une adaptation de la descendance au milieu. (41, 44, 47, 48).

Dans les paragraphes suivants, les grandes hypothèses émises en faveur de la sexualité sont développées.

L'hypothèse de Fisher-Muller (1930-1932) stipule que, dans une population asexuée, deux mutations bénéfiques ne peuvent être fixées simultanément que si l'une apparaît chez un

individu contenant déjà l'autre (49). Au contraire, dans une population sexuée, la recombinaison permet de fixer ensemble deux mutations présentes chez des individus différents. Ainsi, une population sexuée incorpore plus rapidement les mutations bénéfiques qu'une population asexuée. La reproduction sexuée génère de nouvelles combinaisons d'allèles et augmente donc son fitness plus rapidement (49).

La théorie de la reine rouge, développée par le biologiste américain Leigh Van Valen en 1970 (50), tire son nom du second livre d'Alice au pays des merveilles (51). Dans ce volet, Alice traverse un miroir et fait la rencontre de la reine rouge. Elles se lancent dans une course effrénée, et Alice lui demande : « Mais Reine Rouge, c'est étrange, nous courons vite mais le paysage autour de nous ne change pas, pourquoi ? ». Et la reine lui répond : « Nous courons pour rester à la même place ! ». Cette théorie symbolise la course à l'armement entre espèces. Cette théorie affirme que lorsqu'une espèce s'adapte à un facteur, elle modifie son environnement biotique, et les espèces qui partagent son environnement sont contraintes de s'adapter pour survivre. Prenons l'exemple du système hôte-parasite. Lorsque l'hôte s'adapte, le parasite est forcé de s'adapter pour survivre, et inversement. Cette théorie explique également les avantages des organismes sexués dans le sens où ils sont capables de s'adapter plus rapidement grâce aux fréquentes recombinaisons et donc ils peuvent survivre aux changements incessants de l'environnement.

La théorie des mutations délétères stipule que le sexe existe pour purger le génome des mutations génétiques dommageables, grâce aux recombinaisons. Ceci diminue le « mutation load » d'une population sexuée (52). L'épistasie négative permet aux individus porteurs d'un grand nombre de mutations délétères d'être éliminés plus efficacement de la population. En effet, ces individus ont un moins bon fitness que si l'on considérait chaque mutation indépendamment. Donc, un nombre important de mutations délétères seront éliminées des populations sexuées par la mauvaise qualité de la descendance ayant un nombre de mutation particulièrement élevé (53, 54).

Enfin, la théorie de Muller's Ratchet prédit qu'une détérioration mutationnelle est inévitable dans les petites populations asexuées car elles subissent l'effet Muller's Ratchet selon lequel les individus ayant un bon fitness (c'est à dire moins de mutations délétères) peuvent disparaître par hasard. Les populations asexuées déclinent progressivement car elles perdent petit à petit les classes d'individus ayant le meilleur fitness alors que les populations sexuées peuvent régénérer ces génotypes avantageux perdus grâce aux recombinaisons, pour autant que les allèles n'aient pas disparus (54, 55).

Tous ces modèles pourraient expliquer les raisons pour lesquelles la reproduction sexuée est avantageuse à long terme et donc dominante dans le monde eucaryote. Ces modèles expliquent également pourquoi les populations eucaryotes asexuées, qui évoluent fréquemment à partir d'ancêtres sexués, disparaissent généralement rapidement, faute d'adaptation à l'environnement changeant (45). Leur nature apomictique, correspondant à la capacité de produire un embryon diploïde sans fécondation, ne leur permet pas d'évoluer rapidement ou d'éliminer les mutations nuisibles (39).

Il semble cependant exister quelques anciens taxa ne se reproduisant que de manière asexuées (45). Les rotifères bdelloïdes en sont un parfait exemple. D'une part, on pense que ces organismes sont asexués car depuis que ces animaux ont été découverts à la fin du 17^e siècle, aucun scientifique n'a jamais trouvé de signe morphologique ou génétique de sexualité. D'autre part, des fossiles de plus de 40 millions d'années ont été découverts (56), et

l'horloge moléculaire laisse penser que les rotifères bdelloïdes se sont séparés de la classe des monogonontes il y a au moins 100 millions d'années (4). La classe des rotifères bdelloïdes serait donc d'origine Mésozoïque (4) et constituerait le rang taxonomique le plus élevé assigné à une lignée supposée asexuée de manière permanente.

2. La reproduction chez les rotifères

Les modes de reproduction varient en fonction des trois classes de rotifères. Les saisonides se reproduisent sexuellement. Les monogonontes se reproduisent par parthénogenèse cyclique. Chez ceux-ci, la phase mictique, correspondant à la reproduction sexuée, est déclenchée par des signaux internes et environnementaux tels que la densité élevée de la population (2, 18). En phase prémictique, les femelles asexuées produisent des femelles asexuées et des femelles sexuées par parthénogenèse. Ces dernières, dites mictiques, sont morphologiquement identiques aux premières et produisent des œufs par parthénogenèse qui sont plus petits que les œufs pondus par les femelles amictiques. Ces œufs donnent naissance à des mâles nains et dépourvus de tube digestif. Une fois que les femelles mictiques sont fécondées par les mâles, elles pondent des œufs diploïdes qui entrent en dormance pour n'éclore que si les conditions redeviennent favorables (2, 18). Les rotifères bdelloïdes, quant à eux, se reproduiraient de manière asexuée, par parthénogenèse obligatoire.

3. L'asexualité chez les rotifères bdelloïdes

D'après les recherches menées sur le sujet depuis plus de trois siècles, le mode de reproduction des rotifères bdelloïdes est asexué. On ne retrouve que des femelles, qui se reproduisent par parthénogenèse apomictique. Les œufs diploïdes ne sont pas fertilisés, ne subissent pas de méiose, et ne se développent que par mitoses successives. Ces œufs sont dits amictiques (1, 57). Les rotifères bdelloïdes possèdent deux ovaires syncytiaux, contrairement à la classe des monogonontes qui n'en possèdent qu'un (58).

Les recherches menées jusqu'à aujourd'hui n'ont pas permis de mettre en évidence le moindre indice de sexualité, que ce soit dans les comportements et les traits morphologiques directement observables ou dans les caractéristiques observables à l'échelle moléculaire (45) :

3.1. Critères morphologiques et comportementaux

A l'échelle de l'organisme, aucun scientifique n'a jamais découvert de mâle, de structure sexuelle mâle ou de comportement sexuel chez les rotifères bdelloïdes (45). Toutefois, ceci ne constitue aucunement une preuve directe d'asexualité (45); pour des organismes n'utilisant le sexe que périodiquement, il est difficile d'observer la reproduction sexuée. Il est donc possible que nous ne soyons pas capables de l'observer chez les rotifères bdelloïdes tant ce phénomène est rare chez eux. De plus, un caractère sexuel peut être présent dans une population et n'avoir aucune fonction dans la reproduction sexuée. Ainsi, chez les rotifères monogonontes *Brachionus calyciflorus*, les souches devenues asexuées ont maintenu la capacité de produire des phéromones mais ne sont plus capables d'y répondre (45). De même, la présence de comportement sexuel ne signifie pas qu'il y a reproduction sexuée: Chez les salamandres *Ambystoma sp.*, les femelles, pourtant asexuées, engagent un comportement sexuel vis-à-vis de mâles d'une autre espèce. Ce comportement déclenche la parthénogenèse mais il n'y a aucune contribution génétique paternelle (45). On ne peut donc pas se baser

uniquement sur des critères morphologiques et comportementaux pour affirmer que les rotifères bdelloïdes sont asexués.

3.2. Critères moléculaires connus

L'étude du génome est nécessaire pour tirer des conclusions fondées et plus objectives sur le mode de reproduction exact des rotifères bdelloïdes. S'il manque encore des données moléculaires, celles qui ont été étudiées jusqu'à ce jour ont tendance à renforcer l'opinion des scientifiques quant à l'asexualité des rotifères bdelloïdes.

3.2.1. La méiose

La méiose est un processus impliqué dans la reproduction sexuée, qui nécessite l'appariement des chromosomes homologues par paires. Les chiasmats formés durant la méiose permettent de déclencher la recombinaison entre fragments homologues.

En l'absence de ces phénomènes sexués, l'appariement homologue n'a plus lieu et cela peut mener à la perte des paires de chromosomes homologues (45, 59). On s'attend donc à ce que des organismes ayant abandonné le sexe depuis longtemps soient caractérisés par un caryotype hétérozygote et une absence de paire de chromosomes homologues. Plusieurs équipes scientifiques se sont intéressées à la morphologie des chromosomes de rotifères bdelloïdes.

Le scientifique W. S. Hsu (57) et le professeur J. L. Mark Welch (59) rapportent que *Philodina roseola* a 13 chromosomes. L'un d'eux est plus long et n'a aucun homologue apparent (figure 11) (59). Si cette particularité a intrigué les scientifiques, elle n'est cependant pas une preuve de l'absence de méiose. Ce chromosome pourrait être un chromosome sexuel sans homologue ou il pourrait s'apparier à deux autres chromosomes, comme c'est le cas chez d'autres espèces (60, 61). Il n'est donc pas possible de confirmer l'asexualité des rotifères bdelloïdes par cette observation.

Les scientifiques M. Plasota et K. Plasota ont découvert que *Habrotrocha rosa* contient 14 chromosomes (62). Selon le scientifique M. Pagani (63) et le professeur J. L. Mark Welch (59), *Matrotrachela quadricornifera* aurait 10 chromosomes identiques (figure 11). Le professeur J. L. Mark Welch (59) a également étudié les chromosomes des espèces *Habrotrocha constricta* et *Adineta vaga* (Figure 11). Elles en ont 12 sans différence morphologique (59).

Dans toutes ces études de caryotypage, il n'y a pas de preuve morphologique évidente que des paires de chromosomes homologues sont présentes. L'hypothèse de l'asexualité chez les rotifères bdelloïdes est donc maintenue car il n'y a aucune preuve que la méiose se produit.

3.2.2. L'effet Meselson

Dans une population sexuée, la recombinaison homologue limite la divergence entre les allèles d'un même locus. Alors qu'en l'absence de ce mécanisme sexuel homogénéisant, les allèles d'un même locus évoluent indépendamment l'un de l'autre et une divergence génétique plus importante se marque entre eux. C'est ce qu'on appelle « l'effet Meselson » et c'est ce qu'on peut observer dans une population asexuée diploïde.

En 2000, l'équipe du professeur M. Meselson (11) a conclu à la présence de cet « effet Meselson » chez les rotifères bdelloïdes car ils ont découvert une divergence d'environ 50 % entre deux des quatre copies de gènes étudiés: le gène codant pour une protéine *heat shock* (Hsp82), le gène codant pour la protéine liant la boîte TATA (tbp), celui qui code pour la grande sous-unité de l'ARN polymérase III (rpoI31) et celui codant pour l'isomérase triphosphate (tpi) (11). Les divergences observées entre deux des copies de ces gènes sont bien supérieures à celles observées chez les rotifères monogonontes. De plus, il ne semble pas que ces divergences entre les allèles d'un même locus soient dues à un taux de mutations nucléotidiques élevé car l'étude du gène *hsp82* n'a mis en évidence aucune différence significative dans le taux de mutation des rotifères bdelloïdes et monogonontes (11, 64).

Les différences nucléotidiques entre les copies des gènes sont principalement situées en troisième position des codons et aucun codon stop n'est présent dans les copies. Toutes les copies semblent donc fonctionnelles. Les parties génomiques étudiées chez quelques espèces bdelloïdes diffèrent considérablement de la classe des monogonontes. Chez les rotifères non-bdelloïdes, les copies génétiquement proches correspondent à ce qui est attendu dans des populations sexuées. Chez les bdelloïdes, même les copies les plus proches génétiquement sont plus éloignées que les paires les plus divergentes chez les autres rotifères. Les scientifiques ont conclu que, vu l'absence de mâles, d'hermaphrodites et de méiose, l'explication la plus plausible était que le phénomène était dû à leur asexualité (11).

En 2004, la même équipe de scientifiques cherche, par des méthodes phylogénétiques diverses, à savoir si ces divergences ont eu lieu avant la radiation des bdelloïdes ou au sein des familles bdelloïdes (65). Ils ne parviennent pas à conclure mais ils continuent de penser que ces divergences sont dues à la perte de sexualité chez un ancêtre des bdelloïdes.

Par la suite, la même équipe a continué ses recherches sur des parties du génome des rotifères bdelloïdes. Les scientifiques avaient observé que le gène le mieux caractérisé chez les rotifères bdelloïdes, *hsp82* de *P. roseola*, était présent en quatre copies dans le génome et que chacune d'elles se trouvait sur un chromosome différent (11, 60, 61). Ils ont dès lors étudié la séquence de 45 à 70 kb autour de chacune des copies pour en apprendre davantage sur cette particularité. Ils ont découvert que les quatre régions sont deux paires colinéaires riches en gènes. Les deux paires colinéaires n'ont que très peu de gènes en commun mais ils sont tous présents dans le même ordre et la même orientation (4). Les deux copies au sein d'une paire diffèrent entre 0 et 20 % avec une moyenne d'environ 7.5 %, comparé à 92 % entre les deux paires colinéaires. Tout ceci les a poussé à conclure que les divergences entre les copies d'une même paire sont faibles et qu'il n'y a pas « d'effet Meselson », contrairement à ce qu'ils pensaient depuis l'an 2000, et que le génome est celui d'un tétraploïde dégénéré (4).

En 2009, d'autres chercheurs de la même équipe approfondissent cette étude en vérifiant si cette tétraploïdie dégénérée est une caractéristique générale des rotifères bdelloïdes. Ils séquencent la même région comprenant le gène *hsp82* (~40 kb) chez une autre espèce de bdelloïdes, *A. vaga*, et une autre étude (66) séquence une autre région génomique contenant les clusters des gènes histones canoniques chez ces deux mêmes espèces *A. vaga* et *P. roséola*. Les résultats sont similaires à ceux observés pour *hsp82* de *P. roséola* : au sein d'une paire colinéaire, les copies alignées ont une faible différence nucléotidique mais entre les éléments de deux paires, les différences sont considérables. Ces résultats sont cohérents avec la tétraploïdie dégénérée (67) (figure 12). De plus, entre les deux espèces, l'ordre et l'orientation des gènes sont largement conservés, indiquant que la tétraploïdie dégénérée a été établie avant la séparation des deux familles auxquelles appartiennent ces deux espèces. Par

leurs résultats, ils concluent qu'une duplication du génome, suivie d'un grand nombre de délétions, s'est produite après la séparation des rotifères bdelloïdes de la classe des monogonontes, mais avant la séparation des familles de bdelloïdes.

« L'effet Meselson » permettant de considérer une population comme étant asexuée n'est donc pas présent chez les rotifères bdelloïdes. Il est vrai que la faible divergence entre les copies d'une même paire pourrait être due à une reproduction sexuée. Mais suivant ce qu'on connaît des rotifères bdelloïdes et du manque de preuve de sexualité, d'autres hypothèses, dont la résistance à la dessiccation, sont envisagées pour expliquer cette tétraploïdie dégénérée au sein de leur génome. Ceci est abordé plus en détail au point 4.

3.2.3. Eléments transposables

Un élément génétique transposable est un segment d'ADN transférable d'un site du génome ou d'un plasmide vers un autre site non homologue. Ces segments sont encadrés par des courtes séquences directement répétées et ils sont constitués de séquences inversement répétées à leurs extrémités.

La présence ou non d'éléments transposables délétères dans le génome des organismes peut apporter une information supplémentaire quant à leur sexualité. Une population à reproduction sexuée limite l'expansion néfaste des éléments transposables grâce à des mécanismes sexuels que sont la recombinaison illégitime, la recombinaison homologue liée à l'épistasie négative et le *Meiotic Silencing by Unpaired DNA* (SMUD) (figure 13). Si la reproduction sexuée cesse, l'expansion des éléments transposables n'est plus arrêtée par les mécanismes sexuels. Si la lignée asexuée ne présente pas de mécanisme de sélection, de délétion ou de domestication de ces transposons, leur accumulation participera à l'extinction précoce de la lignée (68).

Puisqu'il semblerait que les rotifères bdelloïdes soient asexués depuis des millions d'années (11), ces segments d'ADN délétères devraient avoir disparu de leur génome ou être complètement modifiés et inactifs.

Le docteur I. Arkhipova (68) a étudié les superfamilles les plus abondantes de deux classes de transposons eucaryotes : d'une part, les rétrotransposons, qui se déplacent par l'intermédiaire d'un ARN converti en ADN par une reverse transcriptase (RTase), et d'autre part, les transposons à ADN qui se déplacent par un mécanisme d'excision et insertion de l'ADN grâce à une transposase. Les superfamilles de rétrotransposons qu'ils ont étudiées sont les « LINE-like et gypsy-like elements ». La superfamille de transposon à ADN sur laquelle ils se sont penchés est le « mariner/Tc1-like element ».

Ils ont constaté la présence des transposons mariner-like aussi bien chez les rotifères bdelloïdes que chez les autres phyla étudiés. La présence de ces transposons à ADN dans le génome des rotifères bdelloïdes, malgré leur asexualité, peut s'expliquer par leur mode de transmission horizontal. Par contre, ils n'ont découvert aucun rétrotransposon LINE-like ni gypsy-like chez les rotifères bdelloïdes alors qu'ils les détectent chez tous les autres phyla étudiés. Il s'avère que les rétrotransposons ne sont presque jamais transmis horizontalement. De plus, ils sont néfastes car ils peuvent perturber l'expression des gènes dans lesquels ils s'intègrent et ils contiennent des signaux qui peuvent interférer avec l'expression des gènes à proximité. En l'absence de sexualité on peut s'attendre à une augmentation indéfinie dans le génome des individus asexués jusqu'à extinction de la population. Ces particularités peuvent

expliquer leur absence dans le génome d'une classe asexuée qui a persisté depuis plusieurs millions d'années sans méiose (68).

Les découvertes concernant les éléments transposables délétères chez les rotifères bdelloïdes soutiennent donc l'hypothèse qu'ils sont d'anciens organismes asexués.

3.3. Critères moléculaires à expérimenter

Il n'est pas possible de prouver scientifiquement avec une totale certitude l'absence de reproduction sexuée dans une classe d'organismes car il est impossible d'étudier tous les individus et encore moins au cours du temps. Cependant, plus le nombre d'éléments en faveur de l'asexualité est grand et plus les doutes diminuent. Actuellement, les scientifiques n'ont pas encore étudié ou prouvé expérimentalement tous les aspects moléculaires pouvant renforcer leur opinion quant à l'absence de sexe chez les rotifères bdelloïdes. Leurs analyses pourraient donc y contribuer.

3.3.1 Congruence phylogénétique

La congruence phylogénétique est caractérisée par une évolution parallèle entre l'arbre de gènes de l'ADN nucléaire (ADNn) et l'arbre de gènes de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ceci a lieu lorsque les génomes partagent une même histoire évolutive.

Plus précisément, dans une population sexuée, l'ADNn est hérité des deux parents alors que l'ADNmt, ayant une origine maternelle, se transmet de manière uniparentale (les mitochondries paternelles sont exclues de l'ovule fécondé). L'histoire évolutive différente de ces deux génomes se traduit par une incongruence entre l'arbre de gènes de l'ADNn et celui de l'ADNmt (45). Au contraire, l'ADNn et l'ADNmt des organismes asexués sont transmis de manière uniparentale (45). On s'attend donc à une congruence entre les arbres de gènes nucléaires et mitochondriaux (45).

Remarquons qu'il est possible d'observer une incongruence phylogénétique dans une population asexuée si elle est d'origine hybride. En effet, si la population asexuée est née par un croisement entre les individus de deux espèces, l'ADNn issu initialement de deux parents n'aura pas la même histoire évolutive que l'ADNmt qui n'aura été transmis que par la mère au cours du temps.

3.3.2. Génétique des populations

La génétique des populations étudie la variabilité génétique au sein et entre les populations. Son étude peut renseigner sur le mode de reproduction d'une population. Plusieurs caractéristiques génétiques sont différentes entre les lignées sexuées et asexuées :

- **L'hétérozygotie** : Une différence majeure entre les populations sexuées et asexuées est l'accumulation et la transmission des mutations neutres. Dans les populations asexuées, les mutations se transmettent de manière clonale. Donc plus une lignée se clone longtemps, plus les mutations s'accumulent dans leur génome. En l'absence de recombinaison sexuelle, les allèles à chaque locus accumulent des mutations indépendamment les uns des autres. Ainsi, un haut niveau d'hétérozygotie est attendu dans les populations asexuées c'est « l'effet

Meselson » (69). Des marqueurs microsatellites pourraient être utilisés afin d'analyser le niveau d'hétérozygotie au sein de populations de rotifères bdelloïdes.

Cependant, chez les rotifères bdelloïdes, il a déjà été démontré que certains allèles des chromosomes homologues ne présentent pas cette variabilité attendue (61). Ceci peut être la conséquence de mécanismes de réparation d'ADN suite à des phénomènes de dessiccation (voir la partie II et III.4.1).

- **Diversité allélique** : la diversité allélique est le nombre effectif d'allèles dans une population (70). Dans les populations sexuées, chaque allèle à un locus donné est transmis en moyenne à la moitié des descendants. Cependant, la fréquence de transmission des allèles varie d'une génération à l'autre à cause du hasard intervenant dans la reproduction sexuée au cours de la méiose. De cette manière, un allèle peut totalement disparaître de la population sexuée. C'est ce qu'on appelle la dérive génétique. Une population asexuée présentera donc généralement un nombre plus élevé d'allèles qu'une population sexuée, grâce à l'absence de méiose (69). L'évaluation de la diversité allélique fournirait donc une information supplémentaire sur le mode de reproduction des rotifères bdelloïdes.

- **Diversité génotypique** : ceci correspond au nombre effectif de génotypes dans une population. D'une manière générale, la diversité génotypique est plus élevée dans les populations sexuées que dans les populations clonales (70). Puisque les individus d'une population sexuée se reproduisent par croisement, le nombre de combinaisons alléliques est donc plus élevé chez eux. L'étude de la diversité génotypique serait donc un moyen supplémentaire d'évaluer le mode de reproduction des rotifères bdelloïdes.

- **Distribution du nombre de différences entre paires de séquences (pairwise mismatch distribution)** : cette distribution démontre la fréquence et le nombre d'allèles différents dans une population (69). Elle diffère fortement entre les sexués et les asexués. En théorie, une population sexuée présentera une distribution unimodale alors que la distribution sera plutôt bimodale dans une population clonale (figure 14) (69). La distribution est unimodale dans une population sexuée car les individus ont un faible nombre d'allèles, qu'ils partagent entre eux (diversité allélique faible mais diversité génotypique élevée). Au contraire, la distribution dans une population asexuée est bimodale car beaucoup d'individus ont les mêmes allèles puisque ce sont des clones (diversité génotypique faible), mais le nombre d'allèles différents est élevé (diversité allélique élevée). Cette analyse, basée sur les microsatellites, pourrait donc permettre d'évaluer la reproduction des rotifères bdelloïdes.

- **L'équilibre de Hardy-Weinberg** correspond à un équilibre entre la fréquence des génotypes et celle des allèles. Dans une population sexuée, panmictique (le choix des partenaires se fait de manière aléatoire), d'effectif illimité et non soumise à la sélection et la migration, l'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté grâce à l'appariement aléatoire des allèles lors de la reproduction (figure 15) (71). De plus, si un génotype est éliminé aléatoirement dans la population sexuée, il peut réapparaître grâce aux croisements entre individus.

Par contre, si la population est asexuée, lorsqu'un génotype disparaît, il est perdu car il n'y a pas de croisement entre individus et il n'y a donc pas de mélange entre les allèles dans la descendance. Un déséquilibre de Hardy-Weinberg apparaît donc dans la population (figure 15).

Il faut cependant noter que l'observation de cet équilibre n'est pas toujours possible dans une population sexuée. La population est soumise aux variations environnementales et un génotype peut disparaître par hasard (72). Un déséquilibre de Hardy-Weinberg apparaîtra momentanément dans la population sexuée après la perte d'un génotype et avant que la population l'ait régénéré (45). Il existe également l'effet de goulot (*bottleneck effect*). Cet effet émerge dans une population réduite à un très petit nombre d'individus dû à des catastrophes naturelles ou les activités de l'homme. La conséquence est un nombre réduit de génotypes ayant survécu et n'étant pas représentatif de la population originale (72). Mais, à moins qu'un allèle ait disparu de la population, les génotypes perdus pourront toujours être recréés grâce au croisement entre individus sexués et au fur et à mesure, la population sexuée devrait retrouver son équilibre.

- **L'équilibre de liaison** : si la fréquence d'observation d'une combinaison d'allèles dans une population est le produit des fréquences individuelles des allèles, ils sont alors en équilibre de liaison (73). Cet équilibre disparaît dans les populations asexuées car la reproduction est uniparentale et tous les chromosomes sont transmis à la descendance. Tous les allèles sont donc transmis ensemble.

Il faut cependant remarquer que les rotifères bdelloïdes sont un cas particulier d'organismes asexués puisqu'ils existent depuis plusieurs millions d'années. Les études en génétique des populations pourraient fournir des résultats particuliers. Ils pourraient correspondre à ceux attendus pour une population sexuée car s'ils ont survécus si longtemps, c'est peut-être dû à la présence d'un mécanisme qui fournirait un profil génétique comparable.

3.3.3. Génomique comparative

La génomique comparative est aussi une voie qui pourrait apporter des réponses concernant le mode de reproduction des rotifères bdelloïdes. En effet, si le génome d'un organisme potentiellement asexué est séquencé, on peut rechercher des gènes impliqués dans la méiose et la spermatogénèse. L'inventaire des gènes de la méiose chez les eucaryotes réalisés par les scientifiques A. M. Shurko et J. M. Logdon peut notamment servir de « kit de détection de la méiose » (74).

Quelle est l'histoire évolutive des gènes impliqués dans la spermatogénèse et la méiose dans un génome d'un asexué ancien ? On s'attend à observer une dégénérescence de ces gènes ou à une néofonctionnalisation (45). Le projet de séquençage du génome entier du rotifère *Adineta vaga*, initié par le laboratoire du professeur K. Van Doninck, permettra l'étude de ces gènes spécifiques.

4. Diversification et survie à long terme des rotifères bdelloïdes

Puisque nous nous intéressons à des organismes asexués, il est important de préciser la notion d'espèce chez ces organismes particuliers. De manière générale, des individus sont considérés comme faisant partie de la même espèce s'ils sont capables de se reproduire entre eux et qu'ils génèrent une descendance fertile. Chez les organismes asexués, cette définition perd tout son sens puisqu'il n'y a pas de croisement entre les individus (75). Comment adapter le terme d'espèce dans un groupe d'asexués ?

Dans la nature, la spéciation peut avoir lieu par une adaptation à des niches écologiques différentes. L'équipe du Dr Fontaneto a réalisé, sur un genre de rotifères bdelloïdes, des analyses génétiques qui ont démontré l'existence de différents clusters génétiques indiquant la présence d'espèces évolutivement distinctes au sein de ce genre (75). L'étude morphologique menée en parallèle a permis de repérer des divergences morphologiques entre ces différents clusters au niveau du mastax, indiquant une adaptation à une alimentation différente d'après la niche. Ainsi, l'adaptation à ces niches écologiques différentes peut être à l'origine de la spéciation chez les asexués, tout comme chez les sexués (75). Néanmoins, chez les asexués, ce n'est pas le croisement entre individus qui permet de différencier les espèces les unes des autres, mais uniquement les études morphologiques et génétiques.

Les rotifères bdelloïdes sont très diversifiés puisqu'ils comprennent 4 familles, 19 genres et 461 espèces asexuées décrites (4). Cette classe bdelloïde constitue le rang taxonomique le plus élevé dans le royaume animal assigné totalement à une lignée asexuée permanente. Dès lors, ce groupe contredit l'hypothèse d'une nécessité du sexe chez les eucaryotes pour la survie à long terme et la diversification. A ce jour, les scientifiques ne connaissent pas les mécanismes exacts à l'origine de cette diversification chez ces organismes asexués.

La duplication du génome, ayant eu lieu probablement avant la diversification des espèces bdelloïdes (67), pourrait expliquer partiellement l'adaptation des rotifères bdelloïdes malgré leur asexualité. La polyploidie exerce notamment un effet tampon sur l'expression des mutations récessives nouvelles. Par ailleurs, la multiplication du nombre d'allèles peut croître chez un polyploïde et augmenter la variation phénotypique. Mais, afin de diverger et évoluer, les mutations ponctuelles ne suffisent pas. Il faut probablement d'autres mécanismes qui engendrent de la variation génétique fréquemment. Les deux points suivants, tentent d'expliquer les sources possibles de variations génétiques au sein du génome des rotifères bdelloïdes :

4.1. La capacité de résistance à la dessiccation

La capacité de résistance à la dessiccation pourrait participer à la survie à long terme des asexués rotifères bdelloïdes. La dessiccation leur offre un avantage considérable puisqu'ils peuvent vivre là où des prédateurs et des parasites potentiels en sont incapables. Leur résistance peut constituer un moyen efficace pour réduire le nombre de pathogènes qui vivent dans les mêmes niches et qui sont moins tolérants à la dessiccation (22). De plus, la fécondité moyenne et le fitness des individus ayant subi l'anhydrobiose semble s'améliorer chez certaines espèces de bdelloïdes (22).

La résistance à la dessiccation pourrait également leur permettre de se diversifier génétiquement. Il a été démontré que la bactérie *Deinococcus radiodurans* résiste à de hautes

doses de radiations ionisantes (76) et à la dessiccation (35). Contrairement aux autres organismes extrémophiles, la bactérie ne se développe pas en condition extrême mais peut y résister en réparant les dommages causés par cette condition. Il a d'ailleurs été démontré que la dessiccation et les radiations ionisantes entraînent des cassures double-brins dans l'ADN de la bactérie (35, 36) qui est capable de les réparer par un mécanisme de réparation unique, le ESDSA (38) afin de reconstituer un génome complet. Les réparations imparfaites pourraient éventuellement générer des variations génétiques. Suivant ce raisonnement, on peut poser l'hypothèse que ce phénomène de dessiccation, qui se produit fréquemment durant le cycle de vie d'une espèce de rotifères bdelloïdes dans son habitat temporaire, peut induire des cassures d'ADN double-brins et des mutations suite à une réparation imparfaite (K. Van Doninck, Comm. Pers.). Ceci pourrait permettre aux bdelloïdes de se diversifier génétiquement sans avoir besoin des échanges génétiques engendrés par la reproduction sexuée.

Afin de réparer les cassures d'ADN double-brins au niveau des chromatides sœurs, le chromosome homologue peut servir de matrice pour la réparation du chromosome brisé. Cela pourrait d'ailleurs expliquer la raison pour laquelle les chromosomes homologues au sein d'une paire colinéaire chez les bdelloïdes ne présentent pas « d'effet Meselson » alors qu'ils sont asexués : ils servent constamment de matrice à leur homologue durant la réparation. Par ailleurs, puisqu'ils sont tétraploïdes dégénérés, la réparation des cassures double-brins dans l'ADN est possible à tous les stades de leur vie (4). Ainsi, même les oocytes qui sont en phase G1 chez les bdelloïdes (77) et n'ont pas de chromatides sœurs, sont capables de résister à la dessiccation car ils sont aussi capables de réparer les cassures double-brins dans l'ADN. L'homologue au sein de la paire colinéaire servira notamment de matrice pour réparer ces cassures double-brins (4, 40).

4.2. Les Echanges horizontaux d'ADN

Les échanges horizontaux d'ADN sont des mouvements de gènes d'un organisme à l'autre autrement que par transmission verticale à la descendance. Les échanges horizontaux d'ADN n'ont été documentés que chez très peu d'espèces eucaryotes et sont souvent associés aux procaryotes et au parasitisme ou à l'endosymbiose chez les eucaryotes unicellulaires (78). Si le phénomène est très rare chez les métazoaires, il semblerait toutefois qu'on ait découvert des gènes d'origine bactérienne, végétale et fongique concentrés dans les régions télomériques chez rotifères bdelloïdes (78).

Le chercheur E. A. Gladyshev a séquencé l'ADN des régions télomériques de fosmides d'*A. vaga* et de sondes spécifiques du rétrotransposon *Juno1*. Dix séquences codantes correspondant à des gènes bactériens et fongiques au niveau des LTR de *Juno1* ont été découvertes (figure 16). Ils ont notamment trouvé un gène correspondant à une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la paroi en peptidoglycan chez les bactéries et un autre correspondant à l'UDP-glycosyltransferase d'origine végétale (figure 16). La réalisation d'une RT-PCR prouve que ces gènes sont transcrits et que leurs introns sont éliminés.

Si certains des gènes étrangers sont intacts et transcrits, d'autres sont défectueux ou non transcrits. Par ailleurs, certains de ces gènes étrangers ont une similarité importante dans la composition nucléotidique avec ceux des bdelloïdes, suggérant qu'ils sont présents depuis longtemps dans le génome hôte. D'autres, sans introns notamment, semblent être arrivés dans le génome bdelloïde plus récemment.

La capacité de capture et d'assimilation d'exogènes fonctionnels pourrait représenter une force importante dans l'évolution des bdelloïdes (78). En effet, s'ils sont capables d'échanger de l'ADN entre individus apparentés, cela offrirait aux rotifères bdelloïdes un moyen de réaliser des échanges génétiques sans avoir recours à la recombinaison sexuelle.

Ce transfert horizontal de gènes étrangers chez les rotifères bdelloïdes pourrait être lié à leur capacité de résister à la dessiccation. En effet, si leur ADN se fragmente lors de la dessiccation, durant les mécanismes de réparation de l'ADN, les rotifères bdelloïdes pourraient être capables d'incorporer des gènes de l'environnement dans leur propre génome (58, 78).

Des études plus approfondies sont cependant nécessaires afin de vérifier que les transferts d'ADN étrangers s'effectuent encore à l'heure actuelle chez les rotifères bdelloïdes et que les échanges génétiques entre individus apparentés se réalisent effectivement (78).

IV. Les marqueurs moléculaires

1. Généralités

Les individus d'une même espèce diffèrent entre eux par un polymorphisme au sein de leur génome. Il existe trois types de polymorphisme : les mutations ponctuelles (*Single Nucleotides Polymorphism*), les insertions-délétions, et le nombre de répétitions au sein des régions répétées (*Single Sequence Repeats*).

Le séquençage du génome de plusieurs individus d'une même espèce pourrait mettre en évidence le polymorphisme, mais cette approche n'est financièrement pas envisageable actuellement dans une approche à haut débit. L'utilisation de marqueurs moléculaires est donc fréquemment utilisée pour mettre en évidence ces différences intraspécifiques (79).

Pour être un marqueur de génétique des populations efficace, un marqueur moléculaire doit présenter les caractéristiques suivantes (79) :

- Le marqueur doit être polymorphe, cela signifie qu'il doit présenter plus d'un allèle dans la population.
- Le marqueur doit être co-dominant, c'est-à-dire qu'il doit permettre de distinguer les hétérozygotes des homozygotes.
- Le marqueur doit être non épistatique, cela permet de connaître le génotype à partir du phénotype, quel que soit le génotype des autres loci. Il ne doit pas y avoir d'interaction inter- et intra- locus.
- Le marqueur doit être neutre, c'est-à-dire qu'une substitution allélique au locus marqueur n'a d'effet que sur le phénotype permettant la détermination du génotype.
- Le marqueur doit être insensible au milieu, cela veut dire qu'on doit être capable de connaître un génotype à partir du phénotype, quel que soit le milieu.

Au niveau de l'ADN, le nombre de marqueurs moléculaires est presque illimité et le stade ou l'organe considéré ne les influence aucunement puisque l'ADN est identique dans chaque cellule. La RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), l'AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*), la RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), les SNP (*Single Nucleotides Polymorphism*) et les SSR (*Single Sequence Repeats*) sont

d'autant de marqueurs qui permettent de mettre en évidence le polymorphisme génétique (79). Dans le cadre de ce travail, nous nous concentrerons sur les SSR.

2. Les SSR ou microsatellites

Appelés aussi microsatellites, les SSR sont des répétitions en tandem de motifs nucléotidiques dont la longueur varie entre 1 et 6 bases (80, 81). Le nombre de répétitions du motif peut varier de quelques unités à plusieurs dizaines. Lorsqu'il y a répétition d'un motif unique, on parle de microsatellite parfait et lorsqu'il y a répétition de plusieurs motifs on parle de microsatellites imparfaits (figure 17). Ces derniers peuvent être interrompus ou composés. Les microsatellites sont polymorphes par leur taille car le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre et au cours des générations (81).

Pour qu'un microsatellite soit polymorphe il faut un seuil minimal de répétitions, c'est ce qu'on appelle la matrice minimale. Elle seule pourra évoluer en microsatellite polymorphe. L'origine des matrices minimales n'est pas certaine à l'heure actuelle. Certaines pourraient provenir de copies d'éléments transposables, on parle alors d'apparition par adoption et de proto-microsatellites importés. Mais l'apparition *de novo* des microsatellites dans des séquences simples par les mécanismes que sont la substitution, l'insertion, la délétion ou les crossing-over inégaux. On parle alors de néo-*proto-microsatellite* (81). Lorsque la matrice minimale est générée, sa croissance en microsatellite est assurée par le glissement de la polymérase ou *slippage* (figure 18). Les régions répétées sont des sites particulièrement propices à ce genre d'erreur. Lors de la réplication de l'ADN, le brin néo-synthétisé peut se dissocier du brin matrice, ensuite, un mésappariement local peut avoir lieu et une boucle apparaît en raison de la présence des unités répétées. Si ceci n'est pas détecté par les enzymes de réparation de l'ADN, le ré-appariement imparfait génère une expansion du nombre de répétitions si la boucle s'est formée sur le brin néo-synthétisé et une contraction du nombre de répétitions si la boucle s'est formée sur le brin matrice (81, 82).

La technique utilisée pour les mettre en évidence est la PCR (Polymerase Chain Reaction). Les régions flanquantes d'un microsatellite sont constantes et une paire d'amorce correspondant à ces régions permet d'amplifier un microsatellite spécifique.

La longueur du microsatellite, dépendant du nombre de répétitions, peut ensuite être révélée par une électrophorèse en gel d'agarose ou en gel d'acrylamide (79). Cependant, l'analyse de la longueur du fragment par un séquenceur capillaire est une technique de révélation plus précise. Le principe est le suivant : les fragments amplifiés par PCR et marqués par un fluorochrome sont placés dans un séquenceur où ils migrent dans un polymère contenu dans des capillaires. Grâce à un laser situé à l'extrémité finale du capillaire, les nucléotides fluorescents sont stimulés et la taille du fragment peut être évaluée (83).

V. Les microsatellites et les systèmes de reproduction

L'utilisation des microsatellites en génétique des populations a permis de répondre à de nombreuses questions dans l'étude des systèmes de reproduction. Ils ont en effet les caractéristiques adaptées à l'étude de la génétique des populations puisqu'ils sont neutres, co-dominants et hautement polymorphes. Ils constituent donc un outil efficace pour évaluer la structure génétique influencée par le système de reproduction d'une population (71).

Ainsi, l'utilisation des microsatellites pour l'étude de la génétique des populations d'espèces de rotifères monogonontes a été effectuée. Les scientifiques A. Gomez et G. R. Carvalho (84) ont utilisé 7 microsatellites pour comparer la structure génétique des populations en phase sexuée et clonale chez *Brachionus plicatilis*. Ils ont constaté que les individus issus de la reproduction sexuée sont en équilibre de Hardy-Weinberg et en équilibre de liaison. Au contraire, les individus en phase asexuée de plus en plus longue présentaient une modification de la structure de Hardy-Weinberg, ainsi qu'un déséquilibre de liaison (84).

De la même manière, l'équipe du scientifique T. Kanbe (69) a réalisé une comparaison de la diversité allélique et génotypique des populations de pucerons *Acyrtosiphon pisum*, asexuées depuis longtemps et des populations sexuées (69). Ils ont conclu que les populations asexuées avaient une diversité génotypique plus faible, mais une richesse allélique par locus plus importante par rapport aux populations sexuées. Ces populations asexuées sont aussi caractérisées par une déviation importante de l'équilibre de Hardy-Weinberg et de l'équilibre de liaison. Ce n'est pas le cas des populations sexuées qui sont en accord avec l'équilibre de Hardy-Weinberg et qui présentent un équilibre de liaison à presque tous les loci (69).

Il reste à multiplier les recherches pour pouvoir dégager de manière certaine la modification générale de la structure génétique des populations en fonction de leur mode de reproduction. Par ailleurs, les rotifères bdelloïdes constituent un modèle intéressant à ce sujet vu leur asexualité ancienne présumée et l'absence de population sexuée proche. L'utilisation des microsatellites semble être appropriée pour de telles études du mode de reproduction.

VI. Objectifs du mémoire

Les rotifères bdelloïdes semblent être une exception à la règle générale selon laquelle les eucaryotes métazoaires qui abandonnent le sexe sont voués à une extinction précoce. La compréhension de leur biologie pourrait nous révéler comment ils ont évité le destin des autres lignées asexuées.

Leur résistance à la dessiccation à n'importe quel stade de leur vie joue probablement un rôle dans leur survie à long terme. La résistance des rotifères bdelloïdes à des doses élevées de radiations ionisantes qui génèrent des cassures d'ADN double-brins dans leur génome a déjà été mise en évidence. Nous savons également que la bactérie *Deinococcus radiodurans* survit aux radiations ionisantes comme à la dessiccation, que ces deux phénomènes provoquent des cassures double-brins dans son génome et que les radiations ionisantes sont quasi absentes sur terre. Nous avons, dès lors, émis l'hypothèse que la dessiccation provoquait également des cassures double-brins dans le génome des rotifères bdelloïdes et qu'ils étaient capables de les réparer, d'où leur résistance élevée aux radiations ionisantes. Cette particularité, suite à des cycles répétés de dessiccation, pourrait être à l'origine d'une diversification génétique essentielle pour une évolution à long terme, si la réparation est imparfaite.

Notre premier objectif dans ce mémoire était de démontrer expérimentalement la génération de cassures d'ADN double-brins des rotifères bdelloïdes de l'espèce *Adineta vaga* lorsqu'ils sont soumis à la dessiccation. A ce jour, aucune étude n'a démontré que la dessiccation chez les eucaryotes fragmente le génome. Pour ce faire, une optimisation de la méthode de dessiccation a dû être effectuée afin d'obtenir un taux de survie maximal et la mise au point du protocole d'extraction de l'ADN dans des « plugs » d'agarose a été réalisée.

Ensuite la mise en évidence des cassures double-brins dans le génome des rotifères bdelloïdes s'est réalisée sur base de la méthode PFGE.

Une seconde étude était menée en parallèle : réaliser une étude de la diversité génétique sur une population d'*Adineta vaga* au sein d'une mousse temporaire qui se dessèche fréquemment. Ceci représente la première étude de génétique de population d'une espèce de rotifère bdelloïde à l'aide des marqueurs moléculaires microsatellites. La première étape, réalisée au cours de ce mémoire, a été la caractérisation et l'optimisation de loci microsatellites polymorphes. Ensuite, le génotypage a pu être effectué sur plusieurs individus *A. vaga* de la population. Les objectifs de cette étude étaient d'une part, évaluer la diversité clonale de ces organismes asexués particuliers au sein d'une mousse temporaire, et d'autre part, vérifier les caractéristiques génétiques de la population qui pourraient suggérer le mode de reproduction.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique

1. Culture de rotifères bdelloïdes.

Des cultures de rotifères bdelloïdes sont maintenues au laboratoire d'écologie et génétique évolutive (en URBO) du Professeur Karine Van Doninck. Une culture de *Adineta vaga* est issue d'un individu unique du laboratoire du professeur M. Meselson (Harvard University, dept. of Molecular and Cellular Biology). D'autres cultures de *A. vaga* ont été lancées à partir d'une population récoltée à Namur (citadelle). Deux cultures de *Adineta ricciae* ont également été lancées par moi-même; la première provient d'individus desséchés sur filtre du laboratoire du Professeur C. Ricci (Université de Milan, dept. de biologie) et la seconde est issue également d'individus desséchés sur filtre, envoyé par le docteur C. Boschetti (University of Cambridge, Dept. of Chemical Engineering and Biotechnology). Des individus de *Adineta tuberculosa* desséchés dans des lichens et envoyés par le docteur D. Fontaneto (Sweden) sont maintenant également en culture ainsi que des individus de *Adineta ligula* desséchés sur un filtre déposé sur de l'agar et envoyés par le docteur C. Wilson (Cornell University, NY). Tous ces rotifères bdelloïdes sont cultivés dans des boîtes de pétri dans de l'eau volvic filtrée à l'aide d'un système de filtration sous vide utilisant une membrane de polyéthylène sulfoné (PES 0,2 µm). Les rotifères sont nourris une fois par semaine avec des bactéries *Escherichia coli* (souche 1655MG) et la quantité de nourriture est augmentée progressivement en fonction de la densité de la population.

2. Lancement d'une culture de *Adineta vaga*.

Pour lancer une nouvelle culture (un clone), deux techniques ont été envisagées durant ce mémoire. Des plaques douze puits étaient utilisées dans les deux cas et lorsqu'un rotifère était prélevé, il était d'abord transféré à la pipette dans des puits remplis d'eau volvic filtrée afin de diluer l'eau sale du milieu (2 à 3 transferts) (figure 19). La première méthode consistait à déposer le rotifère isolé dans un puits, d'y ajouter de l'eau volvic filtrée et quelques filaments de grains de millet autoclavés pour permettre la prolifération de bactéries, leur source de nourriture dans nos cultures en laboratoire. La deuxième méthode consistait à remplir les puits avec de l'Agar 1 % et un creux était formé au centre avec un moule (afin de maintenir les rotifères à distance des bords du puits) et d'y déposer le rotifère isolé. De l'eau volvic filtrée était ensuite ajoutée au centre. Dans ce cas précis, le nourrissage n'était pas requis car l'Agar permet la prolifération bactérienne. Si le clone se multipliait abondamment, les individus étaient transférés dans des boîtes de pétri mesurant d'abord 90 mm puis 140 mm, remplies d'eau Volvic filtrée. Ils sont nourris avec une culture d'*E. coli*.

3. Culture de *Escherichia coli*.

La souche 1655MG de *E. coli* était étalée sur des plaques contenant du LB (Luria Broth) agar sous une hotte à flux laminaire (Microflow laminar flow workstation-bioquell). Après une nuit d'incubation à 37° C, une colonie bactérienne était repiquée en condition stérile et inoculée dans un milieu liquide LB (20g/L) préalablement stérilisé par autoclave. La colonie croît durant environ 16h à 37° C sur une plate-forme rotante. Ensuite la culture liquide est

centrifugée à 4500 rpm durant 6 minutes à 4°C et le culot de bactéries est resuspendu dans de l'eau Volvic filtrée. La culture de *E. coli* est préservée durant environ un mois à 4° C.

4. Collecte de *Adineta vaga*.

Pour récolter un maximum d'œufs de rotifères, les congglomérats d'œufs, d'adultes et de déchets étaient collectés et transférés dans un tube. Le volume était estimé en utilisant les graduations sur le tube.

Pour récolter quelques individus adultes, l'utilisation de la pipette était privilégiée. Si au contraire une grande quantité d'individus était requise, l'eau de la plaque était d'abord transférée dans un falcon de 50 mL, puis les adultes encore fixés dans la boîte de pétri étaient détachés avec un racloir de cellules (23 cm Nunc) et transférés avec le restant de l'eau de la boîte de pétri dans le falcon. L'ensemble était ensuite centrifugé et le surnageant était éliminé.

II. Extraction de l'ADN

1. Lavage des œufs de rotifères.

Les œufs étaient lavés avec une solution de NaOCl 0,3 % pour dissoudre les adultes et les autres organismes non résistants (les œufs de *A. vaga* sont résistants au NaOCl 0,3 %). Ensuite, le mélange était distribué dans des tubes eppendorf de 1,5 mL, et centrifugé à l'aide d'une microcentrifugeuse environ 10 s à température ambiante. Le surnageant était éliminé et les œufs nettoyés au moins 10 fois à l'eau stérile afin d'éliminer le sodium hypochlorite et les tissus provenant des adultes et des bactéries morts. Ensuite, les œufs étaient nettoyés trois fois avec 1 mL de tampon STE (0,1 M NaCl, 50 mM tris pH 8.0 et 50 mM EDTA). Après le dernier lavage, le surnageant était éliminé et les œufs de rotifères propres étaient stockés à -80° C. 1 µL de ces œufs lavés était étalé sur plaque LB et YPD pour tester les contaminations éventuelles avant congélation.

2. Préparation de l'ADN génomique à partir d'œufs de rotifères.

Un mortier et un piston en céramique étaient d'abord nettoyés au détergent, à l'eau et à l'HCl concentré avant d'être neutralisés au NaOH et rincés à l'eau désionisée. Enfin, ils étaient autoclavés et conservés à -80° C. Précédent l'extraction, le mortier et le piston étaient refroidis avec de l'azote liquide. Les œufs congelés étaient versés dans le mortier et écrasés durant au moins 30 minutes à l'aide du piston tout en ajoutant fréquemment de l'azote liquide afin d'éviter la décongélation des œufs. Après le broyage, la poudre « d'œufs » est ajoutée à 3 mL de tampon STE à température ambiante et du SDS 0,5 % et 50 µg/mL de protéinase K étaient ajoutés. La solution était mélangée par inversion et placée à 53°C durant 2 h afin de digérer les protéines et dissoudre les lipides. Après l'incubation, la solution était extraite deux fois avec un volume égal d'une solution de 25 parts de phénol, 24 parts de chloroforme et 1 part d'alcool isoamyl. Ensuite, trois extractions étaient réalisées avec un même volume de chloroforme. Après l'extraction finale, l'ADNg était précipité à l'aide de sel (0,2 M NaCl) et de deux volumes d'éthanol (100 %). Le culot d'ADN était rincé deux fois avec de l'éthanol 70 %, séché au speedvac avant d'être resuspendu dans du tampon TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). La qualité et la quantité d'ADN étaient évaluées par deux méthodes : le spectrophotomètre NanoDrop et le fluorimètre Qubit (invitrogen).

3. Extraction de l'ADN génomique de rotifères à partir d'une faible quantité d'adultes.

Trois techniques d'extraction ont été testées durant ce mémoire. La méthode Chelex et deux kits Qiagen différents :

3.1. Chelex :

Cette procédure est simple, peu coûteuse, rapide et identique à celle de Gomez et Carvalho (84). La méthode se base sur la capacité du Chelex, qui est une résine polaire, à se lier aux composants cellulaires polaires après rupture des cellules. L'ADN et l'ARN, non polaires, sont maintenus dans la phase aqueuse. Par ailleurs, les ions Ca^{2+} , Mn^{2+} et Mg^{2+} sont chélatés par le Chelex et ne peuvent pas provoquer de cassures dans l'ADN à forte température. De plus, sans Mg^{2+} , les nucléases sont inhibées. Un adulte rotifère (ou un œuf) était isolé dans un tube eppendorf et 35 μL de résine Chelex 100 6 % (Bio-Rad) étaient ajoutés. La solution était mélangée pour resuspendre les billes de résine. Le tube eppendorf était ensuite placé à 56° C pendant 30 min et à 100° C durant 10 min dans un thermocycleur Biometra TProfessional. Le tube était ensuite conservé à 4° C durant minimum 30 min pour finalement être centrifugé. 2 ou 3 μL du surnageant contenant l'ADN étaient prélevés en surface pour éviter de prendre les billes de résine.

3.2. *DNeasy Blood and tissue Kit* :

Une petite quantité d'œufs ou d'adultes (minimum trois) était isolée. Le tampon ATL et 15 μL de protéinase K étaient ajoutés et le mélange vortexé avant d'être incubé à 55° C durant 90 min. Le mélange était à nouveau vortexé, 175 μL du tampon AL étaient ajoutés, l'ensemble à nouveau vortexé et incubé à 70° C durant 10 min. Directement après l'incubation, de l'éthanol 100 % était ajouté avant de vortexer une dernière fois. La solution était transférée sur minicolonnes placées dans des tubes eppendorf de 2 mL et centrifugée à 8000 rpm durant 1 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14). Les minicolonnes étaient transférées sur de nouveaux tubes de 2 mL et 440 μL de tampon AW1 étaient ajoutés avant de centrifuger à 13 000 rpm durant 3 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14). Les minicolonnes étaient replacées sur de nouveaux tubes de 1.5 mL et 40 μL de tampon AE étaient ajoutés pour l'élution. Après une incubation de 1 min à température ambiante, une centrifugation de 1 min à 8000 rpm (microcentrifugeuse Sigma 1-14) était nécessaire afin de dissoudre l'ADN dans les tubes. Une seconde élution avec 30 μL de tampon AE pouvait être réalisée pour récupérer un maximum d'ADN. Les tubes étaient conservés à -20° C.

3.3. *QiAamp DNA MicroKit* :

Un individu était isolé dans un tube eppendorf de 1.5 mL avec un minimum d'eau. 180 μL de Tampon ATL et 20 μL de protéinase K étaient ajoutés et le tube vortexé pendant 15 secondes. Les tubes étaient ensuite placés à 56° C sur un secoueur durant la nuit. 200 μL de Tampon AL étaient ajoutés avec 1 μL de carrier ARN dissout dans du tampon AL. Il était important de vortexer immédiatement après, pendant 15 secondes. 200 μL d'éthanol 100 % étaient ensuite ajoutés et le mélange vortexé à nouveau 15 secondes. Après une brève centrifugation permettant d'éliminer les gouttes dans le couvercle, le mélange était transféré sur une minicolonne montée sur un tube de 2 mL et centrifugé à 9000 rpm durant 1 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14). La minicolonne était ensuite transférée sur un nouveau tube

de 2 mL. 500 μ L de Buffer AW1 étaient ajoutés et après centrifugation à 9000 rpm pendant 1 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14), la minicolonne était placée sur un nouveau tube de 2 mL. 500 μ L de tampon AW2 étaient ajoutés, et, après une dernière centrifugation à 9000 rpm durant 1 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14), la colonne était placée sur un dernier tube de 2 mL. Une centrifugation à 14700 rpm durant 5 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14) permettait de sécher complètement la membrane. La minicolonne était finalement transférée sur un tube de 1.5 mL et 50 μ L de tampon AE étaient ajoutés au centre de la membrane pour éluer l'ADN. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'ensemble était centrifugé à 16 000 g durant 3 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14). L'ADN était conservé à -20° C. Cette méthode est privilégiée dans le cas où l'ADN d'un individu unique veut être prélevé.

4. Plugs agarose et extraction de l'ADN

Protocole I: cette méthode se base sur le protocole de Gladyshev et Meselson (40) et a comme but de coincer les rotifères dans de l'agarose et d'en extraire l'ADN sans le casser. Les rotifères étaient récoltés et transférés dans des tubes de 2 mL. Ils étaient centrifugés à 10000 rpm durant 5 min (microcentrifugeuse Sigma 1-14). Le surnageant était éliminé et les culots resuspendus dans 200 μ L de tris-EDTA (50 mM EDTA, 10 mM tris, pH 8.0) et centrifugés avec les mêmes paramètres. La majorité du surnageant était éliminée. La quantité restante, contenant les rotifères, était évaluée à la pipette. Les tubes étaient ensuite placés à 42° C. De l'agarose LMP 1 % dans du tris-EDTA (200 mM EDTA, 100 mM tris, pH 8.0) était préparé afin de l'ajouter au culot de rotifères. Le volume de la solution d'agarose devait être identique à celui du culot de rotifères afin d'obtenir une solution d'agarose finale de 0.5 %. L'ensemble était mélangé par pipetage et transféré dans des seringues de 1 mL dont le bout avait été préalablement coupé. Les seringues étaient placées sur de la glace durant 30 min et ensuite, de petites pièces d'agarose solidifiée (« plugs ») pouvaient être découpées et traitées pour l'extraction d'ADN. Chaque plug était placé dans 500 μ L de tampon de digestion (0.5X tris-EDTA (200 mM tris, 100 mM EDTA, pH 8.0), sarkosyl 1 % et 1 mg/mL de protéinase K). Après 1 h sur glace, ils étaient transférés dans un bain marie à 55° C durant 18 h. Le tampon de digestion était ensuite complètement enlevé et les « plugs » rincés deux fois dans du TAE 0.5X (40 mM tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.5). Les tubes étaient conservés à température ambiante et agités doucement durant 3 h. Ce protocole se base sur celui de Gladyshev et Meselson (40).

Protocole II: il se base sur le protocole de Jessica Mark Welch. Une grande quantité d'œufs étaient prélevés et écrasés dans de l'azote liquide à l'aide d'un piston et d'un mortier. La poudre était ensuite resuspendue dans une solution de 10 mM Tris pH 8 et \sim 500 mM EDTA. L'ensemble était alors chauffé quelques minutes à 37° C puis mélangé avec un volume égal d'agarose LMP 1 % préparé dans du TE et équilibré à 50° C. Le mélange est réalisé par pipetage en douceur. Le mélange liquide était ensuite mis dans des seringues de 1 mL dont le bout était coupé. Les seringues étaient placées sur glace pour permettre la solidification de l'agarose LMP. Les blocs d'agaroses étaient alors transférés dans une solution de 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8, 20 mM NaCl, 1% sarkosyl, 1 mg mL⁻¹ protéinase K et laissé à incubation durant 24 h à 50° C. La solution de sarkosyl était alors remplacée et une nouvelle incubation de 24 h à 50° C était réalisée. Les blocs étaient ensuite lavés 2 X 1 h dans 40 μ g/mL de PMSF dans 10 mM Tris pH 8 et 10 mM EDTA at 50° C. Le PMSF est toxique, il faut donc le manipuler avec précaution. Les blocs étaient ensuite lavés 2 X 30min dans 10 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA. Pour un stockage à long terme, les blocs d'agarose LMP sont conservés dans 500 mM EDTA à 4° C.

III. Marqueur CO1 pour l'identification de l'espèce.

Afin d'identifier précisément l'espèce, une identification morphologique n'est pas suffisante. Le gène mitochondrial CO1 (cytochrome C oxidase 1), déjà séquencé chez *A. vaga*, peut servir de marqueur moléculaire chez de nombreuses espèces (85, 86). Il code pour la première sous-unité de l'enzyme cytochrome C oxidase, impliquée dans le transport des électrons au niveau de la membrane mitochondriale. L'ADN mitochondrial est d'un grand intérêt en taxonomie et phylogénie car il évolue plus rapidement que l'ADN nucléaire. Cela permet une accumulation de différences, même entre espèces génétiquement proches.

Après extraction de l'ADN par la méthode Chelex ou le microkit Qiagen, CO1 a été amplifié et séquencé pour identifier l'espèce des individus prélevés dans une mousse près de la citadelle de Namur.

1. Amplification du marqueur CO1

La paire d'amorces utilisée pour l'amplification: l'amorce reverse 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA et l'amorce forward 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG (87). L'amplification a été réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide d'un thermocycleur Biometra TProfessional. Nous avons besoin de 25 µL de produit final. Pour cela, 0.2 µL de dNTP 100 mM et 0.1 µL de Go Taq polymérase 5 u/µL (Promega) ont été ajoutés à 15.7 µL d'H₂O sigma et 5 µL de Tampon pour Go Taq 5X. 0.5 µL de chacune des amorces étaient ajoutés, ainsi que 3 µL d'ADN (~0.075 µg). L'amplification débute par une période de 5 min à 94 °C suivie de 35 cycles comprenant chacun une étape de 1 min à 94 °C, une étape de 1min à 40 °C et une étape de 1 min de 72 °C. Le tout est suivi d'une période de 5 min à 72° C. La température redescend ensuite à 10 °C. Les échantillons sont conservés à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

2. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse permet de vérifier le bon déroulement de l'amplification et l'absence de contamination. Le modèle utilisé est une électrophorèse cosmobio MyRun IMR 201. Le gel était réalisé avec de l'agarose 1 % dans du tampon TAE 0.5X (40 mM tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.5) auquel la teinture SYBR safe 1X (Invitrogen) était ajoutée. La migration était réalisée pendant 30 min à 100 volts. La révélation du gel se faisait sous lampe UV.

3. Séquençage

La purification et le séquençage des échantillons d'ADN ont été réalisés par la société Macrogen *Inc.* selon la méthode de Sanger en utilisant une électrophorèse capillaire ABI 3730xl.

4. Identification des gènes

L'identification des gènes séquencés pour chaque individu a été réalisée par une recherche Blastn dans les bases de données NCBI

IV. Dessiccation et analyse génétique

1. Dessiccation lente

Pour tester l'effet de la dessiccation sur le génome des rotifères bdelloïdes de l'espèce *Adineta vaga*, une condition de dessiccation pour laquelle le taux de survie est maximum doit être obtenue. Plusieurs phases d'optimisation devaient être effectuées durant ce mémoire afin d'obtenir une condition acceptable (taux de survie >75 %). Le protocole optimale est le suivant : Les rotifères étaient prélevés et placés dans 1mL d'eau au centre de boîtes de pétri de 90 mm de diamètre sur de l'agarose LMP 3 % (30 mL). Les boîtes étaient ensuite placées dans une chambre d'incubation où la température fluctue autour de 24 °C et où l'humidité relative est maintenue à 40 % grâce à un déshumidificateur Frigor de type FDH12. Au tout début de la déshydratation (approximativement 12 h), les boîtes de pétri étaient entourées de boîtes remplies d'eau pour augmenter l'humidité relative autour des boîtes aux environs de 55 %, afin de ralentir la vitesse de dessiccation. Lorsque les organismes étaient déshydratés, l'humidité relative était maintenue à 40 %. Les rotifères bdelloïdes étaient considérés comme complètement desséchés lorsque la couche d'agarose LMP était entièrement sèche.

2. Réhydratation

Avant de réhydrater les rotifères desséchés sur de l'agarose LMP le taux d'humidité était augmenté rapidement, passant de 40 à 55 % via un équilibre entre l'hygrostat du déshumidificateur Frigor et un humidificateur Bionaire de type BU1300. Le taux d'humidité relative de 55 % était maintenu pendant 1 h avant la réhydratation complète par ajout d'eau Volvic filtrée, au risque de diminuer le taux de survie.

3. Dessiccation rapide

Pour comparer le profil des rotifères desséchés de manière optimale (dessiccation lente) avec des rotifères morts desséchés, un protocole de dessiccation rapide a été mis au point. Les rotifères prélevés étaient placés avec un minimum d'eau au centre de boîtes de pétri de 90 mm de diamètre contenant 10 mL d'agarose LMP 3 % préalablement desséché. Les boîtes de pétri étaient ensuite placées sous un ventilateur, à température ambiante et à humidité relative ambiante. La dessiccation se produisait ainsi en deux ou trois heures seulement.

4. Evaluation du taux de survie

Pour connaître l'efficacité du protocole de dessiccation, une évaluation du taux de survie a été nécessaire à chaque expérience, 12 h après réhydratation.

Pour les mises au point de la condition de dessiccation optimale, un nombre connu et restreint de rotifères (vingt ou trente) était utilisé. Un comptage au microscope était donc relativement aisé.

Pour les expériences en PFGE, une très large quantité de rotifères était requise. Un comptage manuel n'était plus possible. Nous avons dès lors filmé et photographié les organismes réhydratés et avons comptabilisé les individus en discriminant les vivants des morts en utilisant le programme imageJv1.42q. Cependant, la densité importante de rotifères

observée au niveau du morceau d'agarose ne permettait pas de discriminer facilement un taux précis de morts et de vivants. Ce problème est illustré par la figure 20. Afin d'obtenir des données chiffrées illustrant le taux de survie des rotifères en fonction des différentes conditions, les étapes de comptage ont donc été réalisées par l'observation des régions bordantes du morceau d'agarose. Ces régions moins denses en rotifères permettent le comptage et la discrimination des rotifères morts et vivants. Les manipulations de la boîte contenant le morceau d'agarose LMP et l'eau font que les rotifères réhydratés sont dispersés dans le reste de la boîte. Les rotifères morts flottent et se répartissent partout dans la boîte de manière homogène. Les rotifères vivants, par contre, sont plus concentrés au niveau du morceau d'LMP agarose mais certains quittent ce dernier et se retrouvent à divers endroits de la boîte de culture.

Pour chaque condition testée, cinq zones bordantes du morceau d'agarose ont été observées. Le champ couvert par la photo correspond à celui couvert par la combinaison entre un microscope Zeiss au grossissement 100X et un appareil photo numérique SONY WX1 (120mm). Dans certains cas, il est difficile de discriminer les rotifères morts des vivants sur une image fixe. Des séquences vidéos hautes résolutions de 10 secondes ont été capturées afin de déterminer l'état de vie ou de mort de chaque rotifère. Un comptage des rotifères combinant images fixes et vidéo a été réalisé à l'aide du logiciel ImagJ v1.42q. La figure 21 illustre l'étape de comptage.

5. Pulsed Field Gel électrophorèse (PFGE).

Montage PFGE (figure 22): Bio-Rad CHEF-DR II electrophoresis gel; CHEF-DR II drive module ; Model 200/2.0 Power supply Bio-Rad; Pulsewave 760 Bio-Rad.

Le principe de la PFGE est similaire à celui des électrophorèses classiques mais au lieu d'un voltage dirigé dans une seule direction, il change périodiquement dans trois directions : l'un est dirigé à travers l'axe central du gel et les deux autres passent à travers le gel avec un angle de 120° de part et d'autre du premier.

2 L de tampon TBE 0.5X étaient versés dans la chambre à électrophorèse, la température du tampon dans la chambre était maintenue à 15 °C. 100 mL d'agarose LMP 1 % étaient préparés et versés dans le moule pour réaliser le gel. Lorsque le gel était solidifié, les échantillons d'ADN étaient chargés dans les puits. Deux types d'échantillons peuvent y être déposés : sous forme liquide ou de « plug » d'agarose. Si les échantillons d'ADN étaient dans des plugs d'agarose, le chargement se faisait avant de mettre le gel dans la chambre. Les paramètres de migration utilisés ici étaient 200 V, 14-15 °C pendant 18 h et l'angle de rotation était de 120°. Le temps de permutation initial était de 50 s et le temps final de 100 s. Après migration, le gel était transféré dans un bain de SYBR gold pendant 40 à 60 min afin de marquer l'ADN. Durant le marquage, le gel devait être protégé de la lumière. Un rinçage de 20 min était ensuite nécessaire pour évacuer l'excès de SYBR gold. La visualisation se faisait sous une lampe UV.

Un scanner photométrique a ensuite été obtenu par analyse de l'intensité lumineuse du gel à l'aide du logiciel « Quantity One » de BioRad. L'intensité du signal est une fonction linéaire de la concentration en ADN dans le gel.

V. Analyse de la génétique des populations

1. Microsatellites et conception des amorces.

Les séquences nucléotidiques de contig des histones (quatre copies séquencées d'environ 35 kb) et des protéines heat shock (trois copies séquencées d'environ 40 kb) de *A. vaga* sont connues grâce au travail des professeurs K. Van Doninck et J. Hur (66, 67). Le logiciel Bioedit était utilisé pour éliminer les *gaps* dans les séquences et pour convertir les séquences en format fasta. Oligofactory (88) était le programme utilisé pour trouver les microsatellites dans toutes ces séquences et concevoir les amorces (voir Annexe).

2. Amplification des microsatellites.

Les microsatellites sont amplifiés grâce à une PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide d'un thermocycleur Biometra TProfessional. Le produit PCR final faisait 10 µL. Pour cela nous avons mélangé 5.45 µL d'eau sigma, 2 µL de tampon pour Go Taq 5X, 0.1 µL de dntps 100 mM, 0.05 µL de Go Taq polymérase 5 u/µL, 0.2 µL d'amorces *forward* (60 µM) et 0,2 µL d'amorces *reverse* (60 µM). 2 µL d'ADN (0.05 µg) sont ensuite ajoutés. La solution est placée à 94 °C durant 4 min et subit ensuite 30 cycles ; Chacun comprenant une période à 94 °C pendant 45 secondes, une période à la température d'hybridation dépendant de la paire d'amorce pendant 45 secondes et une période de 72 °C durant 45 secondes. Enfin, elle est maintenue à 72 °C durant 30 min pour assurer une élongation maximum. Le produit PCR est ensuite conservé à 4 °C. Le bon fonctionnement de l'amplification est vérifié par une électrophorèse en gel d'agarose 1 %.

3. Amplification des microsatellites pour le génotypage.

Afin de génotyper les microsatellites pour chaque clone, il est nécessaire d'utiliser des éléments fluorescents durant la PCR. L'utilisation des dntps fluorescents (Fdntps) est privilégiée pour les premiers tests et les mises au point. Le produit PCR final faisant 10 µL, on mélange 5.45 µL d'eau, 2 µL de tampon pour Go Taq 5X, 0.1 µL de dntps 100 mM, 0.1 µL de Fdntps 1 mM, 0.05 µL de Go Taq polymérase 5 u/µL, 0.2 µL d'amorces *forward* (60 µM) et 0,2 µL d'amorces *reverse* (60 µM). 2 µL d'ADN sont ensuite ajoutés (0.05 µg). La solution était placée à 94 °C durant 4 min et subissait ensuite 30 cycles ; Chacun comprenant une période à 94 °C pendant 45 secondes, une période à la température d'hybridation dépendant de la paire d'amorce pendant 45 secondes et une période de 72 °C durant 45 secondes. Enfin, elle était maintenue à 72 °C durant 30 min pour assurer une élongation maximum.

L'analyse finale s'est faite avec l'utilisation d'amorces fluorescentes afin d'obtenir un génotypage plus précis des microsatellites. Un multiplexage a été réalisé afin de génotyper plusieurs loci microsatellites en une fois. Pour cela, nous avons commandé des amorces fluorescentes complexées à deux fluorochromes différents : le dragon-fly orange et le FAM. Pour un volume final de 10 µL, 1 µL de mix d'amorces 0.2 µM étaient mélangés à 5 µL de Qiagen multiplex PCR master mix 2X, 2 µL d'ADN (0.05 µg) et 3 µL d'eau sigma. La solution était placée à 95 °C durant 15 minutes et subissait ensuite 35 cycles comprenant chacun une étape à 94 °C durant 30 secondes, une étape à 57 °C durant 90 secondes et une

période de 72 °C durant 90 secondes. Pour finir, elle était maintenue à 60 °C durant 30 minutes.

4. Génotypage via l'électrophorèse capillaire ABI 3130xl

Le génotypage est réalisé grâce à une électrophorèse capillaire ABI Applied Biosystem HITACHI 3130xl genetic analyser. 9 µL de formamide et 0.1 µL de Smart ladder étaient mélangés à chaque produit PCR avant l'analyse au séquenceur. Les produits PCR migraient à travers de fins capillaires et les éléments fluorescents étaient détectés par des lasers lorsque les produits atteignaient l'extrémité finale des capillaires.

5. Analyse des données de génétique de population

L'analyse des données génétiques issues du génotypage des microsatellites a été réalisée à l'aide du logiciel Arlequin (version 3.0). Celui-ci a permis de calculer les indices génétiques standards : nombre d'allèles, hétérozygotie, diversité allélique et diversité génotypique.

Les mesures de l'équilibre de liaison et les tests de déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg sont aussi calculés grâce à ce logiciel.

6. Analyse phylogénétique

Pour réaliser les analyses phylogénétiques, nous avons construit des arbres basés sur la méthode du neighbour-joining (NJ). Les génotypes microsatellites ont servi à réaliser un premier arbre et les haplotypes pour le gène mitochondrial CO1 ont été utilisés pour réaliser un second arbre. Le logiciel Population 1.2.30 a été utilisé pour le calcul des distances génétiques et la construction des arbres NJ. Les valeurs du Bootstrap ont été réalisées par un réassemblage des loci avec 1000 répétitions.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Phénomène de dessiccation

Une hypothèse émise par le professeur K. Van Doninck et d'autres chercheurs : les cycles de dessiccation pourraient offrir aux rotifères bdelloïdes la capacité de se diversifier génétiquement malgré leur asexualité. En effet, la dessiccation pourrait engendrer des cassures d'ADN double-brins dans leur génome et les réparations imparfaites de l'ADN pourraient être à l'origine d'une variabilité génétique et donc d'une diversification équivalente à celle rencontrée chez les organismes à reproduction sexuée.

L'étude de l'impact de la dessiccation sur l'intégrité du génome des rotifères bdelloïdes est donc la première étape cruciale dans la résolution de cette hypothèse. Ceci requiert plusieurs mises au point. Tout d'abord, la condition de dessiccation pour laquelle le taux de survie est maximal est recherchée. Le taux de survie est évalué pour chaque condition testée. Ensuite, un protocole d'extraction et de migration du génome des rotifères par PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) doit être mis au point. Finalement, le temps de dessiccation qui pourrait induire des cassures d'ADN double-brins doit être évalué d'après les données du biologiste V. Mattimore (36) concernant l'exposition de la bactérie *Déinococcus radiodurans* à différentes périodes de dessiccation.

L'objectif final de ce mémoire était donc d'analyser le profil génomique par PFGE des rotifères bdelloïdes desséchés, afin de vérifier si la dessiccation provoque des cassures d'ADN double-brins dans leur génome. Ce phénomène a été démontré pour la bactérie *D. radiodurans* (36) mais pour aucun eucaryote. La PFGE est une méthode typiquement utilisée pour séparer des grands fragments d'ADN et dans ce cas-ci, pour séparer les morceaux d'ADN génomique.

1. Condition de dessiccation et taux de survie

Afin d'étudier le profil génomique des individus desséchés, il fallait le comparer avec le profil génomique des rotifères bdelloïdes non desséchés et celui des morts. Il était donc nécessaire de trouver la condition de dessiccation assurant un taux de survie élevé (> 75 %). Notre première étude était donc la dessiccation et le taux de survie de l'espèce rotifère bdelloïde *Adineta vaga*.

Premièrement, il était important de trouver un substrat pour permettre la récolte des rotifères bdelloïdes après dessiccation. En effet, lorsqu'ils sont déshydratés, ils se fixent et il est impossible de les récupérer indépendamment de leur support. Par ailleurs, il fallait utiliser une méthode d'extraction du génome qui n'induit pas de cassure d'ADN. La méthode utilisée ici était la mise des rotifères directement dans des « plugs » d'agarose LMP (*low melting point*) à partir desquels nous extrayions leur ADN, d'après le scientifique E. Gladyshev (40). L'agarose LMP a donc servi de substrat pour les rotifères bdelloïdes en cours de dessiccation et celui-ci a ainsi pu être directement réutilisé pour former les « plugs ».

Deuxièmement, d'après le protocole du professeur C. Ricci (89), le meilleur taux de survie était obtenu lorsque les rotifères se déshydrataient en un temps proche mais inférieur à 24 h.

L'avantage du substrat agarose LMP est qu'il reste humide longtemps, jusqu'à évaporation complète de l'eau qu'il contient. Nous avons donc recherché la quantité d'agarose LMP adéquate à mettre dans des plaques douze puits pour que les rotifères s'y dessèchent en moins de 24h. Les premiers tests de dessiccation nous ont permis de découvrir que les rotifères bdelloïdes n'entraient en anhydrobiose complète que lorsque l'agarose LMP était entièrement sec. Les figures 23A et 23B démontrent la morphologie qu'adoptaient les individus hydratés et complètement desséchés. Chez ces derniers, il n'y avait plus de mouvement interne observable et un aspect segmenté apparaissait. Nous avons également constaté que la durée de dessiccation était trop variable entre le centre et la périphérie du puits. Des boîtes de pétri moyennes (90 mm de diamètre) ont donc été utilisées pour la suite des expériences, afin d'obtenir une dessiccation homogène au centre de la boîte où nous déposons les rotifères.

Durant ces premiers tests de dessiccation en boîtes de pétri 90 mm, une chambre d'incubation était utilisée. Celle-ci était à une température constante de 24 °C et à une humidité relative non contrôlée (proche de 60 %). Plusieurs volumes d'agarose LMP étaient testés afin d'atteindre un taux de survie optimal (Tableau 1). Le taux de survie variait fortement pour une même condition. Pour 15 mL d'agarose LMP par exemple, la gamme de survie s'étendait de 5 % à 70 % d'un test à l'autre. De plus, le taux de survie était inférieur à 50 % dans la majorité des tests. Or, nous contrôlions la température et la quantité d'agarose LMP mais pas l'humidité relative (HR), qui variait entre 54 et 65 %.

Troisièmement, d'après le protocole du professeur C. Ricci, un taux de 40 % d'HR serait la condition optimale pour une survie maximale. Nous avons dès lors acquis un déshumidificateur afin de réduire l'HR à 40 % et de la contrôler au cours du temps.

Parallèlement à cela, selon nos résultats (Tableau 1), le taux de survie maximum de 45 % était obtenu pour 20 mL d'agarose LMP. Or, cette quantité desséchait en plus de 35 h (et non 24 h). D'après le protocole de dessiccation sur agar d'une autre espèce de rotifère bdelloïde du docteur C. Wilson (Comm. Pers.), le taux de survie maximal était obtenu pour un temps de dessiccation proche mais inférieure à 48 h. Ce protocole a donc été suivi pour la suite des expérimentations vu le substrat similaire que nous utilisons.

Pour une HR de 40 % et une durée optimale de 48 h, il a été nécessaire de rechercher à nouveau le volume d'agarose LMP optimal puisque l'évaporation et le dessèchement de l'agarose LMP étaient plus rapides à une HR plus basse. Nous avons testé 30, 40, 50 et 60 mL d'agarose LMP : à 40 mL et 50 mL d'agarose LMP, le dessèchement complet prenait respectivement 39 et 43 h, un temps de dessiccation approprié d'après le protocole de C. Wilson. Cependant, au-delà de 30 mL, l'agarose LMP sec se repliait en une structure aussi dure que du verre et intraitable.

Quatrième étape d'optimisation : ralentir la durée de dessiccation utilisant un volume de 30 mL d'agarose LMP, une température de 24 °C et une HR de 40 %. Afin d'accomplir ceci, nous avons entouré les boîtes de pétri, destinées à la dessiccation, avec des boîtes de pétri remplies d'eau (figure 24). Au cours du processus de dessèchement, l'HR montait ainsi autour de 55 % mais redescendait progressivement à 40 %. Dans de telles conditions, la dessiccation prenait environ 38 h. Nous avons ainsi obtenu un compromis correct entre le temps de dessiccation et l'épaisseur de l'agarose LMP, maniable pour la suite de l'expérience. L'augmentation temporaire de l'HR en début de dessiccation ne posait pas de problème selon le protocole de C. Wilson, l'essentiel étant le maintien à 40 % lorsque les rotifères entraient en anhydrobiose. Il semblerait, en effet, que la survie des rotifères soit compromise si l'HR

monte au dessus de 40 % en cours d'anhydrobiose (C. Wilson, Comm. Pers.). Par ailleurs, dans cette quatrième étape nous avons également optimisé le réveil des rotifères afin d'augmenter le taux de survie d'après des suggestions de Chris Wilson. L'humidité relative de la pièce de la culture fut augmentée de 40 % à 55 % durant 1 h avant l'ajout d'eau sur l'échantillon d'agarose LMP contenant les rotifères. Douze heures après la réhydratation, une observation au microscope était effectuée.

Une fois les optimisations réalisées, une expérience de 14 jours a été menée pour différentes conditions (tableau 2). Les résultats du comptage, pour estimer les taux de survie, sont repris dans le tableau 2, pour chaque condition étudiée, caractérisée par cinq zones de comptage chacune. Un test d'homoscédasticité a été réalisé afin de vérifier si l'application d'une ANOVA était possible. Mais les variances ne sont pas homogènes. Une étude statistique n'est donc pas possible.

La méthode de comptage réalisée nous permet cependant de comparer les proportions de vivants et de morts, d'une condition à l'autre. Elle permet de constater que la proportion de survie est bien meilleure si la déshydratation a été lente que si elle a été rapide. Cependant, si les rotifères morts flottent et se répartissent de manière homogène dans toute la boîte, une grande quantité des rotifères vivants restent concentrés au niveau du morceau d'agarose LMP, à partir duquel ils ont été réhydratés. La proportion de vivants est donc sous estimée sur les bords. De plus, certains rotifères vivants sont repliés et il n'est pas évident de les distinguer des morts : ceux-ci ont donc souvent été considérés comme morts. Cela augmente encore l'écart entre la proportion réelle des rotifères vivants et celle qui a été calculée par ce comptage.

Toutefois, les résultats (tableau 2) montrent, sans aucun doute, un taux de survie important des rotifères ayant subi une dessiccation lente, quelle que soit la période de dessiccation (1, 7 et 14 jours). Nous trouvons des valeurs supérieures à 50 %, sachant que ceci est une sous-estimation du nombre de vivants. La dernière optimisation de notre protocole de dessiccation lente nous a enfin permis d'obtenir des taux de survie importants ; ceci fera d'ailleurs l'objet d'une publication avec le docteur C. Wilson. A l'inverse, la présence significative de morts a été observée pour les rotifères ayant subi une dessiccation rapide pour les différentes périodes étudiées (1, 7 et 14 jours). Après 7 et 14 jours de dessiccations, 99% des rotifères observés sont morts. Ceci démontre l'importance d'une dessiccation lente, avec le contrôle de certains paramètres, pour la survie des rotifères. Cependant, même sans le comptage réalisé qui sous évalue le taux de survie, il n'a pas été possible d'obtenir un taux supérieur à 75 %, comme espéré au départ. On peut se demander s'il est réellement possible d'obtenir un taux de survie aussi élevé. En effet, les rotifères bdelloïdes étant des clones, ils n'ont peut-être pas besoin d'avoir un taux de survie important dans la nature. Un survivant après dessiccation pourrait être suffisant pour que la population se développe à nouveau.

2. Extraction de l'ADN et migration PFGE

L'objectif est l'analyse du profil génomique véritable des rotifères desséchés. Il était donc nécessaire d'utiliser une méthode d'extraction ne cassant pas l'ADN. Deux protocoles d'extraction dans des « plugs » d'agarose LMP ont été testés : le protocole du Dr. Jessica Mark Welch (Comm. Pers.) et celui de E. Gladishev et M. Meselson (40) (Figure 25). Nous avons découvert que la méthode du Dr. J. M. Welch provoquait une dégradation beaucoup plus importante de l'ADN des rotifères bdelloïdes lors de la migration de l'ADN génomique (ADNg) dans la PFGE (figure 25 et 26). La dégradation plus importante est probablement due au broyage des œufs de rotifères dans un mortier avant de les enfermer dans les « plugs » d'agarose LMP. Nous avons donc conclu que l'extraction de l'ADNg selon le protocole de E. Gladishev et M. Meselson était nécessaire pour maintenir l'ADNg le plus intact possible. C'est donc cette méthode qui a été retenue.

D'autres PFGE ont ensuite été réalisées afin d'améliorer la migration et de comparer le profil d'individus non desséchés (contrôle) et d'individus desséchés depuis 24 h (figure 27 et 28).

La figure 28 démontre l'importance d'avoir un très grand nombre de rotifères pour obtenir un profil bien marqué par PFGE. Collecter 200 rotifères est largement insuffisant pour obtenir un profil ADN sur le gel. La figure 28 démontre également le profil de l'ADN d'individus exposés à une température de 100 °C durant 1 h. L'ADN est dégradé à haute température. Une « traînée » reflétant l'ADN dégradé apparaît sur le gel, confirmant que les profils de migration de l'ADN par PFGE sont caractéristiques de l'état du génome des rotifères.

Les figures 27 et 28 présentent le profil des individus non desséchés en comparaison avec celui d'individus desséchés depuis 24 h. Les deux profils semblent identiques : les individus desséchés depuis 24 h ne semblaient pas avoir des cassures double-brins dans l'ADN. Apparemment, la dessiccation ne provoquait pas davantage de dégradation d'ADN par rapport aux individus hydratés (figure 27 et 28).

Toutefois, d'après l'article de Mattimore *et al.* (36), l'ADNg des bactéries *Deinococcus radiodurans* est dégradé progressivement lors de l'état d'anhydrobiose. A partir de 14 jours de dessiccation, l'ADN semble cassé chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*, et le nombre de cassures augmente avec le temps de dessiccation. La figure 29 est reprise de l'article de Mattimore *et al.* (36) pour comparaison. Bien que la bactérie *Escherichia coli* ne résiste pas à la dessiccation, le même pattern s'observe également chez celle-ci (36). Ces constatations nous ont incités à réaliser une expérience de dessiccation de plus longue durée : un nombre important de rotifères bdelloïdes *A. vaga* ont été déshydratés durant 14, 7 et 1 jours. Les paragraphes suivants décrivent les résultats de cette expérience de dessiccation.

Après 14, 7 et 1 jours d'anhydrobiose, l'agarose LMP desséché lentement a été découpé en deux parties égales. Une partie a servi à montrer le profil génomique d'individus desséchés, et la seconde a été utilisée pour réaliser le profil des individus réhydratés (figure 30). Le même principe a été appliqué pour l'agarose LMP, desséché rapidement après 14, 7 et 1 jours d'anhydrobiose. Nous avons également récolté les rotifères non desséchés d'une boîte de culture (contrôle) pour le comparer aux individus desséchés et réhydratés. Ce contrôle est majoritairement composé d'individus *A. vaga* vivants ; peu de morts ont été observés dans la culture.

La figure 31.1 montre le profil ADN de rotifères bdelloïdes *A. vaga* desséchés dans les conditions assurant un taux de survie optimal (dessiccation lente) et le profil de rotifères desséchés dans de mauvaises conditions (dessiccation rapide) pendant 1, 7 et 14 jours. Le profil de l'ADN des rotifères desséchés lentement est similaire au profil de l'ADN de ceux non desséchés (contrôle). Par contre, le profil des rotifères desséchés rapidement montre une plus grande quantité de petits fragments d'ADN. Une analyse de l'intensité lumineuse pour chaque condition avec le logiciel « Quantity one » de BioRad (figure 31.2) nous a permis de confirmer les profils observés sur gel. Pour ce qui concerne les rotifères desséchés lentement, le pic correspondant à l'ADN intact dépasse le pic d'ADN dégradé, comme pour les rotifères non desséchés (le contrôle). Par contre, pour les rotifères desséchés rapidement, le pic correspondant à l'ADN intact est inférieur au pic d'ADN dégradé. Cette tendance est valable pour 1 jour et 7 jours comme pour 14 jours de dessiccation.

Contrairement à ce que l'on observe pour les rotifères soumis aux radiations ionisantes (40) et pour la bactérie *D. radiodurans* soumise à ces mêmes radiations et à la dessiccation (36), cette dernière ne semble pas provoquer de cassure double-brins de l'ADN lorsqu'elle est lente, en tout cas pour la période étudiée (14 jours). Il serait donc nécessaire d'analyser le profil ADN d'individus desséchés à plus long terme afin de démontrer si la dessiccation induit effectivement des cassures double-brins dans l'ADN au cours du temps, comme chez la bactérie.

Pour la période étudiée, le profil de l'ADN des rotifères ayant subi une dessiccation rapide présente davantage de petits fragments que l'ADN des rotifères, desséchés lentement. De plus, dans le cas de la dessiccation rapide, cette dégradation semble augmenter au cours du temps (voir trait rouge figure 31.1). Or nous savons que la dessiccation lente assure un taux de survie bien supérieur à celui de la dessiccation rapide (tableau 2). Un mécanisme de protection de l'ADN serait-il mis en place lors d'une dessiccation lente afin de maintenir l'intégrité de l'ADN et afin d'augmenter la survie des rotifères ? Lorsque la dessiccation est rapide, les rotifères manqueraient-ils de temps pour protéger leur ADN engendrant ainsi un taux de survie réduit ?

Cette hypothèse est purement spéculative et nécessite des tests supplémentaires. Par ailleurs, la méthode n'est pas encore au point. La « traînée » d'ADN observé chez le contrôle peut être due à la présence de morts dans l'échantillon récolté ou à la méthode d'extraction qui induit encore des cassures d'ADN. Nous avons soumis le ladder de *Saccharomyces cerevisiae* au même protocole d'extraction que nos échantillons afin de vérifier s'il y avait dégradation suite au mode d'extraction. Cependant, nous n'avons pas pu observer de différence car la migration s'est mal déroulée probablement à cause d'un problème de réglage de la température dans la cuve de la PFGE (résultats non montrés). Il serait donc intéressant de réitérer l'expérience. Un autre élément qui n'est pas encore au point est la quantité de rotifères et donc d'ADN qui n'est pas parfaitement identique pour chaque condition car les rotifères étaient collectés massivement. Seule l'allure du profil général obtenu pour chaque condition peut donc être analysée. Il serait nécessaire de trouver le moyen de récolter une même quantité de rotifère pour chaque condition afin de pouvoir observer l'évolution de la quantité d'ADN dégradé et intact au cours du temps et ce, en fonction du mode de dessiccation.

La figure 32.1 montre le profil ADN des rotifères *A. vaga* réhydratés après une dessiccation lente et rapide de 1, 7 et 14 jours. Le profil des rotifères réhydratés est similaire à celui du

contrôle, quelle que soit la condition de dessiccation. Le fait que l'allure des profils s'inverse entre les individus desséchés rapidement (figure 31.2.b, droite noire) et les individus réhydratés après cette dessiccation rapide (Figure 32.2.b, droite noire), permet de considérer que l'ADN dégradé n'est pas uniquement celui des morts. En effet, il semblerait qu'après réhydratation, la proportion d'ADN intact par rapport à l'ADN dégradé augmente.

La conclusion que l'on peut émettre au terme des expérimentations est que la dessiccation ne semble pas provoquer de cassures double-brins d'ADN, pour la période étudiée. Cependant, l'interprétation des profils obtenus n'est pas aisée. D'abord, nous n'avons pas la même quantité d'ADN d'un « plug » à l'autre. On ne peut donc comparer que l'allure générale de chaque profil les uns par rapport aux autres. Ensuite, des triplicats seraient nécessaires afin de vérifier la reproductibilité des résultats. Et enfin, prolonger le temps de dessiccation serait nécessaire pour connaître le profil de l'ADN au-delà de 14 jours.

Une hypothèse purement spéculative que l'on a postulée, par une comparaison de l'allure des différents profils, est que les rotifères pourraient être capables de protéger leur génome lorsque la dessiccation est lente. Par contre, si la dessiccation est rapide, ils n'auraient pas le temps de mettre en route les mécanismes de protection mais seraient capables de résister aux dégradations de l'ADN provoquée par la dessiccation, ceci grâce à un mécanisme de réparation spécifique (capacité prouvée lors de l'exposition aux radiations ionisantes (40)). Cette seconde condition offrirait un taux de survie plus faible mais assurerait le maintien de la population.

II. Projet génoscope

Le projet Génoscope a été initié cette année par le laboratoire du professeur K. Van Doninck et l'institut de séquençage français Genoscope. Il a pour objectif de séquencer le génome entier du rotifère bdelloïde de l'espèce *A. vaga*. Nous participons à ce projet en fournissant entre autre le matériel génétique nécessaire au séquençage.

Dans le cadre de ce mémoire, l'ADN génomique (ADNg) a été extrait à partir d'œufs de *A. vaga* et a été envoyé à l'Institut Genoscope à Evry en France pour le séquençage. La méthode d'extraction utilisée était le broyage d'œufs dans un mortier refroidi et puis une extraction de type phénol chloroforme.

Tous les œufs que nous avons extraits de nos cultures d'*A. vaga* et ensuite nettoyés au clorox étaient propres car il n'y avait plus aucune présence de bactéries (test de contamination sur plaques LB) ni de rotifères adultes. Afin de vérifier préalablement l'efficacité de l'extraction au phénol-chloroforme à partir des œufs moulus, nous avons utilisé le spectrophotomètre Nanodrop qui nous informe de la quantité et de la pureté de l'ADN dans notre échantillon. Le pic obtenu à 260 nm correspond à l'absorbance de l'ADN. Le ratio 260/280 informe sur la contamination de l'ADN par des protéines : un ratio entre 1.8 et 2.0 signifie que l'ADN est plus ou moins pur. Le ratio 260/230 informe de la pureté de l'ADN de l'échantillon vis à vis des composés organiques absorbant à 230 nm, tel que le phénol. La valeur que doit avoir le ratio 260/230 pour de l'ADN pur est compris entre 2.0 et 2.2 (90). Dans la figure 33, un échantillon d'ADNg pur a été quantifié et analysé par le Nanodrop. Nous avons aussi testé la quantité d'ADNg de nos échantillons avec le fluorimètre Qubit. Cette méthode donnait à chaque fois une quantité à peu près 8 fois inférieure à la quantité donnée par la méthode du Nanodrop. Il n'est pas évident de savoir quelle méthode fournit le

résultat le plus représentatif mais nous avons utilisé le spectrophotomètre Nanodrop pour la suite des expérimentations car la méthode est simple, rapide et fournit les informations utiles sur la pureté et la quantité d'ADN.

III. Génétique des populations

En théorie, les organismes asexués sont voués à une extinction précoce. Cependant, les rotifères bdelloïdes semblent être une exception puisqu'ils vivent depuis plus de 40 millions d'années sans sexualité et ils sont parvenus à se diversifier en 461 espèces (4). Cependant aucune étude n'a été effectuée pour étudier leur diversité génétique au sein d'une population dans la nature. Dans ce mémoire, une première étude génétique de population de rotifères bdelloïdes de l'espèce *Adineta vaga* a été réalisée à l'aide de microsatellites. Nous avons pour objectif d'étudier une population au sein d'une mousse temporaire à Namur. Grâce aux microsatellites nous voulions investiguer si un seul ou plusieurs clones coexistaient dans une population et vérifier si la diversité clonale était élevée. Par ailleurs, une telle étude pouvait également offrir des indications concernant leur mode de reproduction : y a-t-il effectivement absence d'échange génétique et un déséquilibre de Hardy-Weinberg? L'asexualité des rotifères bdelloïdes reste, en effet, une hypothèse dans le monde scientifique.

L'analyse des microsatellites permet d'étudier la variabilité génétique au sein et entre les populations d'une espèce. Nous avons étudié la variabilité génétique d'une population de *Adineta vaga* provenant d'une mousse poussant au pied d'un arbre à Namur (N 50° 27.650' - S 004° 51.466'). L'utilisation des microsatellites dans l'étude de la génétique des populations est particulièrement appropriée car ce sont des marqueurs qui présentent un haut niveau de polymorphisme, ils sont neutres et codominants.

1. Collecte et détermination de l'espèce

Pour étudier une population d'*Adineta vaga* dans une mousse, nous avons prélevé aléatoirement plusieurs individus représentatifs de la population. La détermination de l'espèce était nécessaire avant toute analyse car on retrouve plusieurs espèces de rotifères bdelloïdes au sein d'une mousse (91, observation personnelle). La détermination sur base morphologique était peu aisée. Sous grossissement 10X, nous avons pu déterminer la forme globale de l'animal et, à l'aide de la clé de détermination (92), en déduire aisément le genre. Une étude plus minutieuse aux grossissements supérieurs et en utilisant des composés fixateurs était nécessaire afin de déterminer morphologiquement l'espèce de manière précise et objective. Malheureusement, *Adineta vaga* fait partie des taxa illoricates : la fine enveloppe chitineuse chez ces taxa provoque, en cas de stress, la rétraction de leur trochi, un caractère morphologique essentiel à la détermination de l'espèce. Une identification au microscope optique n'était donc pas toujours possible. Afin de confirmer que les individus sélectionnés, étaient effectivement de cette espèce, le gène CO1 de chacun des individus a été séquencé.

Nous avons réalisé un *nucleotide blast* (blastn) des séquences CO1 obtenues avec les banques de données nucléotidiques NCBI. Comme présenté dans la figure 34, nous avons très probablement bien isolé des individus rotifères bdelloïdes de l'espèce *Adineta vaga*. En effet, premièrement, les E-values (« *expectation values* »), estimant les chances d'obtenir le même résultat par hasard, sont très faibles. Cela signifie que le résultat n'est pas aléatoire et que l'alignement est fiable. Deuxièmement, les scores des premières séquences sont élevés.

Cela indique qu'elles sont fort similaires à la séquence testée. Les 5 premières séquences montrent qu'il s'agit d'une partie du gène codant pour la première sous unité du cytochrome oxydase de l'espèce *Adineta vaga*.

2. Culture et extraction de l'ADN

Pour l'étude de la variabilité génétique au sein de la population *A. vaga* d'une mousse, nous voulions comparer les individus les uns par rapport aux autres. Il était donc important d'utiliser une méthode d'extraction à partir du plus petit nombre de rotifères possible vu que le clonage des individus se fait lentement.

Dans un premier temps, deux méthodes d'extractions ont été testées : la méthode Chelex et le kit Qiagen DNeasy « tissus ». Pour ces deux méthodes, au moins cinq individus étaient nécessaires et 5 µL d'ADN devaient être utilisés pour l'amplification de chaque microsatellite (résultats non montrés). L'utilisation de ces méthodes d'extraction nécessitait donc que chaque individu isolé se multiplie abondamment pour pouvoir réaliser l'étude complète des microsatellites sur chacun d'eux. Or, la mise en culture et la multiplication des individus prélevés n'a fonctionné que sur 5 % des individus isolés, et seulement trois individus se sont multipliés en un clone contenant des centaines d'individus. La raison principale de tous ces échecs de mise en culture est probablement l'âge du rotifère isolé. La fertilité diminue en effet avec l'âge (29). Par ailleurs, nous émettons l'hypothèse que si la population n'atteint pas rapidement une certaine densité, la prolifération de bactéries et/ou de champignons devient trop importante et les individus meurent.

Par la suite, une autre méthode d'extraction, renseignée par le Dr. Diego Fontaneto a été utilisée, le microkit QiAamp (Qiagen). Celle-ci a permis d'extraire l'ADN d'un seul individu et 2 µL de l'extraction d'ADN seulement suffisait pour l'amplification du microsatellite. Cette méthode a permis d'extraire l'ADN des individus directement isolés de la mousse sans devoir les mettre en culture.

La figure 35 illustre les différences de concentration en ADN mesurées par le Nanodrop après extraction par la méthode Chelex et par le microkit QiAamp. Cependant, le chelex contient des billes de résine qui pourraient interférer avec le spectromètre, ce qui empêcherait une quantification par le Nanodrop et expliquerait la si faible quantité en ADN mesurée.

3. Conception des amorces des microsatellites

Nous avons obtenu du Prof. K. Van Doninck des séquences ADN des contigs des histones (~35 kb) et des protéines heat shock (~40 kb) de l'espèce *Adineta vaga*. Plus précisément, quatre contigs des gènes histones et trois contigs de hsp82 avaient été séquencés (66, 67) ce qui nous donnait un total d'environ 260 kb de séquences ADN. Les microsatellites ont été recherchés dans ces séquences et les paires d'amorces nécessaires pour amplifier les microsatellites ont, quant à elles, été conçues grâce au programme Oligofactory (88). Au final, 64 amorces ont été conçues via ce logiciel (voir Annexe)

4. Test des microsatellites par PCR classique

Dans un premier temps, les 64 paires d'amorces ont été testées sur l'ADN d'*A. vaga*, le clone issu d'Harvard, qui a servi à réaliser le séquençage des contigs. Ces premiers tests sur ce modèle ont permis de mettre au point les paramètres d'amplification PCR appropriés pour chaque microsatellite. Nous avons notamment testé deux polymérases (Fast Start et Go Taq de la compagnie Promega). La figure 36 présente le produit PCR amplifié avec les deux polymérases pour deux paires d'amorces (HisE3 et HspD8). La polymérase Go Taq a donné un produit d'amplification plus important et nous l'avons donc utilisée pour la suite des expérimentations. Nous avons ensuite testé des températures d'hybridations différentes pour connaître la meilleure condition d'amplification. La figure 37 montre le résultat d'une amplification PCR pour huit paires d'amorces. En testant différentes températures d'hybridation, nous avons pu déterminer la température optimale pour chacune des amorces tout en évitant de descendre trop en température afin de limiter l'apparition de bandes aspécifiques. Les 64 paires d'amorce testées ont finalement donné une bande nette spécifique des microsatellites à une température d'hybridation donnée pour *A. vaga* issu du clone d'Harvard.

Notre objectif étant d'étudier la variabilité génétique au sein d'une population d'*A. vaga* issu d'un habitat naturel récolté à Namur, les amorces devaient également être testées sur ces individus venant de Namur. Nous avons testé les 64 paires d'amorces sur l'ADN des deux clones s'étant multipliés le plus abondamment en culture. Douze paires d'amorces ont finalement donné une amplification pour ces deux clones issus de la mousse à Namur (Figure 38 et 39).

5. Génotypage des microsatellites avec des dntps fluorescents

Douze microsatellites qui ont pu être amplifiés par PCR ont ensuite été utilisés pour le génotypage sur le séquenceur ABI à l'aide de nucléotides fluorescents. Ces expériences ont été réalisées pour sept individus de la population « mousse Namur » s'étant multipliés en culture. Ces tests ont permis de s'assurer que les paires d'amorces fonctionnaient également sur plus de deux individus et que nous étions en présence de polymorphisme pour chacun des microsatellites. Après plusieurs génotypages, nous avons conclu que sept microsatellites seulement donnaient des pics d'amplification spécifique, qui se distinguaient du bruit de fond. La figure 40 montre le profil de génotypage de l'un des sept microsatellites amplifiés pour les sept individus.

6. Génotypage des microsatellites avec des amorces fluorescentes

Suite à la sélection et l'optimisation des amorces, sept microsatellites pouvaient servir à étudier la population naturelle *A. vaga* de Namur. Au total, 23 individus pris aléatoirement dans la mousse avaient été vérifiés comme étant *A. vaga* et représentaient la population étudiée. Pour cette analyse finale, nous avons utilisé sept amorces fluorescentes plutôt que les nucléotides fluorescents afin d'obtenir un résultat plus précis de la taille de chaque allèle lors du génotypage.

Un multiplexage a été réalisé afin de génotyper plusieurs microsatellites en une fois. Nous avons pu multiplexer car les tailles de certains microsatellites étaient suffisamment différentes pour pouvoir les génotyper ensemble sans risque de les confondre. Pour ce multiplexage, les amorces présentes dans le même « complexe » avaient des fluorochromes différents : le dragon-fly orange et le FAM étaient les deux fluorochromes utilisés. Le tableau 3 démontre les groupes d'amorces formés pour le multiplexage.

Les sept paires d'amorces fluorescentes ont d'abord été testées sur les deux clones abondants afin d'optimiser la condition d'amplification : un pic bien net devait être obtenu lors du génotypage au séquenceur ABI. Ensuite, les sept marqueurs ont été testés sur l'ADN des 23 individus isolés. Lors du génotypage, deux paires d'amorces n'ont donné des résultats que pour quelques individus seulement. Cela signifie qu'il y a sans doute eu mutation dans ces régions pour certains individus. Une constatation étrange est que ces deux microsatellites sont situés dans des séquences codantes alors que les cinq autres sont dans des régions extérieures aux gènes. Puisque la pression de sélection dans une séquence codante est élevée, si des mutations ont eu lieu, elles sont probablement synonymes. C'est-à-dire que la mutation au sein d'un codon n'a pas entraîné de changement d'acide aminé (redondance du code génétique). Et si c'est le cas, les acides aminés doivent probablement avoir les mêmes propriétés afin de ne pas influencer la structure et donc la fonction de la protéine. Pour connaître la raison exacte de l'amplification de ces 2 microsatellites chez seulement certains individus, il serait nécessaire de séquencer la région concernée pour les 23 individus et de comparer les séquences. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps dans le cadre de ce mémoire d'effectuer cette vérification.

La figure 41 montre la répartition de ces cinq microsatellites dans les contigs étudiés. Le nombre limité de microsatellites et la dispersion restreinte dans le génome d'*Adineta vaga* nous avertit que les résultats obtenus devront être traités prudemment. Deux microsatellites sont situés sur le contig HisAv1 et les trois autres se trouvent sur le contig HisAv3. Ces deux contigs se situent chacun sur une des deux paires colinéaires (HisAv1 sur la paire A et HisAv3 sur la paire B). Aucun microsatellite situé sur les contigs des gènes « heat shock protein » n'a pu être amplifié pour les individus *A. vaga* trouvés dans la mousse de Namur.

Les résultats du génotypage sont particuliers dans certains cas. En effet, il est parfois difficile de distinguer un allèle d'une « stutter band ». Les « stutter bands » correspondent à des amplifications avortées du microsatellite. Ce sont des pics de taille inférieure à l'allèle mais multiple du motif répété du microsatellite (figure 42). La réalisation de plusieurs génotypages pour le même microsatellite a permis de les discriminer car le signal correspondant aux allèles est reproductible alors que les « stutter bands » peuvent changer ou disparaître d'une fois à l'autre.

L'analyse génétique finale de la population de Namur a finalement été réalisée avec cinq microsatellites sur 23 individus. Le software Arlequin version 3.0 (93) a été utilisé. Ce logiciel intègre des méthodes avancées pour l'analyse des données génétiques au sein d'une population et a permis de calculer l'équilibre de Hardy-Weinberg (tableau 4) et la mesure de l'équilibre de liaison.

Une déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg est observée (P -value = 0.000). Si nous avons observé un équilibre de Hardy-Weinberg (P -value > 0.05), l'hypothèse de l'asexualité des rotifères bdelloïdes pouvait être remise en question. Chez les sexués on s'attend à trouver un équilibre entre les fréquences des génotypes et des allèles s'il y a croisement et qu'il y a

appariement aléatoire des allèles lors de la reproduction. Le déséquilibre de Hardy-Weinberg observé ici est une caractéristique des populations asexuées. Cependant, il faut noter que les populations sexuées peuvent également présenter cette caractéristique momentanément (voir introduction 3.3.2) et qu'il faut d'autres éléments pour confirmer l'asexualité des rotifères bdelloïdes. Par ailleurs, nous avons un nombre réduit de microsatellites et de clones étudiés et ceci peut biaiser l'analyse de Hardy-Weinberg.

Un déséquilibre de liaison apparaît également dans cette étude (P -value = 0 pour tous les loci). Un déséquilibre a lieu lorsque les allèles de loci différents sont trop fréquemment transmis ensembles. Dans une population asexuée, puisque la reproduction est uniparentale et que tous les chromosomes sont transmis à la descendance, un déséquilibre de liaison est logiquement présent. Toutefois, dans notre expérience nous devons être prudent sur cette conclusion car nous n'avons utilisé que cinq microsatellites qui sont répartis sur seulement deux chromosomes et qui sont proches les uns des autres sur ces chromosomes (figure 41). Le fait qu'ils soient transmis ensemble peut donc être dû à leur asexualité ou à leur position proche les uns des autres dans le génome.

Tous les autres microsatellites testés (64 au total), qui sont répartis dans d'autres régions génomiques, n'ont pas pu être amplifiés sur toute notre population « mousse Namur » alors que les individus sont de la même espèce *A. vaga*. Ceci indique qu'il y a, au sein de l'espèce *A. vaga*, une grande variabilité génétique car seulement les microsatellites situés dans des régions très conservées du génome, à savoir les histones, ont pu être utilisés ici. Par ailleurs, nos résultats peuvent renforcer l'hypothèse du caractère cryptique de l'espèce *A. vaga*.

Le logiciel Arlequin calcule également des indices génétiques standards que sont le nombre d'allèles différents, l'hétérozygotie et la diversité génotypique. Ces indices ont été calculés pour les microsatellites de notre population d'*A. vaga* (tableau 4). Il apparaît que sur les 23 individus étudiés de la population « mousse Namur », le nombre moyen d'allèles par locus est de 5.2 (la diversité allélique). L'absence de populations sexuées chez les rotifères bdelloïdes nous oblige à comparer cette valeur à celles qui ont été obtenues dans des études d'espèces où il y a présence de populations sexuées et asexuées (vu que le rotifère bdelloïde représente le seul eucaryote étant complètement asexué). A ce jour, la seule analyse microsatellites menée sur d'autres rotifères a été réalisée par les scientifiques A. Gomez et G. R. Carvalho (84), sur une espèce de rotifère monogononte. Cette étude compare génétiquement des populations du rotifère *Brachionus plicatilis*, en phase sexuée et en phase parthénogénétique à l'aide de 7 microsatellites. Le nombre moyen d'allèles par locus pour la phase sexuée est de 3.7 et pour la phase parthénogénétique de 3.3, ce qui représente une diversité allélique plus faible que celle qui est observée pour notre population *A. vaga*. Nous avons également comparé notre valeur de diversité allélique avec l'étude menée par les scientifiques Kanbe et Akimoto (69). Ceux-ci ont comparé des populations sexuées et asexuées du puceron *Acyrtosiphon pisum* à l'aide de 7 microsatellites. Les populations sexuées dans cette étude ont un nombre d'allèles moyen par locus allant de 2.43 à 3.00, alors que les populations asexuées ont un nombre d'allèles par locus allant de 4.57 à 5.57. La diversité allélique de la population d'*A. vaga* est similaire à celle retrouvée dans la population asexuée de ce puceron. Une diversité allélique élevée correspond bien à ce qui est attendu pour une population asexuée. En effet, dans les populations sexuées, la fréquence de transmission des allèles varie d'une génération à l'autre à cause du hasard intervenant dans la reproduction sexuée au cours de la méiose. Un allèle peut donc totalement disparaître de la population sexuée. Les organismes asexués ne subissent pas cette dérive génétique, ils ont donc généralement un nombre d'allèles plus important (69).

Parmi les 23 individus d'*A. vaga* étudiés pour les 5 microsatellites, nous observons une hétérozygotie inférieure (0.478) à celle qui était attendue (0.631). Les valeurs d'hétérozygotie observées, par exemple, chez les monogonontes *B. plicatilis* dans l'étude de Gomez et Carvalho (84), sont de 0.45 en phase sexuée et 0.61 en phase parthénogénétique. On s'attend donc bien à une hétérozygotie plus élevée dans une population asexuée à cause de « l'effet Meselson » (voir introduction 3.3.2.). Cependant, comme expliqué dans l'introduction au point 3.3.2, « l'effet Meselson » ne s'observe pas chez les rotifères bdelloïdes. Les éventuelles réparations fréquentes dans leur génome suite à des cycles de dessiccation pourraient expliquer l'homogénéisation observée entre les allèles et l'absence de l'effet Meselson (4).

Il apparaît également que sur les 23 individus de notre population, 13 génotypes différents sont présents et la diversité génotypique est égale à 0.57 (ratio Nombre de génotype G/Nombre d'individus N). Si l'on compare cette valeur avec l'étude menée sur les pucerons sexués et asexués par les scientifiques Kanbe et Akimoto (69), la diversité génotypique de la population d'*Adineta vaga* est élevée. En effet, les populations asexuées de pucerons présentent une diversité génotypique de 0.10 à 0.18 alors que les populations sexuées ont une diversité génotypique de 0.45 à 0.69. La diversité génotypique de la population d'*A. vaga* est donc étrangement élevée pour une population asexuée. On s'attend normalement à trouver une diversité génotypique faible chez les asexués car ils ne se reproduisent pas par croisement comme les sexués. Le nombre de combinaison allélique est donc plus faible chez eux. Il est donc intéressant d'observer une diversité génotypique élevée car cela pourrait indiquer un partage d'allèles résultant d'un mécanisme alternatif aux recombinaisons sexuelles, leur ayant permis de diversifier les génotypes. Ceci reste cependant spéculatif et nécessite d'autres expériences.

Au cours de cette étude de génétique des populations, l'un des cinq microsatellites étudiés (HisI9) présentait un signal faible lors du génotypage. Cela peut être dû à un problème de température d'hybridation. En effet, lors des mises au point de l'amplification de ce microsatellite, la température idéale d'hybridation était de 52.4 °C. Or lors de ce dernier génotypage, la PCR réalisée avec les amorces fluorescentes s'est déroulée à la température recommandée du multiplexage de 57 °C. Il serait intéressant de refaire le génotypage pour ce microsatellite en utilisant une température d'hybridation plus faible lors de la PCR afin d'obtenir des représentations d'allèles plus nettes. Puisque le signal de ce microsatellite était très faible, il était difficile de distinguer les différents allèles. Nous avons donc décidé de réaliser une nouvelle analyse génétique avec le software Arlequin en ne reprenant que les 4 microsatellites présentant un signal fort au génotypage. La nouvelle analyse donne une diversité allélique qui reste élevée (4.7) et une diversité génotypique également relativement élevée (0.39). Ces résultats continuent de refléter une diversité clonale importante chez une population *A. vaga* au sein même d'une mousse, représentant un habitat restreint.

Les analyses ultérieures ont été réalisées pour les 4 microsatellites dont le signal était fort. Nous avons comparé les allèles et les génotypes obtenus pour nos clones de Namur avec le génotype d'*Adineta vaga* du clone Harvard (tableau 5). Pratiquement tous les allèles du clone de Harvard se retrouvent dans la population de Namur mais les génotypes du clone d'Harvard sont différents de ceux des clones de Namur. Le génotype différent pourrait s'expliquer par une évolution dans des habitats fortement isolés. Cependant, comment expliquer qu'ils partagent les mêmes allèles ? Ont-ils été sélectionnés parce qu'ils étaient avantageux ?

La diversité haplotypique obtenue pour le gène mitochondrial CO1 pour les 23 individus étudiés a été comparée à la diversité génotypique des 4 microsatellites pour ces mêmes individus (Tableau 6). On peut observer que la diversité génotypique des microsatellites est plus élevée que la diversité haplotypique de CO1. Certains clones, ayant des génotypes microsatellites différents, ont le même haplotype au niveau du gène mitochondrial CO1. Les régions microsatellites sont donc plus variables que le gène CO1. La figure 43 présente les arbres phylogénétiques basés sur les génotypes microsatellites et sur les haplotypes CO1. Comme expliqué dans l'introduction au point 3.3.1, la comparaison des arbres de l'ADN nucléaire (ADNn) et mitochondrial (ADNmt) permet de révéler s'il y a congruence phylogénétique ou non entre les deux. S'il y a congruence, l'histoire évolutive de l'ADNmt et de l'ADNn doit être la même. Ceci est possible lorsque l'ADNn est transmis de manière uniparentale, tout comme l'ADNmt, un phénomène retrouvé chez les asexuées. Par contre, les sexués présentent une transmission biparentale de l'ADNn, suite à un rassemblement des gènes maternels et paternels. Il y a donc incongruence entre les arbres nucléaires et mitochondriaux. L'analyse et la comparaison de ces deux arbres dans la figure 43 et le tableau 6 permettent de réaliser une telle comparaison préliminaire au sein d'une population d'*Adineta vaga*. S'il y avait une parfaite congruence entre nos arbres d'ADNmt et d'ADNn, les génotypes « microsatellites » seraient regroupés de la même façon que dans l'arbre d'ADNmt (voir tableau 6 et figure 43). Ce n'est pas le cas pour les génotypes 1 et 5 qui se retrouvent regroupés dans l'arbre des données microsatellites (Figure 43 A) alors qu'ils appartiennent aux haplotypes 1 et 3, qui ne sont pas regroupés dans l'arbre mitochondrial (Figure 43 B). En ce qui concerne les autres génotypes : les génotypes 7 et 8 se regroupent et appartiennent au même haplotype 5, tout comme les génotypes 2,3 et 4 qui appartiennent à l'haplotype 2, enfin les génotypes 6 et 9 sont regroupés et correspondent respectivement aux haplotypes 4 et 6 également regroupés. Si la majorité des génotypes et des haplotypes sont rassemblés dans l'arbre comme dans le tableau, quelques génotypes ne le sont pas. Ce dernier résultat est fort intéressant et peut refléter un éventuel échange allélique entre individus qui sont différents au niveau mitochondrial. Une autre explication possible serait une origine hybride des rotifères bdelloïdes, asexués. Dans ce cas, la tétraploïdie des rotifères bdelloïdes pourrait être due à un croisement entre deux espèces proches (41, 45).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. Dessiccation et Survie à long terme

La raison de la quasi-universalité de la reproduction sexuée chez les organismes métazoaires reste un mystère à l'heure actuelle car les dépenses en énergie pour ce mode de reproduction sont énormes et la croissance de la population est réduite par rapport à une population asexuée. En effet, une population dans laquelle tous les individus se reproduisent par clonage devrait avoir rapidement un rendement reproductif bien supérieur aux populations sexuées. Ainsi, en 10 générations, une lignée à reproduction clonale devrait avoir 1000 fois plus de descendants qu'une lignée sexuée dans laquelle seules les femelles produisent une descendance, si le ratio des descendants sexués est de 50 % males, 50 % femelles (45).

Pourtant, des lignées à reproduction asexuée apparaissent régulièrement mais elles s'éteignent avant même de prospérer et de se diversifier (45). La sexualité doit donc présenter un avantage majeur qui expliquerait sa généralisation dans le monde eucaryote. Bon nombre d'hypothèses tentent d'apporter une réponse à l'avantage de la reproduction sexuée. D'une part, un brassage génétique serait nécessaire à chaque génération afin d'assurer une variabilité génétique permettant aux génotypes les mieux adaptés de persister et donc d'être sélectionnés. Ceci assurerait la survie des organismes dans un environnement changeant et compétitif. Le brassage génétique permanent dans une population sexuée permet à des mutations favorables apparues dans des lignées différentes de se retrouver rapidement dans un même génome. Par contre, dans une lignée asexuée, plusieurs mutations favorables ne pourront se retrouver dans un même génome que si elles surviennent toutes dans la même lignée. Il faut donc beaucoup de temps et un effectif d'individus, ayant la première mutation, suffisamment élevé pour que la seconde mutation puisse apparaître de manière probable dans la lignée. L'adaptation est donc plus lente dans une population à reproduction asexuée (49). D'autre part, les organismes à reproduction sexuée sont capables d'empêcher l'accumulation de rétrotransposons dans leur génome grâce aux recombinaisons ectopiques et au mécanisme de silençage SMUD (*Meiotic Silencing by Unpaired DNA*) (94). Une lignée à reproduction asexuée, n'ayant pas ces mécanismes de limitation, serait donc soumise à une accumulation indéfinie des rétrotransposons à chaque génération. L'effet néfaste de cette accumulation pourrait participer à l'extinction précoce des lignées asexuées (95).

Cependant, les rotifères bdelloïdes semblent déroger à cette règle et être l'exception dans le monde eucaryote. Non seulement ils seraient asexués et existeraient depuis plus de 40 millions d'années (56), mais ils sont également parvenus à se diversifier en 19 genres et pas moins de 461 espèces (4), et à s'établir dans différents types d'habitats comme les milieux aquatiques, les mousses, les lichens ou le sol (96). Il semblerait donc qu'ils aient trouvé le moyen de persister, d'évoluer et d'être capables de s'adapter sans avoir besoin d'une reproduction sexuée.

La résistance des rotifères bdelloïdes à la dessiccation leur permet de coloniser des milieux hostiles pour de nombreux organismes, et les protège des prédateurs et des parasites cohabitant qui sont moins tolérants à ce type d'environnement. Cette caractéristique est probablement pertinente à leur survie. Toutefois, d'autres facteurs interviennent car nous savons qu'ils sont parvenus à se diversifier fortement (75). De plus, l'étude sur les microsatellites réalisée dans le cadre de ce mémoire démontre que la diversité génétique s'étend déjà au sein d'une population restreinte. Si nous considérons que les rotifères

bdelloïdes sont bien asexués, des mécanismes de diversification génétique et de protection contre l'accumulation de rétrotransposon doivent exister pour leur permettre de prospérer à long terme.

Deux hypothèses majeures qui n'ont pas encore été prouvées expérimentalement pourraient expliquer la diversification et la survie à long terme des rotifères bdelloïdes. Elles mettent toutes deux en jeu leur capacité de dessiccation à n'importe quel stade de leur vie. D'une part, l'équipe du professeur Meselson (78) a démontré la présence de gènes étrangers fonctionnels au niveau des télomères dans le génome des rotifères bdelloïdes. Ils seraient apparemment capables de réaliser des transferts horizontaux d'ADN et de pouvoir insérer de l'ADN d'autres organismes au sein de leur génome. Or, les transferts horizontaux non endosymbiotiques chez les organismes eucaryotes sont très rares, probablement en partie à cause de l'isolement de leur ADN. Chez les procaryotes, les processus de transformation, de transduction et de conjugaison permettent le transfert aisé d'ADN étranger (97). Chez les organismes eucaryotes, ils pourraient être associés à la transfection virale ou à la relation hôte-parasite mais restent rares chez les animaux. Les scientifiques proposent que la disruption de la membrane et la fragmentation éventuelle de l'ADN, associées aux cycles de dessiccation répétés, pourraient faciliter les transferts horizontaux de l'ADN chez les rotifères bdelloïdes et ainsi apporter de la diversité génétique (78). Toutefois, il serait nécessaire de vérifier que les transferts horizontaux s'effectuent à l'heure actuelle au sein des rotifères bdelloïdes. D'autre part, la dessiccation pourrait déclencher des cassures double-brins dans le génome des rotifères bdelloïdes, comme il a été démontré chez la bactérie *D. radiodurans* (36, 76). Les rotifères bdelloïdes pourraient ensuite être capables de réparer ces cassures dans leur ADN, comme il a été démontré après leur exposition à des doses élevées de radiations ionisantes (40). Si ces cassures d'ADN n'étaient pas réparées parfaitement, de la variabilité génétique serait induite. La diversité créée leur permettrait d'évoluer plus rapidement avec leur environnement. Néanmoins, il est également envisageable que les rotifères bdelloïdes soient, au contraire, dotés de la capacité de protéger leur ADN des cassures doubles brins générées lors de la dessiccation. Plus spécifiquement, le phénomène de dessiccation pourrait donc permettre le transfert horizontal d'ADN mais également l'apparition de mutations aléatoires.

Au cours de ce mémoire, nous avons cherché à participer à la résolution de la seconde hypothèse. Notre objectif était de prouver que la dessiccation induit effectivement des cassures double-brins dans l'ADN des rotifères bdelloïdes. L'utilisation de la PFGE était particulièrement bien adaptée à cette question puisqu'il fallait analyser le profil du génome entier des rotifères et que cette méthode permet de séparer des segments d'ADN de taille plus importante qu'une électrophorèse classique.

La première étape dans cette étude consistait à réaliser des expériences de dessiccation en laboratoire. Au terme de celles-ci un protocole de dessiccation assurant un taux de survie élevé (>55 %) a été mis au point et fera l'objet d'une publication méthodologique avec le scientifique C. Wilson. Cette méthode utilise un substrat, l'agarose LMP. Ceci facilite la dessiccation lente puisque l'évaporation de l'eau contenue dans l'agarose LMP se fait progressivement. Par ailleurs, ce substrat est adéquat pour la suite des expériences puisque l'on peut le récupérer directement avec les rotifères desséchés pour l'analyse PFGE. L'évaluation du taux de survie suite à la dessiccation a été réalisée par un comptage à l'aide du logiciel imageJv1.42q sur base de photographies et de vidéos. L'évaluation du taux de survie n'était toutefois pas parfaitement représentative de la réalité car il était difficile de distinguer les vivants des morts dans les zones où la densité était trop élevée ou lorsque des

rotifères vivant se maintenaient repliés sur eux-mêmes. Le logiciel imageJv1.42q étant capable de discriminer des organismes de couleur différente, une évaluation du taux de survie plus objective et plus rapide pourrait être réalisée en marquant les individus morts avec un composé tel que l'iodure de propidium qui ne pénètre pas dans les cellules vivantes.

D'après les résultats obtenus à la PFGE, nous n'observons pas de différence entre le profil génomique du contrôle et celui des rotifères desséchés lentement. Nous pouvons donc en conclure que la dessiccation n'engendre pas de cassures double-brins dans l'ADN de rotifères desséchés pendant une période de 1, 7 ou 14 jours, à condition que la dessiccation se fasse lentement au départ. Lorsque la dessiccation se fait rapidement, nous observons une augmentation du nombre de petits fragments. La dessiccation provoquerait donc des cassures dans l'ADN chez les rotifères desséchés trop rapidement.

Le mécanisme de résistance des rotifères bdelloïdes n'a toutefois pas pu être découvert lors de ces expériences. Cependant, les résultats PFGE obtenus suscitent plusieurs questions. Pourraient-ils protéger leur génome s'ils en ont le temps afin d'éviter les cassures et permettre un taux de survie élevé ? Par contre, si la dessiccation est trop brutale au départ, ne pourraient-ils pas réparer les cassures engendrées par celle-ci, avec un taux de survie plus faible, mais toujours en assurant la perpétuation de quelques individus de la population ? Ceci ne sont que des spéculations car les résultats préliminaires obtenus lors de ce mémoire sont étonnants et nécessitent plusieurs améliorations expérimentales :

➤ Tout d'abord, il est crucial d'uniformiser la quantité de rotifères et donc d'ADN dans chaque « plug » d'agarose LMP afin de pouvoir comparer les quantités d'ADN intact et dégradés, ayant migrés dans la PFGE, entre les différentes conditions. Plusieurs méthodes pourraient être envisagées :

- Le prélèvement manuel d'un nombre connu et identique de rotifères pour chaque condition peut être envisagé. Cette méthode est néanmoins fastidieuse car elle nécessite du temps et de la dextérité. Nous avons fait un test pour 200 rotifères et le signal n'est pas visible par PFGE. Il faut donc un nombre bien plus élevé d'individus pour obtenir un signal. Dans la publication de Gladishev et Meselson utilisant cette méthode du PFGE, 1000 rotifères furent utilisés.
- Une mesure de la densité optique de l'échantillon prélevé dans chaque condition peut être envisagée.
- La pesée de chaque échantillon prélevé, au moyen d'une balance suffisamment sensible, afin d'obtenir la même masse pour chaque échantillon et donc une quantité plus ou moins uniforme du nombre d'individus. Cette méthode paraît la plus appropriée et la moins compliquée.

➤ Ensuite, une « trainée » d'ADN dans le gel correspondant à une dégradation de l'ADN était obtenue pour chaque condition, y compris pour le contrôle. Nous ne pouvons pas prédire si c'est la présence de morts dans la culture qui en est responsable ou si c'est la méthode d'extraction qui n'est pas parfaite. Soumettre le ladder au même protocole d'extraction que les échantillons pourrait permettre de savoir si l'extraction brise l'ADN. Et un prélèvement manuel des rotifères vivants dans la culture contrôle nous assurerait un

profil exempt de morts. Cependant, ce dernier contrôle n'est cependant pas évident à réaliser.

➤ Après, des triplicats doivent être réalisés afin de confirmer les profils obtenus au terme de ce mémoire.

➤ Enfin, les résultats obtenus ne nous permettent pas de tirer de conclusion finale quant à l'impact de la dessiccation sur l'intégrité du génome des rotifères bdelloïdes. Nous n'avons pas testé le profil de leur génome pour une période de plus de 14 jours de dessiccation. Dès lors, il serait nécessaire d'évaluer le profil du génome après une plus longue période de dessiccation pour savoir si des cassures d'ADN apparaissent à plus long terme ou non.

Si la dessiccation engendre effectivement des cassures double-brins dans l'ADN des rotifères bdelloïdes après une plus longue période de dessiccation et s'ils survivent à cette longue période de sécheresse, l'étape suivante consisterait à vérifier si des rotifères soumis à des cycles répétés de dessiccation subissent une diversification génétique plus importante que des rotifères hydratés en permanence. Cette étude pourrait notamment être réalisée par une analyse de plusieurs marqueurs moléculaires génomiques tels que les microsatellites et l'AFLP au cours de plusieurs cycles de dessiccation et de plusieurs générations.

Pour conclure, l'impact de la dessiccation sur l'intégrité du génome des rotifères bdelloïdes n'a pas pu être révélé au cours de ces expériences, mais les premiers résultats obtenus démontrent que la dessiccation ne semble pas provoquer de dégradation complète du génome durant les 14 premiers jours d'anhydrobiose contrairement à ce qui était attendu. Les profils observés sont particuliers et des expériences de dessiccation à plus long terme sont nécessaires pour vérifier si oui ou non la dessiccation induit des cassures. Par ailleurs, des expériences d'expression génique sont menées au laboratoire du professeur K. Van Doninck afin d'élucider le mécanisme mis en route lors de l'entrée en état d'anhydrobiose.

II. Projet Génoscope

Les rotifères bdelloïdes sont résistants à la dessiccation. Le mécanisme de la résistance n'est pas encore compris à l'heure actuelle. Cette particularité pourrait être la clef de leur survie à long terme. Ce sont des organismes vivant depuis plus de 40 millions d'années, pour lesquels aucun mâle, hermaphrodite ou structure vestigiale mâle n'a été mis en évidence depuis qu'ils ont été découverts par Leewenhoeck, il y a plus de 300 ans (45). De plus, aucune étude moléculaire n'a pu mettre en évidence de preuve de sexualité quelconque. En tant qu'asexués, ils auraient donc du disparaître précocement comme les autres lignées asexuées qui apparaissent régulièrement dans la nature (45).

Ce paradoxe intrigue les spécialistes des rotifères bdelloïdes qui recherchent activement des réponses à ce propos. Le séquençage du génome pourra permettre d'étudier les gènes impliqués dans la reproduction sexuée d'une part, et dans les mécanismes assurant aux rotifères bdelloïdes une résistance à la dessiccation d'autre part. Le séquençage est l'étape préliminaire à des études plus approfondies des gènes découverts.

La comparaison des séquences obtenues avec des banques de données pour déterminer la fonction des gènes découverts, l'étude des transcrits éventuels et la recherche protéique sont

autant d'études qui pourront être menées afin de connaître la fonction de ces gènes dans le génome des rotifères bdelloïdes. Concernant les gènes impliqués dans la méiose et la spermatogenèse, les rotifères bdelloïdes étant probablement des asexués anciens, on s'attend à observer une dégénérescence ou une néofonctionnalisation.

III. Génétique des populations

Les microsatellites sont des marqueurs polymorphes, codominants et neutres, et des outils précieux pour comparer génétiquement des individus entre eux et pour étudier la diversité au sein d'une et entre des populations (79). Les rotifères bdelloïdes sont des microorganismes asexués anciens dont la diversité morphologique et génétique du gène CO1 contredit la théorie selon laquelle les lignées eucaryotes asexués s'éteigneraient rapidement sans se diversifier. Afin de connaître le taux de variabilité génétique intra-spécifique chez les rotifères bdelloïdes, une étude microsatellite a été réalisée sur une population d'*Adineta vaga* présente dans une mousse temporaire.

Une telle étude peut également apporter des indications sur le mode de reproduction de la population, notamment sur la présence ou l'absence d'échange allélique. Toutefois, les rotifères bdelloïdes ne sont pas des organismes asexués ordinaires puisqu'ils existent depuis plus de 40 millions d'années et s'avèrent les seuls eucaryotes asexués anciens. Si les rotifères bdelloïdes ont su s'adapter au milieu naturel évoluant constamment, ils ont sans doute acquis un mécanisme qui pourrait leur permettre de créer de la diversité génétique et dès lors d'évoluer à long terme. Il est donc difficile de les comparer à d'autres organismes asexués récents dont les caractéristiques génétiques sont une faible diversité génotypique, une forte diversité allélique, un déséquilibre de Hardy-Weinberg et un déséquilibre de liaison.

Des individus représentatifs de la population à étudier ont été isolés pour réaliser cette étude. Au départ, nous avons tenté de cultiver les individus isolés afin d'obtenir des lignées clonales. Plusieurs méthodes qui permettent la culture et le clonage d'un individu isolé ont été testées. Nous avons conclu que l'utilisation de puits d'agar est la méthode qui initie le meilleur taux de multiplication. Cependant, l'âge du rotifère est déterminant et le nombre d'individus se clonant pour donner une culture dense est restée faible par rapport au nombre d'individus isolés. Grâce à l'utilisation de la méthode d'extraction QiAamp microKit (Qiagen), nous avons pu obtenir suffisamment d'ADN par extraction d'un individu isolé directement de la mousse sans devoir le mettre en culture. L'isolement et l'extraction de l'ADN d'une bonne vingtaine d'individus ont été réalisés pour l'étude de la population.

Au cours de ce projet, 64 paires d'amorces microsatellites ont été conçues pour *A. vaga* sur base des séquences des contigs des gènes codant pour les «*heat shock* protein» et pour les histones, obtenues suite aux recherches du professeur K. Van Doninck à l'université de Harvard. La sélection progressive des microsatellites par PCR et génotypage a abouti à la conservation de seulement cinq microsatellites polymorphes qui se sont avérés fonctionner sur tous les individus et qui ont donc pu être utilisés pour l'étude génétique de la population *A. vaga*. Ceci indique déjà la diversité génétique élevée au sein de cette espèce et le caractère cryptique attribué à cette espèce.

Au terme de ce mémoire, la présence d'une diversité allélique et génotypique élevée dans la population d'*A. vaga* nous indique la présence de plusieurs clones au sein de la mousse et

non d'un seul clone dominant. La raison de cette diversité élevée n'est pas encore connue à l'heure actuelle. De plus, les données génétiques obtenues nous révèlent des particularités intéressantes chez ces organismes. D'abord, il semblerait qu'ils aient une diversité génotypique élevée. Ceci n'est généralement pas caractéristique des organismes asexués car sans croisement, la combinaison allélique est plus faible que chez les sexués. Ensuite, leur niveau d'hétérozygotie semble faible et est inférieur à celle qui était attendue. Ceci n'est normalement pas non plus une caractéristique des organismes asexués, que du contraire. Et enfin, il y a incongruence entre l'arbre phylogénétique de l'ADN nucléaire étudié et celui de l'ADN mitochondrial. Ces observations préliminaires pourraient être caractéristiques d'une population sexuée ou bien, celles d'une population asexuée ayant trouvé le moyen de se diversifier et d'évoluer avec l'environnement changeant, leur permettant de survivre à long terme.

Lorsque le génome aura été séquencé, il serait toutefois intéressant de sélectionner de nouveaux microsatellites bien répartis dans tout le génome afin de réanalyser les données. La valeur que l'on pourrait obtenir pour l'analyse de l'équilibre de liaison notamment, serait le reflet du mode de reproduction et non pas de la proximité des loci. Par ailleurs, l'échantillonnage d'un plus grand nombre de rotifères *A. vaga* serait plus représentatif de la population présente au sein d'une mousse. Des résultats plus fiables seraient ainsi obtenus.

Des études futures pourraient, ensuite, étudier la diversité génétique entre des populations issues de mousses différentes dans une même région puis issues de régions différentes, afin de comprendre la répartition et la diversité génétique des rotifères bdelloïdes. Si l'on retrouve les mêmes allèles d'une population à l'autre, il est possible qu'ils soient capables de se disséminer par le vent lorsqu'ils sont desséchés. Cela leur permettrait de s'étendre facilement dans l'environnement et expliquerait en partie le cosmopolitisme de nombreuses espèces bdelloïdes. La raison d'une prédominance de certains mêmes allèles dans plusieurs régions, pourrait aussi être dû à la sélection de ceux-ci par leur avantage évolutif.

IV. Conclusion générale

Au cours de ce mémoire, nous avons optimisé plusieurs méthodes et avons obtenus des résultats préliminaires pour répondre à deux nouvelles questions : l'impact de la dessiccation sur l'intégrité du génome des rotifères bdelloïdes et la diversité génétique. Ces deux études soulèvent un grand nombre d'hypothèses et constituent les étapes préliminaires dans la résolution d'une seule et même question : comment les rotifères bdelloïdes sont-ils parvenus à survivre à long terme malgré leur asexualité potentielle ? La dessiccation pourrait en être la clef.

REFERENCES

I. Texte

1. C. P. Hickman (2007) L. S. Roberts, S. L. Keen, A. Larson and D. J. Eisenhour. *Animal diversity*. McGraw-Hill international edition, Fourth edition
2. R. Lee Wallace (2002) *Rotifers: Exquisite Metazoans*. *Integ And Comp Biol* 42, 660-667
3. M. G. Varela and S. A. Nadler (2006) *Phylogenetic relationships among syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences*. *Molecular phylogenetics and evolution* 40, 61-70
4. D. B. Mark Welch, J. L. Mark Welch and M. Meselson (2008) *Evidence for degenerate tetraploidy in bdelloid rotifers*. *PNAS* 105, 5145-5149
5. H. Segers (2007) *Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution*. *Zootaxa* 1564, 1-104
6. G. Lecointre et H. de Guyader (2006) *Classification phylogénétique du vivant*. Ed. Belin
7. T. Nogrady, R. L. Wallace and T. Snell (1993) *Rotifera 1. Biology, Ecology and Systematics. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 4*. Ed. H.J. Dumont. SPB Academic
8. C. Ricci and G. Melone (2000) *Key to the identification of the genera of bdelloide rotifers*. *Hydrobiologia* 418, 73-80
9. C. Ricci and C. Boschetti (2003) *Bdelloid rotifers as model system to study developmental biology in space*. *Developmental biology research in space* 9, 25-39
10. C. Ricci & U. Fascio (1995) *Life-history consequences of resource allocation of two bdelloid rotifer species*. *Hydrobiologia* 299, 231-239
11. D. B. Mark Welch and M. Meselson (2000) *Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange*. *Science* 288, 1211-1215
12. R. S. K. Barnes, P. Calow, P. J. M. Olive, D. W. Golding and J. I. Spicer (2001) *The invertebrates a synthesis*. Third edition, 96-99
13. Classic Encyclopedia based on the 11th Edition of the Encyclopaedia Britannic
<http://www.1911encyclopedia.org/Rotifera>
14. M. Verolet (2007) *Les Rotifères, morphologie , anatomie et écologie*
<http://www.microscopies.com/DOSSIERS/Magazine/Articles/M%20Verolet-Les%20Rotiferes/texte.htm>

15. W. Dioni (2008) *Clé pour les genres des rotifères Bdelloidea*, <http://www.microscopies.com/DOSSIERS/Magazine/Articles/WDCLE%20BDELLOIDEA/BD%20ARTICLE%201.htm>
16. C. Ricci (1983) *Life histories of some species of rotifera bdelloidea*. Hydrobiologia 104, 175-180
17. C. Ricci (1987) *Ecology of bdelloids: how to be successful*. Hydrobiologia 147, 117-127
18. R. Pourriot (1977) *Rotifères*. Arch. Hydrobiol. 8, 219-244
19. G. M. Mueller (2004) G. F. Bills, M. S. Foster. *Biodiversity of fungi, Inventory and monitoring methods*. Elsevier academic press, 435-442
20. L. A. Kutikova (2003) *Bdelloid rotifers (Rotifera, Bdelloidea) as a component of soil and land biocenoses*. Biology Bulletin 30, 271-274
21. G. L. Barron (1991) *A genus, Rotiferophthora, to accommodate the Diheterospora-like endoparasites of rotifers*. Canadian journal of botany, 69, 494-502
22. C. Ricci, M. Caprioli (2005) *Anhydrobiosis in bdelloide species, populations and individuals*. Integr. Comp. Biol. 45, 759-763
23. A. Tunnacliffe and J. Lapinski (2003) *Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 358, 1755-1771
24. R. Guidetty and K. I. Jönsson (2002) *Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans*. Journal of Zoology 257, 181-187
25. C. Ricci, M. Caprioli, D. Fontaneto and G. Melone (2008) *Volume and Morphology changes of a bdelloide rotifer species (Matrotrachela quadricornifera) during anhydrobiosis*. Journal of Morphology 269, 233-239
26. J. S. Clegg (2001) *Cryptobiosis: a peculiar state of biologicalComparative*. Biochemistry and Physiology Part B 128, 613-624
27. C. Ricci and C. Covino (2005) *Anhydrobiosis of Adineta ricciae: costs and benefits*. Hydrobiologia 546, 307-314
28. D.B. Mark Welch and M. Meselson (2001) *Rates of nucleotide substitution in sexual and anciently asexual rotifers*. PNAS 98, 6720-6724
29. C. Ricci, L. Vaghi and M. L. Manzini (1987) *Desiccation of rotifers (Matrotrachela quadricornifera): survival and reproduction*. Ecology 68, 1488-1494
30. S. Chakrabortes, C. Boschetti, L. J. Walton, S. Sarkar, D. C. Rubinsztein, Alan Tunnacliffe (2007) *Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function*. PNAS 104, 18073-18078

31. H. J. McIntyre, H. Davies, T. A. Hore, S. H. Miller, J-P. Dufour, and C. W. Ronson (2007) *Trehalose Biosynthesis in Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and Its Role in Desiccation Tolerance. *Applied and environmental microbiology* 73, 3984–3992
32. F. Albertorio, V. A. Chapa, X. Chen, A. J. Diaz, and P. S. Cremer (2007) *The α,α -(1→1) Linkage of Trehalose is Key to Anhydrobiotic Preservation*. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 10567-10574
33. J. Lapinski, A. Tunnacliffe (2003) *Anhydrobiosis without trehalose in bdelloide rotifers*. *FEBS letters* 553, 387-390
34. W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, and P. Setlow (2000) *Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 548–572
35. D. Slade, A. B. Lindner, G. Paul, M. Radman (2009) *Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated Deinococcus radiodurans*. *Cell* 136, 1044-1055
36. V. Mattimore and J. R. Battista (1996) *Radioresistance of Deinococcus radiodurans: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation*. *Journal of bacteriology* 178, 633-637
37. Y. Yang, S. Yokobori, A. Yamagishi (2009) *Bacterial survival in response to desiccation and high humidity at above zero and subzero temperatures*. *Advances in space research* 43, 1285-1290
38. K. Zahradka, D. Slade, A. Bailone, S. Sommer, D. Averbeck, M. Petranovic, A. B. Linder and M. Radman. *Reassembly of shattered chromosomes in Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443, 569-573
39. N. N. Pouchkina-Stantcheva, B. M. McGee, C. Boschetti, D. Tolleter, S. Chakrabortee, A. V. Popova, F. Meersman, D. Macherel, D. K. Hinch, A. Tunnacliffe (2007) *Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate*. *Science* 318, 268-271
40. E. Gladishev and M. Meselson (2008) *Extreme resistance of bdelloide rotifers to ionizing radiation*. *PNAS* 105, 5139-5144
41. N. A. Campbell and J. B. Reece (2004) *Biologie*. de boeck. 2e edition
42. A. F. Agrawal (2001) *Sexual selection and the maintenance of sexual reproduction*. *Nature* 411, 692-695
43. J. M. Smith (1978) *The evolution of sex*. Cambridge University Press
44. M. Anderson and Y. Iwasa (1996) *Sexual selection*. *Tree* 11, 53-58
45. A. M. Schurko, M. Neiman and J. M. Logsdon Jr. (2009) *Signs of sex: what we know and how we know it*. *Trends of ecology and evolution* 24, 208-217

46. A. Feigel, A. Englander, A. Engel (2009) *Sex is always well worth its two-fold cost*. PLoS ONE 4
47. G. G. Dimijian (2005) *Evolution of sexuality : biology and behavior*. BUMC proceeding 18, 244-258
48. F. *Parlons un peu de sexe*. Théories de l'évolution, accès en ligne Novembre 2009
<http://www.lecactusheuristique.com/article-26225719.html>
49. Y. Kim¹ and H. Allen Orr (2005) *Adaptation in Sexuals vs. Asexuals: Clonal Interference and the Fisher-Muller Model*. Genetics 17, 1377–1386
50. C. M. Lively (1996) *Host-parasite coevolution and sex*. BioScience 46, 107-114
51. C. Lewis (1871) *Through the looking-glass*. Macmillan
52. A. S. Kondrashov (1984) *Deleterious mutations as an evolutionary factor: 1 The advantage of recombination*. Genetical Research 44, 199-217
53. S. A West, A. D. Peters and N . H Barton (1998) *Testing for epistasis between deleterious mutations*. Genetics 149, 435-444
54. M. Whitlock (2008) *Evolution of sex*. Department of Zoology, University of British Columbia
<http://www.zoology.ubc.ca/~otto/PopGen500/Discussion2/Overheads.html>
55. H. J. Muller (2003) *The relation of recombination to mutational advance*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 1, 2-9
56. G. O. Poinar Jr" and C. Ricci (1992) *Bdelloid rotifers in dominican amber: evidence for parthenogenetic continuity*. Experientia 48, 408-410
57. W. S. Hsu (1956) *Oogenesis in Habrotricha tridens (Milne)*. Biol Bull 111, 364-374
58. C. Ricci and D. Fontaneto (2009) *The importance of being a bdelloide: Ecological and evolutionary consequences of dormancy*. Italian Journal of Zoology 76, 240-249
59. J. L. Mark Welch and M. Meselson, (1998) *Karyotypes of bdelloid rotifers from three families*. Hydrobiologia 387/388, 403-407
60. J. L. Mark Welch (2001) *Cytological Evidence for the Absence of Meiosis in Bdelloid Rotifers*. Thesis. Harvard University
61. J. L. Mark Welch, David B. Mark Welch and Matthew Meselson (2004) *Cytogenetic evidence for asexual evolution of bdelloid rotifers*. PNAS 101, 1618-1621
62. K. Plasota and M. Plasota (1980) *The determination of the chromosome number of Habrotricha rosa Donner, 1949*. Hydrobiologia 73, 43-44

63. M. Pagani, C. Ricci and C. A. Redi (1993) *Oogenesis in Macrotrachela quadricornifera (Rotifera, Bdelloidea). I: Germarium eutely, karyotype and DNA content*. Hydrobiologia 255-56, 225-230
64. D.B. Mark Welch and M. Meselson (2001) *Rates of nucleotide substitution in sexual and anciently asexual rotifers*. PNAS 98, 6720-6724
65. D. B. Mark Welch, M. P. Cummings, D. M. Hillis and M. Meselson (2004) *Divergent gene copies in the asexual class bdelloidea (rotifera) separated before the bdelloid radiation or within bdelloid families*. PNAS 101, 1622-1625
66. K. Van Doninck, M. L. Mandigo, J. H. Hur, P. Wang, J. Guglielmini, M. C. Milinkovich, W. S. Lane, M. Meselson (2009). *Phylogenomics of unusual Histone H2A variants in bdelloid rotifers*. PLoS Genetics 5, e1000401
67. J. H. Hur, K. Van Doninck, M. L. Mandigo and M. Meselson (2009) *Degenerate tetraploidy was established before bdelloid rotifers families diverged*. Molecular biology and evolution 26, 375-83
68. I. Arkhipova and M. Meselson (2000) *Transposable elements in sexual and ancient asexual taxa*. PNAS 97, 14473-14477
69. T. Kanbe and S-I. Akimoto (2009) *Allelic and genotypic diversity in long-term asexual populations of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum in comparison with sexual populations*. Molecular Ecology 18, 801-816
70. F. Balloux, L. Lehmann and T. Meeus (2003) *The population genetics of clonal and partially clonal diploids*. Genetics 164, 1635-1644
71. J-C. Simon et F. Delmotte. *Système de reproduction, structure génétique et microsatellites*
72. R. E. Ricklefs and G. L. Miller (2005) *Ecology*. 4th edition. Ed De boeck
73. G. Hennen (1996) *Biochimie humaine: introduction biochimique à la médecine interne*. 36-39
74. S-B. Malik, A. W. Pightling, L. M. Stephanial, A. M. Shurko, J. M. Logsdon (2008) *An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in Trichomonas vaginalis*. PloS ONE 3, e2879
75. D. fontaneto, E. A. Herniou, C. Boschetti, M. Caprioli, G. Melone, C. Ricci, T. G. Barraclough (2007) *Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers*. Plos Biology 5, 914-921
76. K. W. Minton (1996) *Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium Deinococcus radiodurans*. Mutat. Res. 363, 1-7
77. D. B. M. Welch and M. Meselson (2003) *Oocyte nuclear DNA content and GC proportion in rotifers of the anciently asexual class Bdelloidea*. Biological Journal of the Linnean Society 79, 85-91

78. E. A. Gladyshev, M. Meselson and I. R. Arkhipova (2008) *Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers*. *Science* 320, 1210-1213
79. D. de Viennes (1998) *Les marqueurs moléculaires en génétique et en biotechnologies végétales*. Ed. INRA. 2^e édition
80. P. Abbot (2001) *Individual and population variation in invertebrates revealed by inter-simple sequence repeats (ISSRs)*. *Journal of Insect science* 1
81. P. Balaesque (2007) *Les microsatellites des genomes eucaryotes De leur cycle de vie et de leur neutralité*. *Medecine/sciences* 23, 729-734
82. S. Leclercq (2007) *Origines des séquences microsatellites dans les génomes eucaryotes*. Thèse
83. E. van Pelt-Verkuil, A. van Belkum, J. P. Hays (2008) *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer, 144-146
84. A. Gomez and G. R. Carvalho (2000). *Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellites analysis of contemporary and resting egg bank populations*. *Molecular Ecology* 7, 1619-1621
85. P. D. Hebert, M. Y. Stoeckle, T. S. Zemplak and C. M. Francis (2002) *Identification of birds through DNA barcode*. *PLoS Biology* 2, e312
86. L. Robba, S. J. Russel, G. L. Barker and Juliet Brodie (2006) *Assessing the use of the mitochondrial cox1 marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta)*. *American journal of botany* 93, 1101-1108
87. O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek (1994) *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. *Molecular Marine Biology and Technology* 3, 294-299
88. C. Schretter and M. C. Milinkovish (2006) *OligoFactory: a visual tool for interactive oligonucleotide design*. *Bioinformatics* 22, 115-116
89. C. Ricci (2001) *Dormancy patterns in rotifers*. *Hydrobiologia* 446/447, 1-11
90. *NanoDrop Technical support Bulletin* (2007)
<http://www.biolabanalytical.com.au/analytical/lifescience/nanodrop/pdf/T009-ND-1000-&-ND-8000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
91. D. Fontaneto and C. Ricci (2006) *Spatial gradients in species diversity of microscopic animals: the case of bdelloid rotifers at high altitude*. *Journal of biogeography* 33, 1305-1313
92. J. Donner (1965) *Ordnung Bdelloidea*. Akademie-Verlag

93. Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) *Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary Bioinformatics Online 1, 47-50
94. I. R. Arkhipova and M. Meselson (2005) *Diverse DNA transposons in rotifers of the class Bdelloidea*. PNAS 102, 11781-11786
95. I. Arkhipova and M. Meselson (2004) *Deleterious transposable elements and the extinction of asexuals*. BioEssays 27, 76-85
96. D. Fontaneto, E. A. Herniou, T. G. Barraclough, and C. Ricci (2007) *On the Global Distribution of Microscopic Animals: New Worldwide Data on Bdelloid*. Zoological Studies 46, 336-346
97. J.O. Andersson (2005) *Lateral gene transfer in eukaryotes*. Cell. Mol. Life sci. 62, 1182-1197

II. Figures

Figure 1 : Richard fox (2001) *Moss rotifers*. Lander University, Invertebrate Anatomy Online
<http://webs.lander.edu/rsfox/invertebrates/bdelloidea.html>

Figure 2 : Micrographia, rotifers, a general introduction, accès en ligne octobre 2009
<http://www.micrographia.com/specbiol/rotife/homebdel/bdel0100.htm>

Figure 3 : voir « référence texte » n° 8

Figure 4 : M. Verolet (2001) Les rotifères, morphologie, anatomie et écologie
<http://www.microscopies.com/DOSSIERS/Magazine/Articles/M%20Verolet-Les%20Rotiferes/texte.htm>

Figure 5 : A gauche, voir « référence texte » n° 8
A droite, M. Verolet (2001) Les rotifères, morphologie, anatomie et écologie
<http://www.microscopies.com/DOSSIERS/Magazine/Articles/M%20Verolet-Les%20Rotiferes/texte.htm>

Figure 7 : voir « référence texte » n° 36

Figure 8 : voir « référence texte » n° 40

Figure 9 : K. Van Doninck, non publié

Figure 11 : voir « référence texte » n° 59

Figure 12 : K. Van Doninck (2009) cours FUNDP/UCL The putative ancient asexuals, the bdelloid rotifers

Figure 13: K. Van Doninck (2009) cours FUNDP/UCL The putative ancient asexuals, the bdelloid rotifers

Figure 14 : voir « référence texte » n° 69

Figure 15 : Shwing (2006) Hardy-Weinberg principle
http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Functions_in_biology

Figure 16 : voir « référence Texte » n° 78

Figure 17 : voir « référence Texte » n° 81

Figure 18 : voir « référence Texte » n° 82

Figure 29 : voir « référence Texte » n° 36

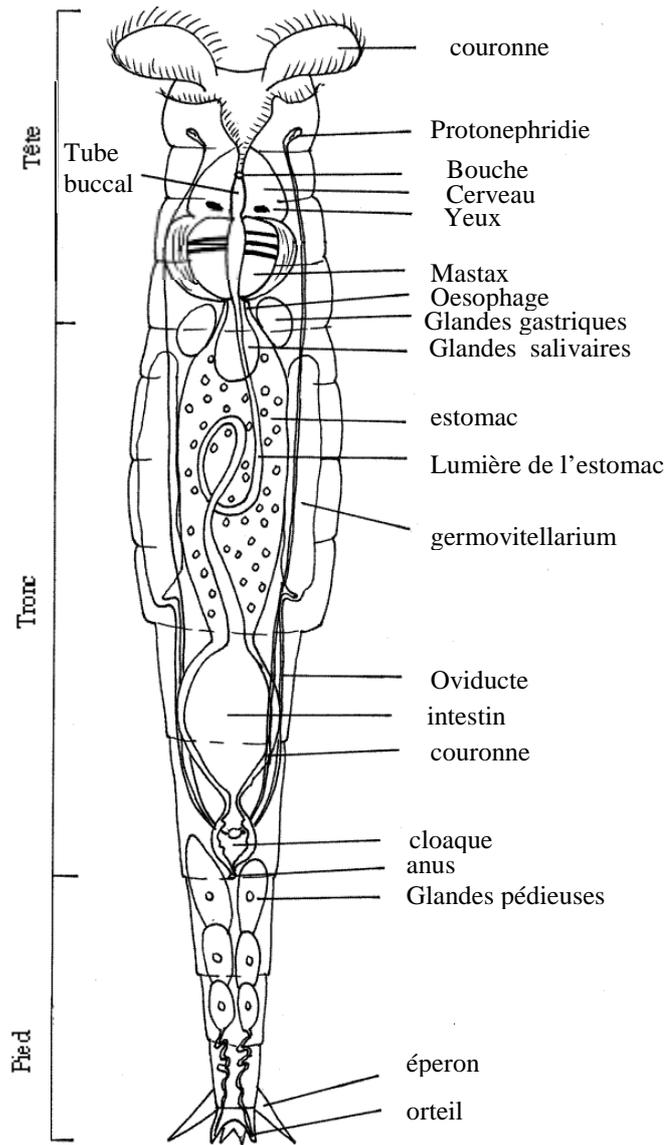


Figure 1 : Anatomie du rotifère
Modifié à partir de Richard fox (2001)

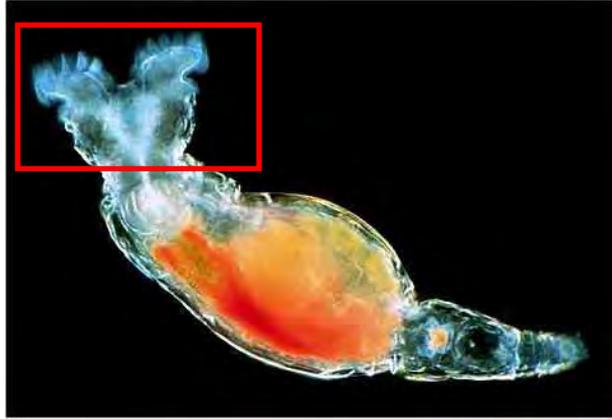


Figure 2 : Rotifère bdelloïde du genre *Philodina*. Encadré rouge : tête avec corona constituée de rotors.
Coloration darkfield
Micrographia, accès en ligne Octobre 2009

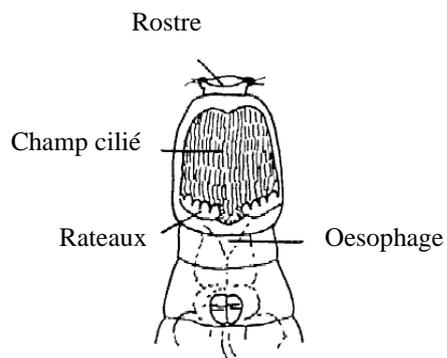


Figure 3 : Tête d'un rotifère bdelloïde du genre *Adinetidae*
C. Ricci and G. Melone, hydrobiology (2000)

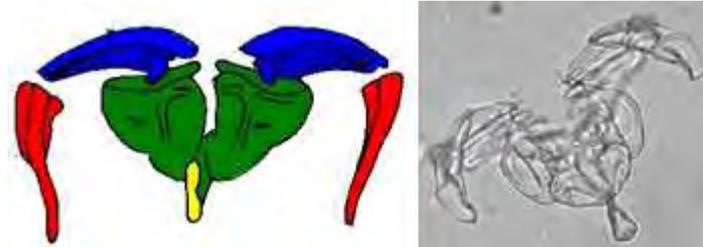


Figure 4 : Mastax de type mallé. En rouge, manubrium ; en vert, rami ; en bleu, unci ; en jaune, fulcrum
M. Verolet (2001)

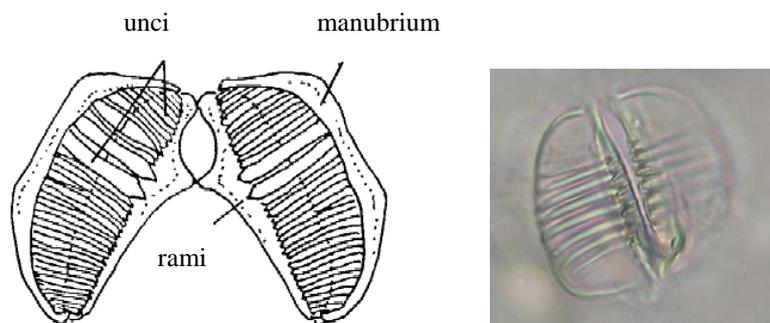


Figure 5 : Schéma du mastax de type ramé
À gauche : Schéma basé sur celui de C. Ricci and G. Melone, hydrobiology (2000)
À droite : Photo de w. Dioni (2001)

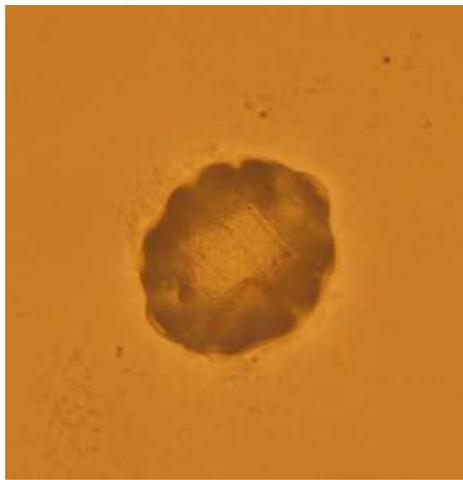


Figure 6 : Morphologie en « tun » ou tonneau adoptée par un rotifère bdelloïde en anhydrobiose

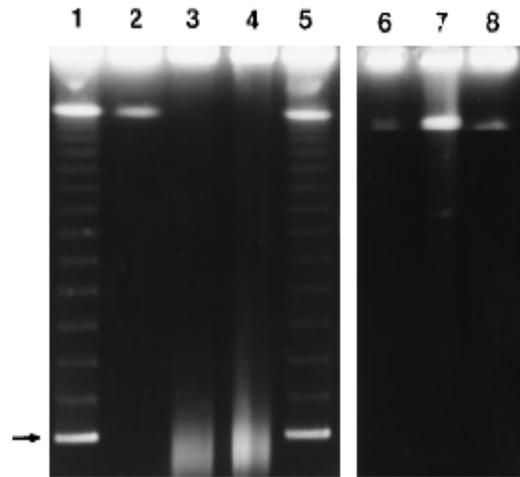


Figure 7 ; PFGE démontrant l'accumulation des cassures double-brins dans l'ADN de *D. radiodurans* soumise aux radiations ionisantes et à la dessiccation. 1 et 5. standard de taille lambda (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.); la flèche indique 48.5 kb sur le standard de taille ; 2. ADNg de *D. radiodurans* préparé à partir d'une culture non traitée ; 3. ADNg préparé à partir d'une culture qui a été desséchée durant 6 semaines ; 4. ADNg préparé à partir d'une culture qui a été exposée à des radiations gamma de 5,200 Gy ; 6. ADNg isolé d'une culture chauffée à 52 °C durant 68 min, condition qui définit 90 % de la dose létale pour *D. radiodurans* ; 7. ADNg isolé d'une culture cellulaire irradiée aux UV (5,000 J/m²) ; 8. ADNg isolé d'une culture de cellules maintenues en phase stationnaires dans un milieu liquide durant 100 jours à 30 °C
V. Mattimore and J. R. Battista, Journal of Bacteriology (1996)

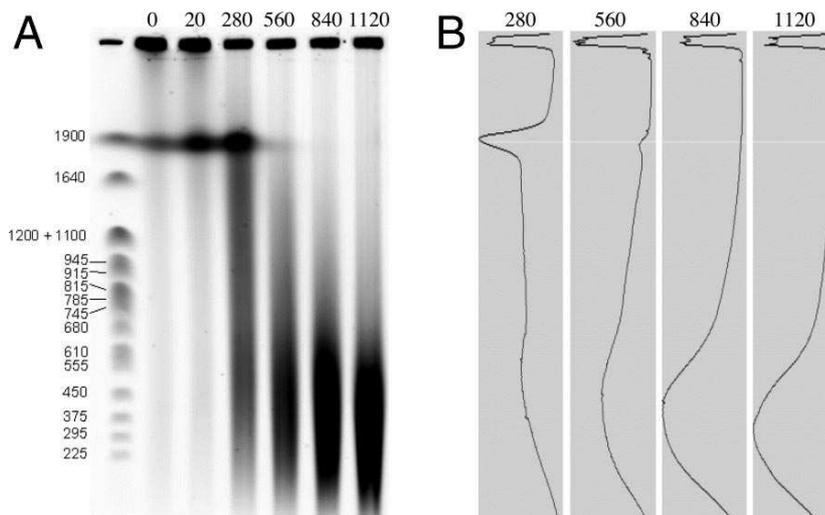


Figure 8: Cassures double-brins dans l'ADN de *A. vaga*, causées par les radiations ionisantes. A, PFGE, ladder chromosome de levure (kbp). Les doses sont en Gy ; B, Scanner photométrique obtenu par le logiciel « Quantity One » de BioRad. Le signal d'intensité obtenu est fonction de la concentration en ADN
E. Gladyshev and M. Meselson, PNAS (2008)

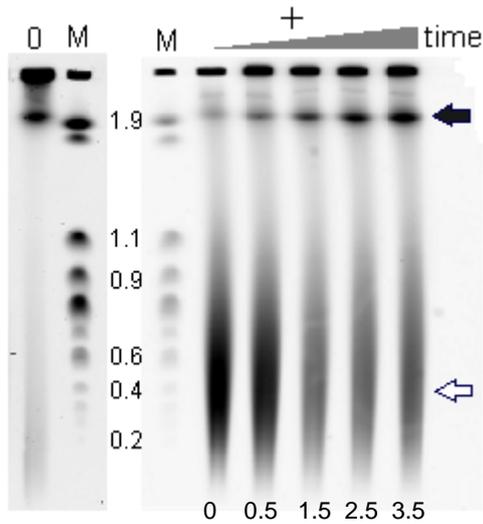


Figure 9 : PFGE démontrant la réparation de l'ADNg de rotifères bdelloides réhydratés après avoir été irradiés avec 1000 Gy. 0, ADNg isolé de rotifères bdelloides non irradiés ; M, Ladder standard de taille (Mbp) ; Les colonnes suivantes présentent l'ADNg isolés de rotifères x heures après réhydratation.
K. Van Doninck, non publié

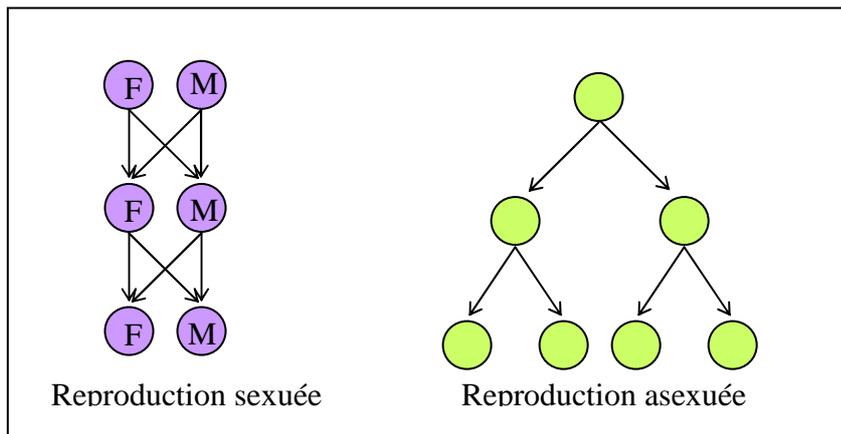


Figure 10 : Schéma représentant le « two fold cost of sex » ou le coût double du sexe

Karyotypes of Bdelloid Rotifers

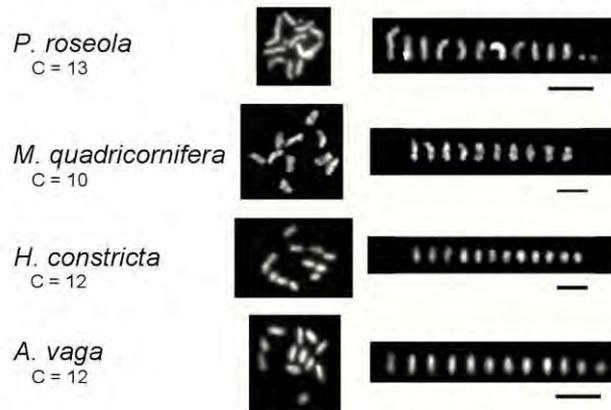


Figure 11 : Caryotype de 4 espèces de rotifères bdelloïdes
J. Mark Welch & Meselson, Hydrobiologia (1998)

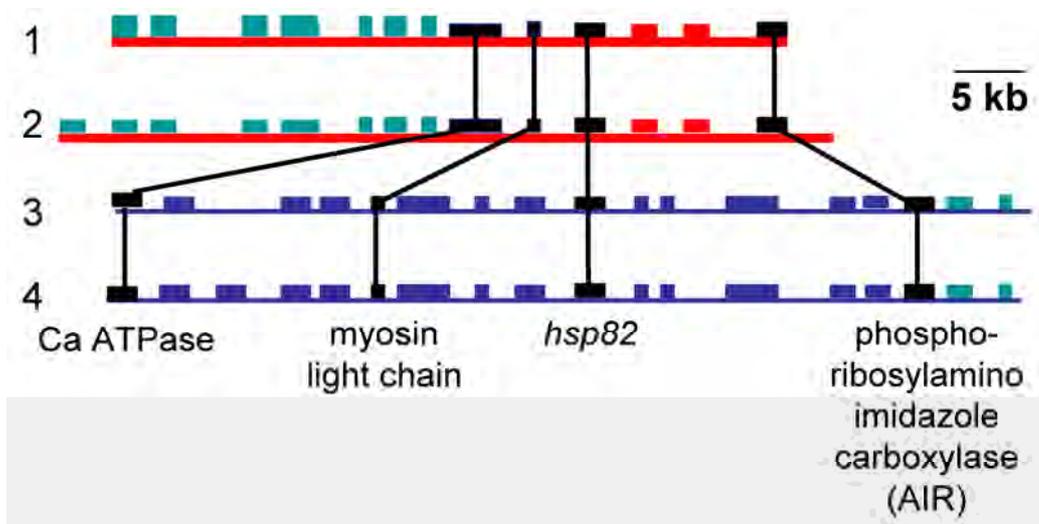
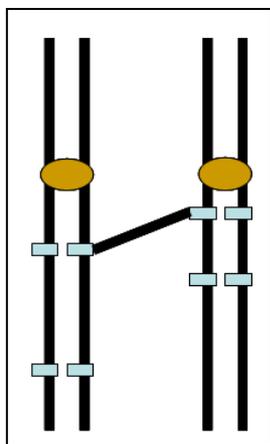
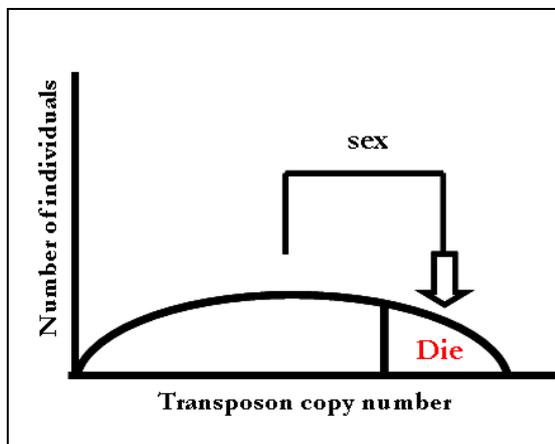


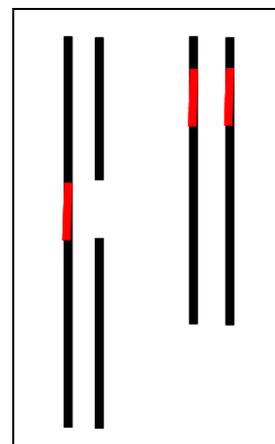
Figure 12: Représentation des 2 paires colinéaires chez *Philodina roseola* dans une région de 50 kb contenant le gène *hsp82*
 K. Van Doninck (2009)



Recombinaison illégitime



Recombinaison homologue sous épistasie négative



MSUD

Figure 13: Illustration des 3 mécanismes sexuels limitant le nombre de transposons délétaires
K. Van Doninck (2009)

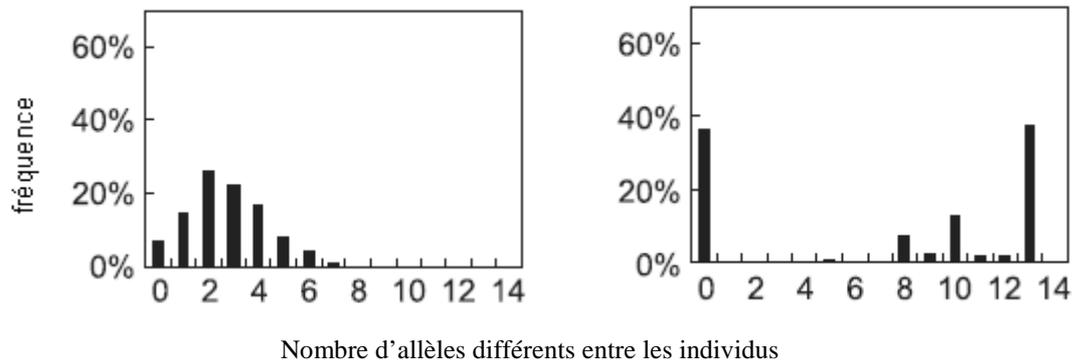
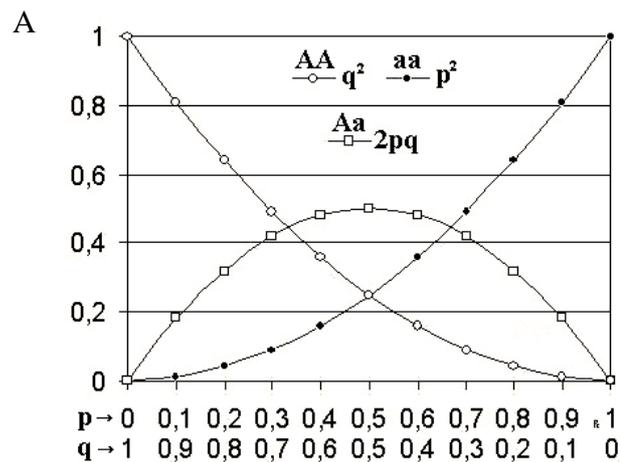


Figure 14 : Fréquence de distribution du nombre d'allèles différents entre les individus dans une population sexuée et asexuée de pucerons *Acyrtosiphon pisum*. A gauche, distribution unimodale ; A droite, distribution bimodale

T. Kanbe and S. Akimoto, *Molecular Ecology* (2009)



B

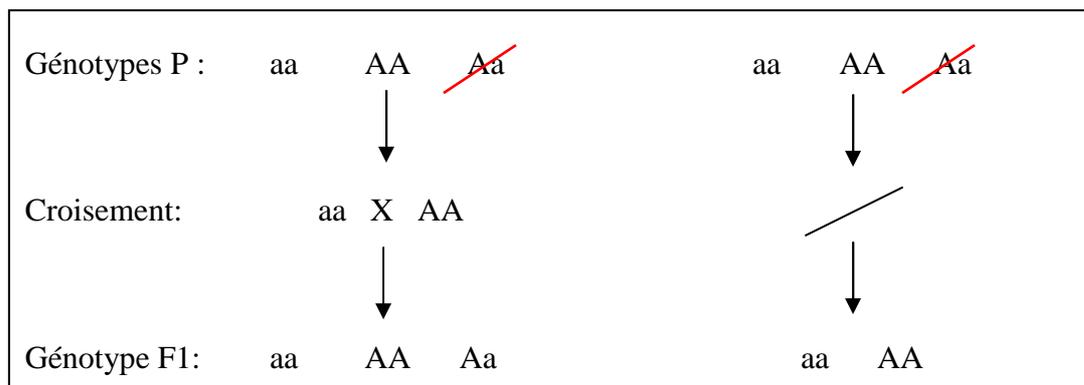


Figure 15: A. Equilibre de Hardy-Weinberg pour un locus présentant 2 allèles A et a, dont les fréquences sont respectivement p et q. B. situation en cas de perte d'un génotype. Le génotype barré correspond à la perte du génotype dans la population par un phénomène aléatoire. Il y a croisement entre individus dans la population sexuée alors qu'il n'y en a pas dans une population asexuée.

A. Shwing (2006)

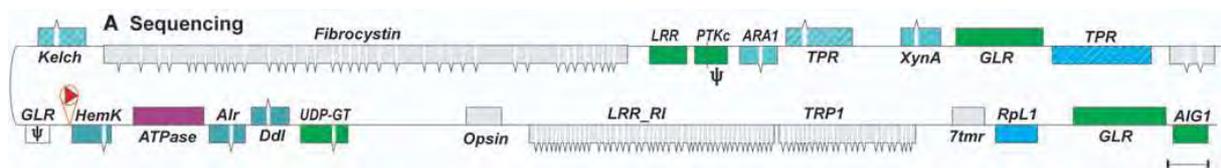


Figure 16: Contig Av240B (85kb) : le contig colinéaire Av240A de 50kB contient les LTR de Juno1 et s'étend de TPR à LRR_R1 (non montré). Les CDS (boîtes) sont colorées en fonction de leur origine présumée : métazoaire en gris, bactérien en bleu, fongique en pourpre, végétal en vert, indéterminé en rayé et hypothétique en blanc. La position des introns sont indiquées. Les pseudogènes sont dénoté d'un ψ et les défauts dans leur cadre de lecture apparaissent par un trait vertical. Barre d'échelle, 1 kb.

E. A. Gladyshev, M. Meselson and I. R. Arkhipova, Science (2008)

Polymorphisme de taille	microsatellites parfaits (CA) ₇	CACACACACACA
	microsatellites parfaits (CA) ₉	CACACACACACACACA
	microsatellites parfaits (CA) ₁₁	CACACACACACACACACACA
Polymorphisme de structure	motifs multiples imparfaits - interrompus -	CACTCACACACACA
	motifs multiples imparfaits - composés -	CACTCTCGCGGGCTCTCACACACACA

Figure 17 : Tableau reprenant les différents types de motifs microsatellites
P. Balaesque, médecine/sciences (2007)

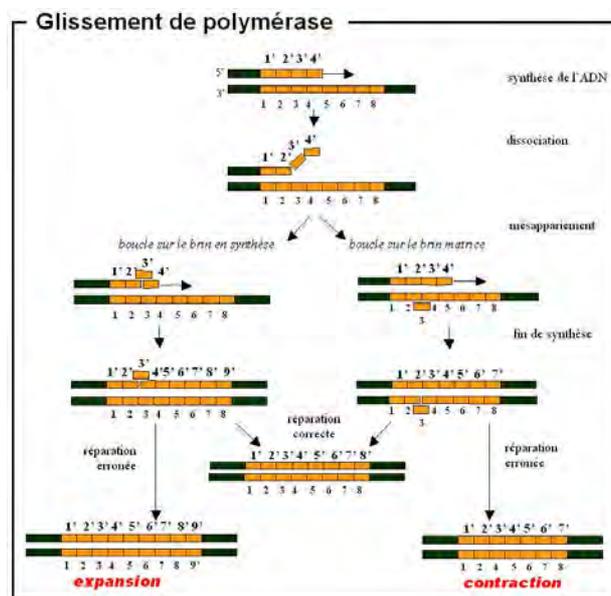


Figure 18: Glissement (*slippage*) de la polymérase lors de la réplication d'une région répétée
S. Leclerq, (2007)

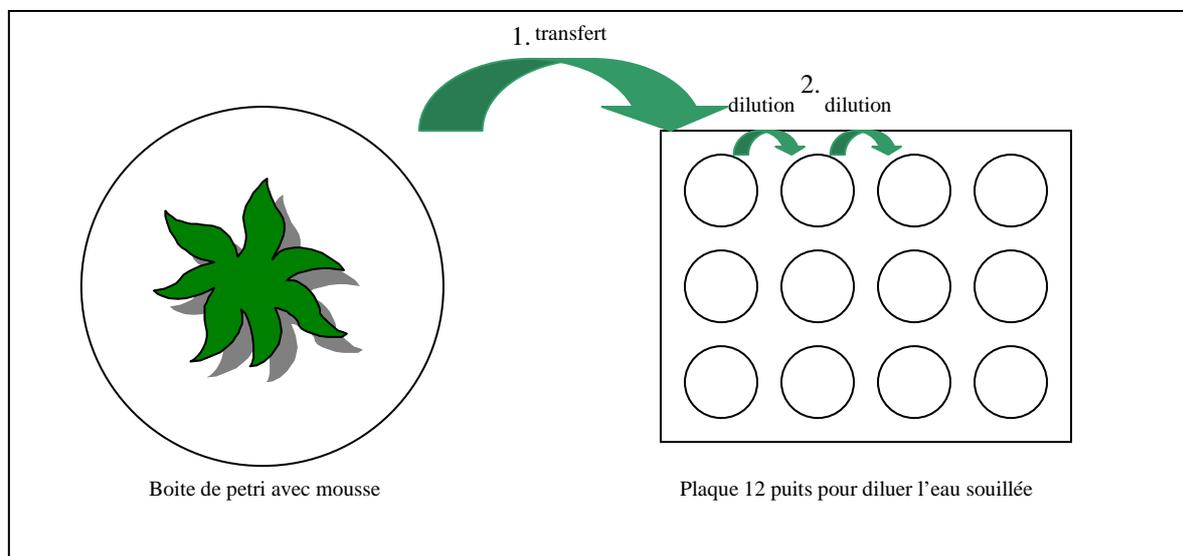


Figure 19 : Premières étapes avant la mise en culture des rotifères *Adineta vaga* ; 1. transfert du rotifère dans un puits rempli d'eau volvic filtrée ; 2. deux à trois dilutions de l'eau du milieu prélevée avec le rotifère

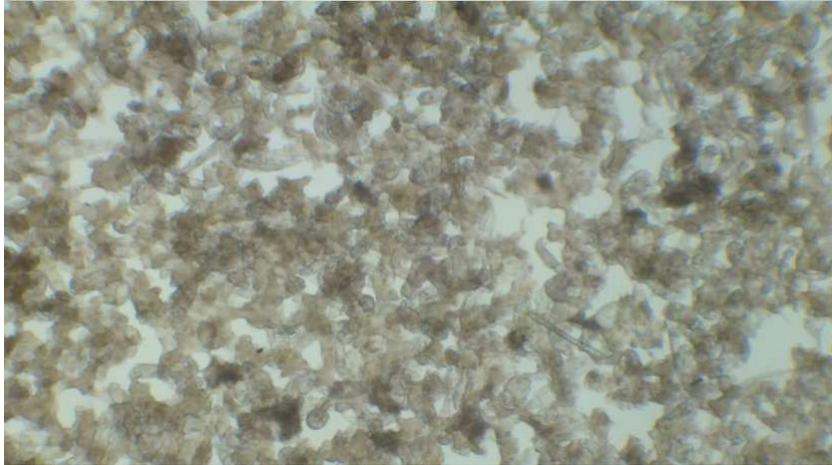


Figure 20 : Bloc d'agarose LMP présentant les rotifères réhydratés après une dessiccation rapide et 7 jours de dessiccation. La densité de rotifères sur l'agarose LMP réhydraté empêchait de réaliser un comptage précis du nombre de rotifères morts et vivants.

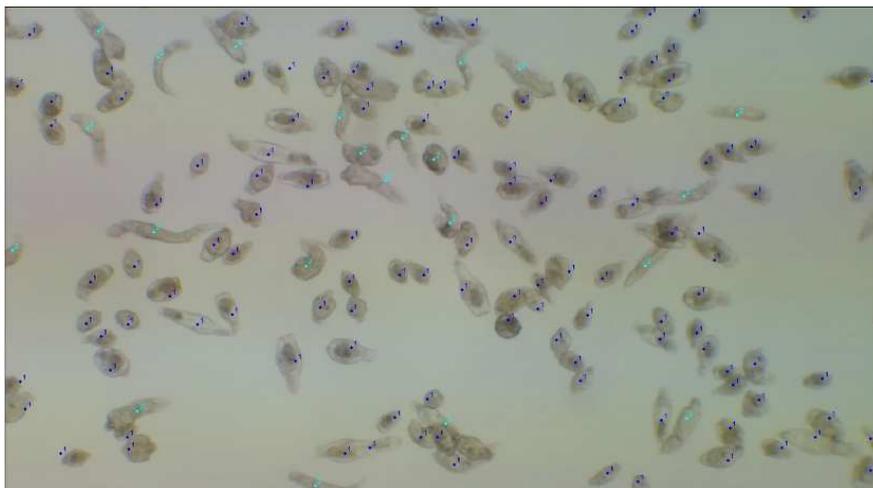


Figure 21 : Comptage des rotifères sur une zone bordant l'agarose LMP contenant les rotifères « réveillé » après une dessiccation rapide et une journée de dessiccation. Les rotifères marqué en bleu foncé sont les rotifères morts. Les rotifères marqués en bleu clair sont les rotifères vivants.

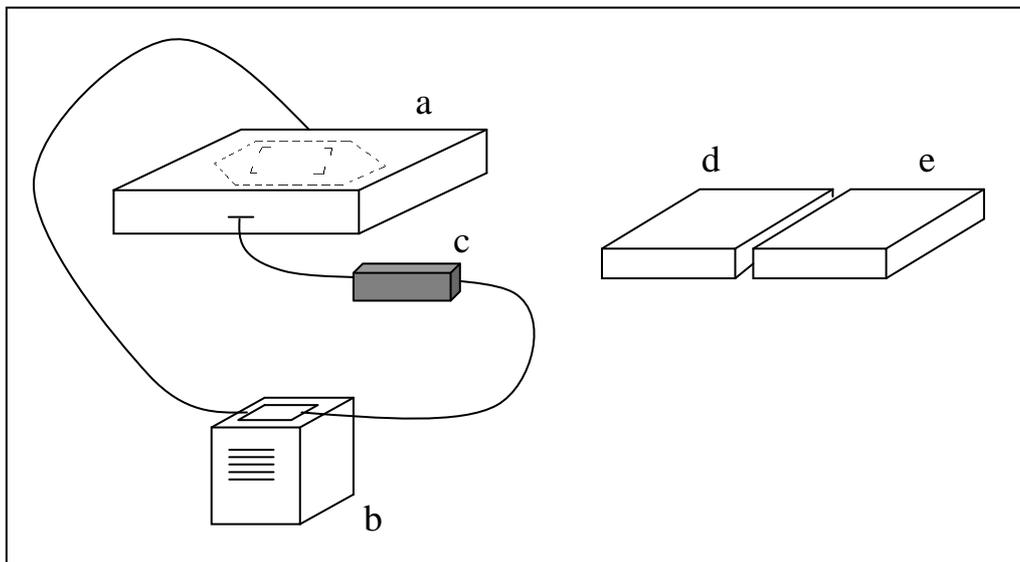


Figure 22: Schéma de la PFGE: a. Cuve d'électrophorèse avec 3 champs électriques ; b. refroidisseur ; c. pompe ; d. générateur ; e. pulsewave

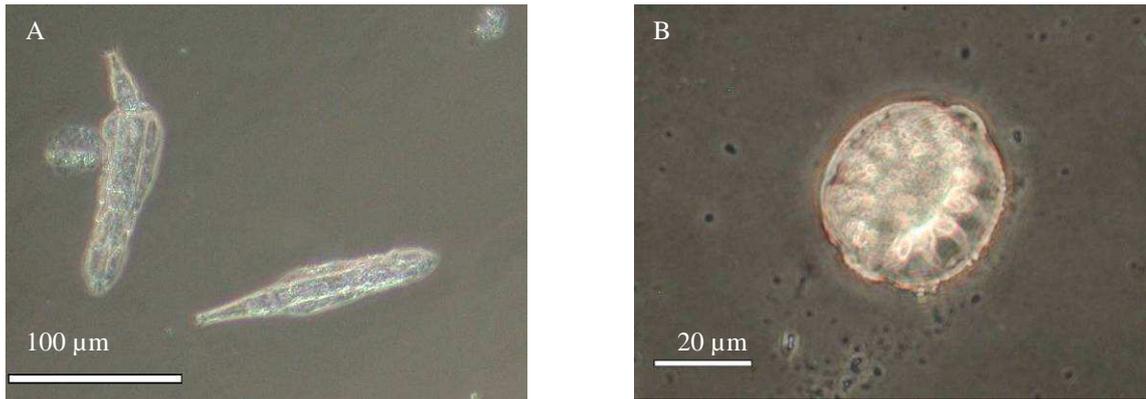


Figure 23 : Microscopie optique de rotifères bdelloïdes *A. vaga* hydraté (A) ; desséché (B)

qté LMP(mL)	tps moyen de dessiccation (h)	taux moyen de survie (%)
10	16	0
12,5	24	15
15	29	28
20	35	45

Tableau 1 : Evolution du temps moyen de dessiccation et du taux de survie en fonction de la quantité d'agarose LMP dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre. T° moyenne = 24° C ; Humidité relative variable



Figure 24 : Photo de la disposition des boîtes de pétri lors de la dessiccation. Les six boîtes au centre contiennent les rotifères à dessécher sur de l'LMP agarose. En périphérie, les boîtes sont remplies d'eau

		vivants	morts	total
dessiccation rapide 1 jour dessiccation	Zone 1	29	103	132
dessiccation rapide 1 jour dessiccation	Zone 2	22	120	142
dessiccation rapide 1 jour dessiccation	Zone 3	18	111	129
dessiccation rapide 1 jour dessiccation	Zone 4	21	139	160
dessiccation rapide 1 jour dessiccation	Zone 5	35	127	162
	moyenne	25,00	120,00	145,00
	% de vivants sur total observé	17,2413793		
dessiccation lente 1 jour dessiccation	Zone 1	11	10	21
dessiccation lente 1 jour dessiccation	Zone 2	12	33	45
dessiccation lente 1 jour dessiccation	Zone 3	36	23	59
dessiccation lente 1 jour dessiccation	Zone 4	25	12	37
dessiccation lente 1 jour dessiccation	Zone 5	12	13	25
	moyenne	19,20	18,20	37,40
	% de vivants sur total observé	51,3368984		
dessiccation rapide 7 jours dessiccation	Zone 1	6	8	14
dessiccation rapide 7 jours dessiccation	Zone 2	4	99	103
dessiccation rapide 7 jours dessiccation	Zone 3	0	143	143
dessiccation rapide 7 jours dessiccation	Zone 4	7	182	189
dessiccation rapide 7 jours dessiccation	Zone 5	1	600	601
	moyenne	3,6	206,4	210
	% de vivants sur total observé	1,71428571		
dessiccation lente 7 jours dessiccation	Zone 1	45	36	81
dessiccation lente 7 jours dessiccation	Zone 2	28	11	39
dessiccation lente 7 jours dessiccation	Zone 3	15	17	32
dessiccation lente 7 jours dessiccation	Zone 4	30	15	45
dessiccation lente 7 jours dessiccation	Zone 5	29	50	79
	moyenne	29,4	25,8	55,2
	% de vivants sur total observé	53,2608896		
dessiccation rapide 14 jours dessiccation	Zone 1	6	201	207
dessiccation rapide 14 jours dessiccation	Zone 2	7	400	407
dessiccation rapide 14 jours dessiccation	Zone 3	6	400	406
dessiccation rapide 14 jours dessiccation	Zone 4	5	600	605
dessiccation rapide 14 jours dessiccation	Zone 5	2	372	374
	moyenne	5,2	394,6	399,8
	% de vivants sur total observé	1,30065033		
dessiccation lente 14 jours dessiccation	Zone 1	97	67	164
dessiccation lente 14 jours dessiccation	Zone 2	54	33	87
dessiccation lente 14 jours dessiccation	Zone 3	29	13	42
dessiccation lente 14 jours dessiccation	Zone 4	38	39	77
dessiccation lente 14 jours dessiccation	Zone 5	54	53	107
	moyenne	54,4	41	95,4
	% de vivants sur total observé	57,0230608		

Tableau 2 : Résultats des comptages des rotifères réhydratés après une dessiccation lente et rapide et une période de dessiccation de 1, 7 et 14 jours.

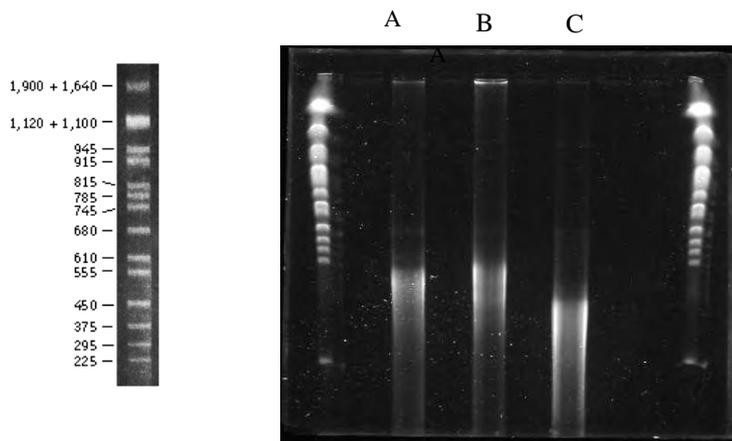


Figure 25: PFGE. Ladder en Kb ; A et B. ADNg extrait à partir d'oeufs d'*A. vago* par le protocole de J. M. Welch; C. ADNg extrait à partir d'oeufs d'*A. vago* par le protocole de J. M. Welch, et cassés volontairement avec l'aiguille d'une seringue. La première et la dernière colonne correspondent au Ladder *Saccharomyces cerevisiae* YPH80

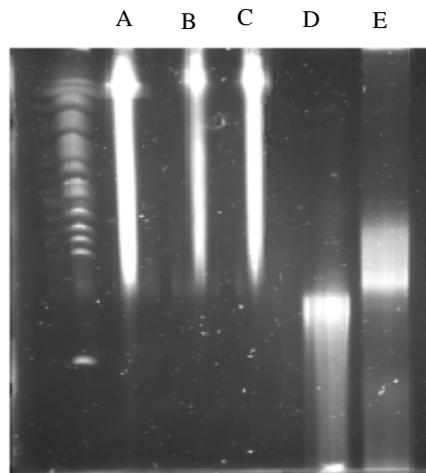


Figure 26: PFGE. A, B et C. ADNg extrait à partir d'adulte d'*A. vago* selon le protocole de Gladishev et Meselson; D. ADNg extrait par le protocole de J. M. Welch et dégradé volontairement avec aiguille de seringue ; E. ADNg extrait par le protocole de J. M. Welch. La première colonne est le ladder *Saccharomyces cerevisiae* YPH80

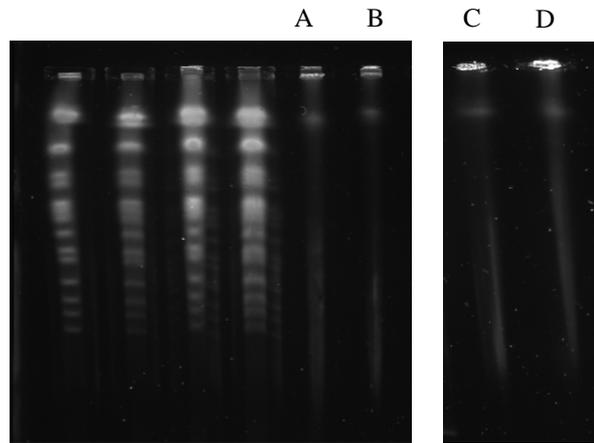


Figure 27: PFGE. ADNg extrait selon le protocole de Gladishev et Meselson ; A et D. ADN de rotifères non desséchés ; B et C. ADN de rotifères desséchés pendant 24 h ; Les 4 premières colonnes correspondent au ladder *Saccharomyces cerevisiae* YPH80

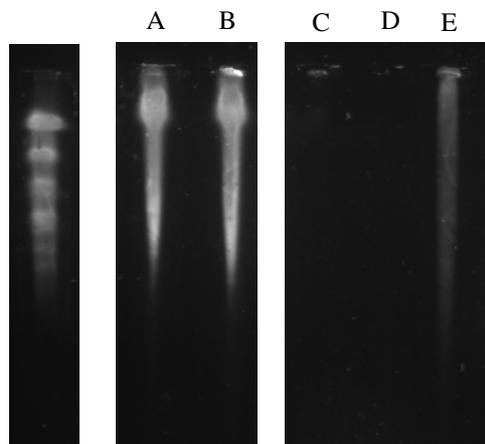


Figure 28 : PFGE. ADNg de rotifères bdelloides extraits par la méthode de Gladishev et Meselson ; A. ADNg de rotifères non desséchés ; B. ADNg de rotifères desséchés pendant 24 h ; C. ADNg de 200 rotifères desséchés pendant 24 h ; D. ADNg de 50 rotifères desséchés pendant 24h ; E. ADNg de rotifères ayant été soumis à une température de 100° C durant 1 h. La première colonne correspond au ladder *S. cerevisiae* YPH80

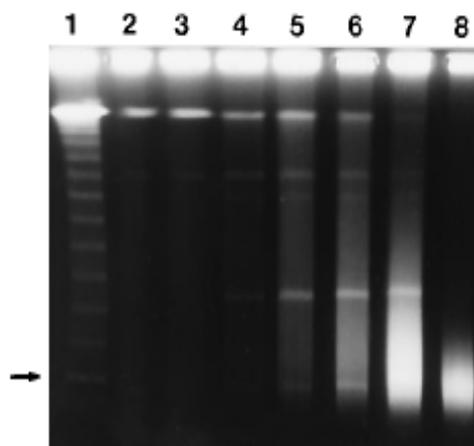


Figure 29 : Figure reprise de l'article de V. Mattimore et al. (36)
Apparition de DSBs dans l'ADN de la bactérie *D. radiodurans* desséchées en fonction du temps
1. lambda ladder size standards. La flèche indique le marqueur à 48.5 kb ; 2. ADN chromosomique *D. radiodurans* préparé à partir d'une culture non traitée ; 3 à 8. préparations d'ADN chromosomique obtenues à partir de culture après 1, 4, 8, 14, 28 et 42 jours de dessiccation, respectivement.

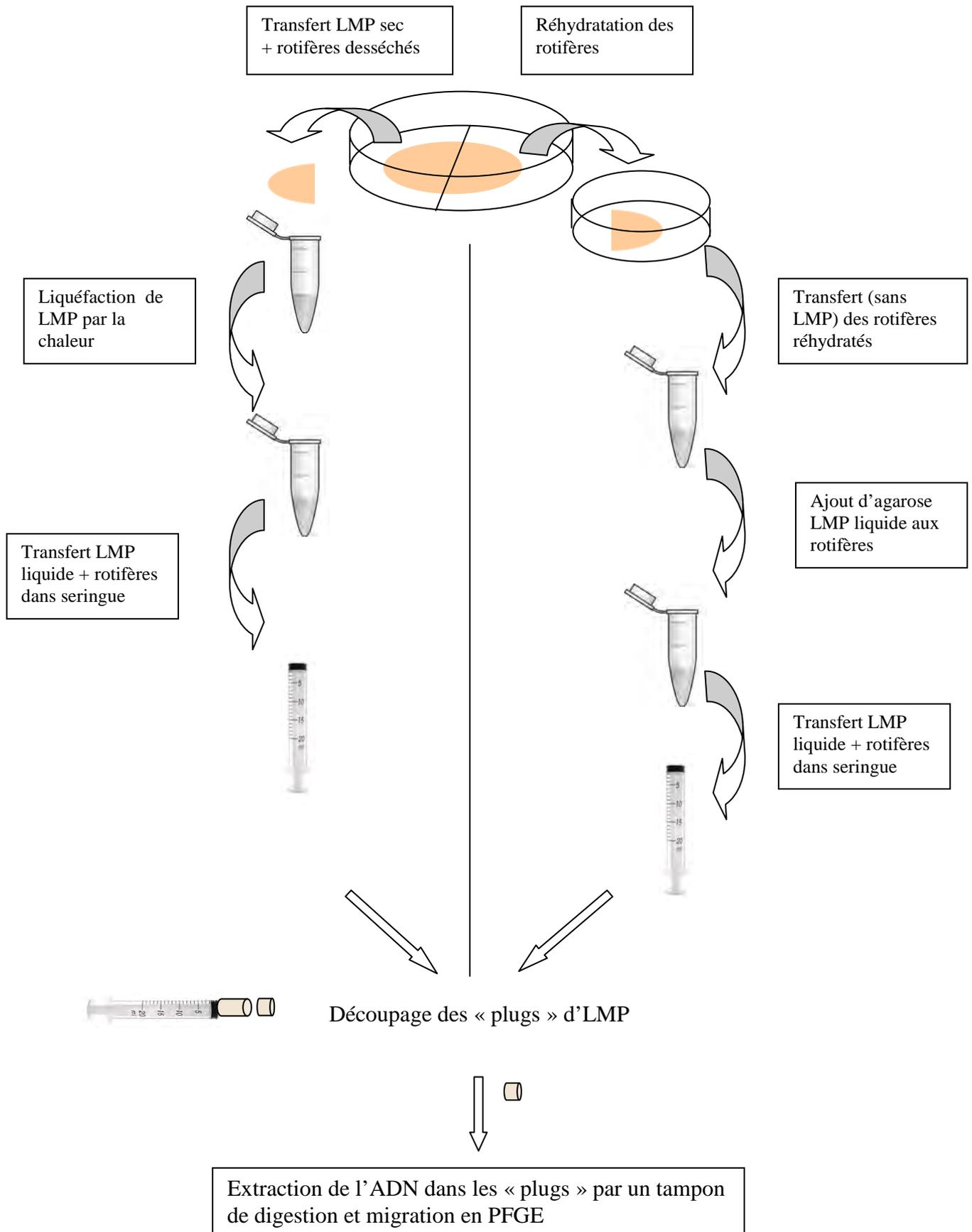


Figure 30: Procédure de réalisation des « plugs » à partir des individus desséchés (à gauche) et des individus réhydratés (à droite)

1.

2.

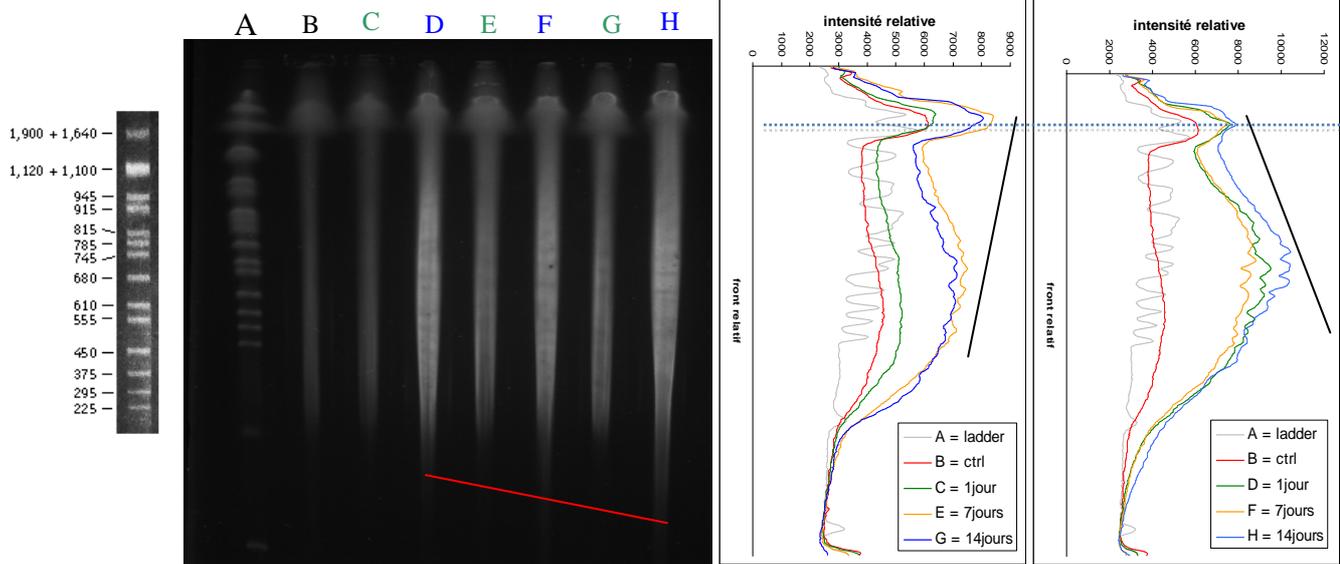
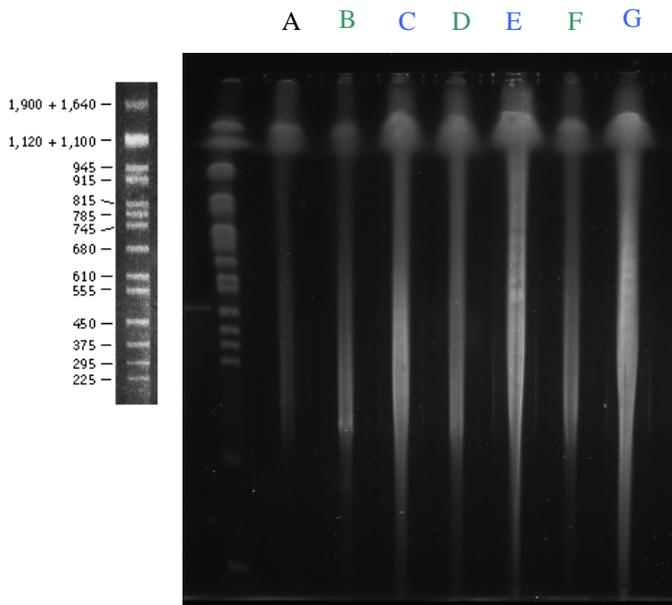


Figure 31 : 1. PFGE. Ladder en Kb. ADN_g de *A. vaga* extrait selon le protocole de Gladishev et Meselson : A. ladder *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 ; B. ADN de rotifères non desséchés ; C. ADN de rotifères desséchés pendant 1 jour lentement ; D. ADN de rotifères desséchés pendant 1 jour rapidement ; E ADN de rotifères desséchés pendant 7 jours lentement ; F. ADN de rotifères desséchés pendant 7 jours rapidement ; G. ADN de rotifères desséchés pendant 14 Jours lentement ; H. ADN de rotifères desséchés pendant 14 jours rapidement. La ligne droite rouge montre une présence de fragments de plus en plus petits entre D, F et H (dessiccation rapide) ; 2. Scanner photométrique obtenus avec le logiciel « Quantity one » de BioRad. Le signal obtenu est fonction de l'intensité lumineuse du gel : a, profils d'ADN des rotifères desséchés lentement pendant 1, 7 et 14 jours ; b, profils d'ADN des rotifères desséchés rapidement pendant 1, 7 et 14 jours. Les droites noires représentent l'allure générale des profils pour chaque condition. La ligne en pointillé indique l'ADN au niveau de 1,900 kb et correspond donc à l'ADN non dégradé ou cassé

1.



2.

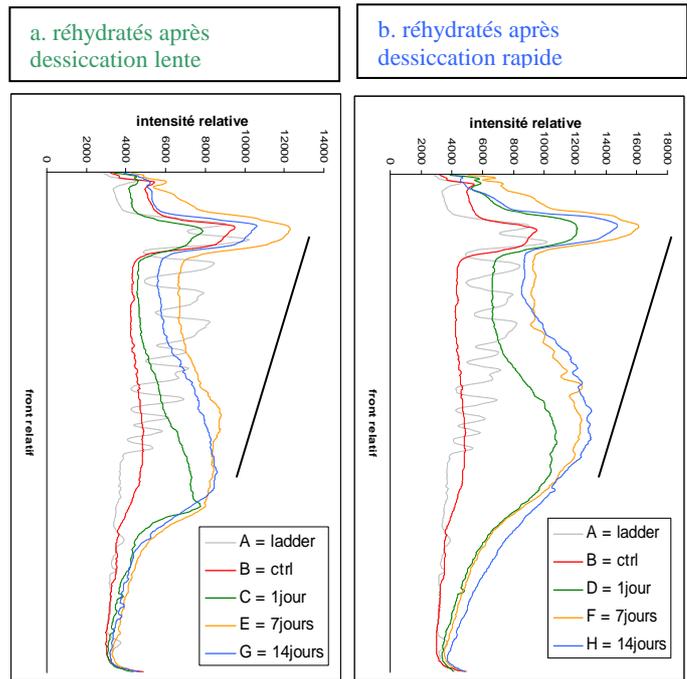


Figure 32 : 1. PFGE. Ladder en Kb. ADN_g de *A. vaga* extrait selon le protocole de Gladishev et Meselson : A. ADN de rotifères non desséchés ; B. ADN de rotifères réhydratés après 1 jour de dessiccation lente; C. ADN de rotifères réhydratés après 1 jour de dessiccation rapide; D. ADN de rotifères réhydratés après 7 jours de dessiccation lente ; E. ADN de rotifères réhydratés après 7 jours de dessiccation rapide ; F. ADN de rotifères réhydratés après 14 Jours de dessiccation lente ; G. ADN de rotifères réhydratés après 14 jours de dessiccation rapide. 2. Scanner photométrique obtenus avec le logiciel « Quantity one » de BioRad. Le signal obtenu est fonction de l'intensité lumineuse du gel : a, profils ADN des rotifères réhydratés après une dessiccation lente de 1, 7 et 14 jours ; b, profils ADN des rotifères réhydratés après une dessiccation rapide de 1, 7 et 14 jours. Les droites noires représentent l'allure générale des profils pour chaque condition

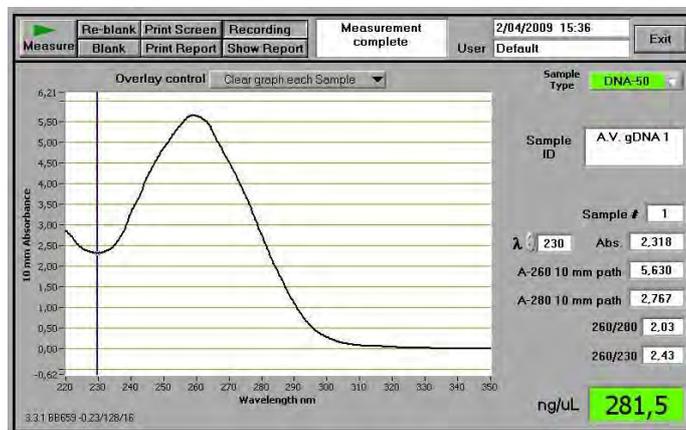


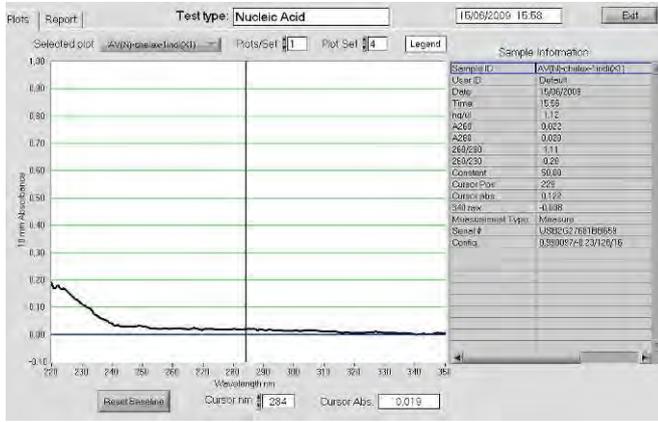
Figure 33 : Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN par le nanodrop

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EF173216.1	Adineta vaga isolate UK.1.4 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, p	1177	1177	93%	0.0	99%	
EF173250.1	Adineta vaga isolate UK.12 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, p	1088	1088	88%	0.0	98%	
EF173215.1	Adineta vaga isolate UK.1.3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	1070	1070	84%	0.0	99%	
EF173213.1	Adineta vaga isolate UK.1.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	953	953	75%	0.0	99%	
EF173214.1	Adineta vaga isolate UK.1.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	928	928	74%	0.0	99%	
EF173210.1	Adineta sp. TZ.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds;	835	835	93%	0.0	90%	
EF173252.1	Adineta vaga isolate TZ.1.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	819	819	93%	0.0	89%	
EF650529.1	Macrotrachela quadricornifera isolate M.quad.FR.1.2 cytochrome oxidase	797	797	89%	0.0	89%	
EF173242.1	Adineta vaga isolate UK.9 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	795	795	92%	0.0	88%	
EF650558.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.UK.7 cytochrome oxidase subu	791	791	93%	0.0	88%	
EF173258.1	Adineta vaga isolate TZ.2.5 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	784	784	89%	0.0	89%	
EF173208.1	Adineta sp. FR.5 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds;	782	782	92%	0.0	88%	
EF173223.1	Adineta sp. UK.3.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cd	780	780	91%	0.0	89%	
EF173201.1	Adineta sp. UK.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds;	780	780	93%	0.0	88%	
EF650594.1	Macrotrachela quadricornifera isolate M.quad.IT.1.2 cytochrome oxidas	774	774	93%	0.0	88%	
EF173219.1	Adineta vaga isolate UK.4 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	774	774	93%	0.0	88%	
EU499837.1	Macrotrachela quadricornifera isolate EP.01 cytochrome oxidase subuni	773	773	91%	0.0	88%	
EF650536.1	Macrotrachela quadricornifera isolate M.quad.UK.1.2 cytochrome oxidas	773	773	88%	0.0	89%	
EF173233.1	Adineta vaga isolate NZ.1.4 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	773	773	91%	0.0	88%	
DQ079961.1	Adineta vaga cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mi	771	771	94%	0.0	88%	
AY218092.1	Adineta vaga cytochrome c oxidase subunit I gene, partial cds; mitoch	771	771	94%	0.0	88%	
EF650542.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.UK.5 cytochrome oxidase subu	769	769	93%	0.0	88%	
EF173240.1	Adineta vaga isolate UK.8.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	769	769	93%	0.0	88%	
EF173217.1	Adineta vaga isolate UK.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	769	769	93%	0.0	88%	
EF650489.1	Macrotrachela quadricornifera isolate M.quad.UK.7 cytochrome oxidase	765	765	89%	0.0	89%	
EF650564.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.TZ.2 cytochrome oxidase subu	763	763	93%	0.0	88%	
EF650500.1	Macrotrachela plicata isolate M.plic.IT cytochrome oxidase subunit I ge	763	763	90%	0.0	88%	
EF650485.1	Habrotrocha lata isolate H.lata.UK cytochrome oxidase subunit I gene, p	763	763	89%	0.0	89%	
EF173229.1	Adineta vaga isolate UK.7 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	760	760	93%	0.0	88%	
EF173218.1	Adineta vaga isolate UK.3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	758	758	93%	0.0	88%	
EF173203.1	Adineta sp. MX.1.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cd	758	758	93%	0.0	88%	
EU499843.1	Macrotrachela quadricornifera isolate EP.07 cytochrome oxidase subuni	756	756	91%	0.0	88%	
EU499840.1	Macrotrachela quadricornifera isolate EP.04 cytochrome oxidase subuni	756	756	91%	0.0	88%	
EF650557.1	Macrotrachela quadricornifera isolate M.quad.UK.4.5 cytochrome oxidas	756	756	88%	0.0	88%	
EF650550.1	Macrotrachela quadricornifera isolate M.quad.FR.4 cytochrome oxidase	754	754	93%	0.0	87%	
EF650486.1	Habrotrocha lata isolate H.lata.CA cytochrome oxidase subunit I gene,	754	754	92%	0.0	88%	
EF650484.1	Uncultured Habrotrocha isolate H.sp.FR cytochrome oxidase subunit I g	754	754	89%	0.0	88%	
DQ089725.1	Adineta vaga cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochon	754	754	94%	0.0	87%	
EF173232.1	Adineta vaga isolate NZ.1.3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	752	752	88%	0.0	89%	
EF173224.1	Adineta vaga isolate UK.5.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	752	752	93%	0.0	87%	

Figure 34: Séquences pour lesquelles les alignements sont significatifs par rapport à la séquence COI d'un rotifère isolé dans une mousse à Namur

A



B

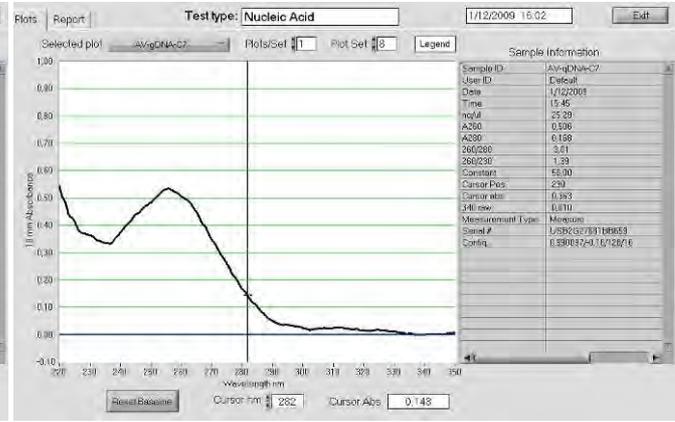


Figure 35 : Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN par le spectrophotomètre Nanodrop après extraction par la méthode Chelex à partir de cinq individus (A) et la méthode au microkit QIAamp (B) à partir d'un individu unique

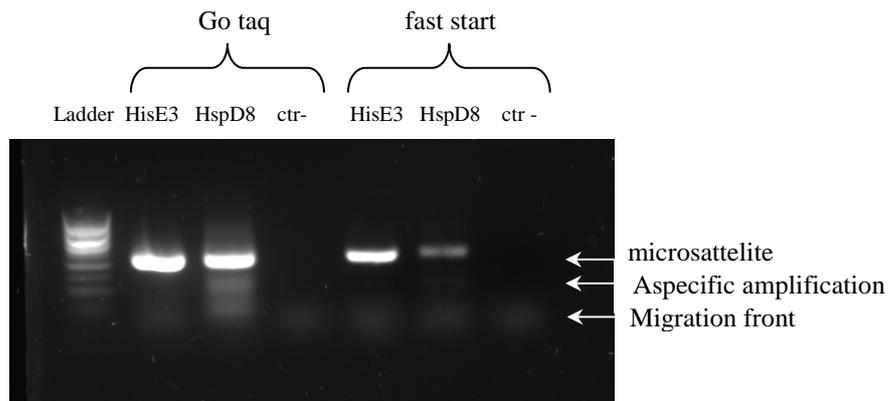


Figure 36 : Test de 2 paires d'amorces avec 2 enzymes polymérase (Go taq et fast start)

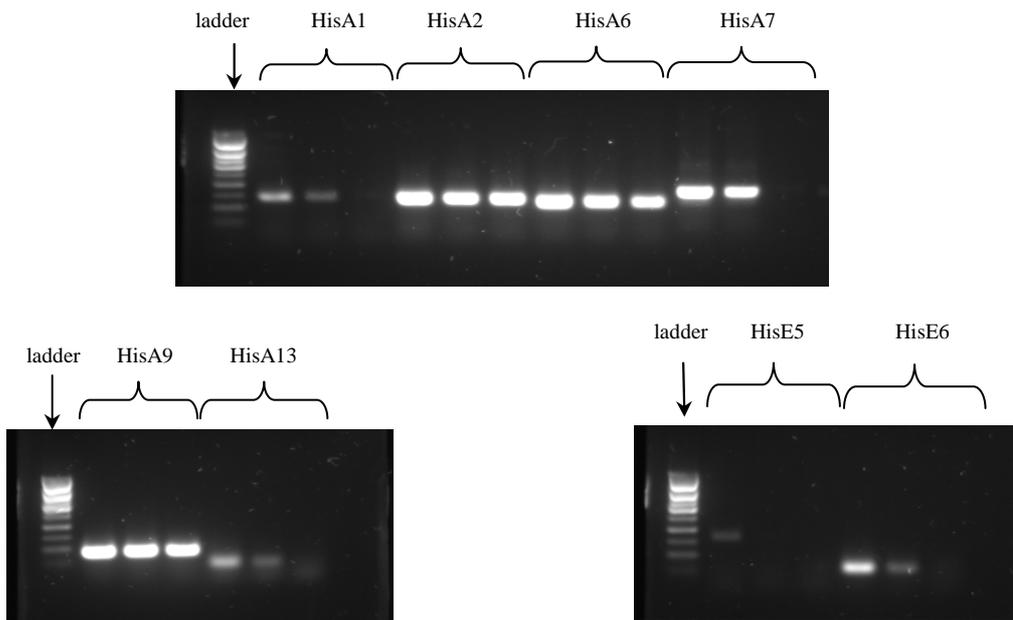


Figure 37: Test de huit paires d'amorces sur l'ADNg de *A.vaga* de Harvard avec trois Tm pour chaque paire d'amorce : Tm HisA1=58.2°C, 59.6°C, 60.8°C ; Tm HisA2=51°C, 52.4°C, 53.8°C ; Tm HisA6=60.8°C, 61.7°C, 62°C ; Tm HisA7=50°C, 51°C, 52.4°C ; Tm HisA9=58.2°C, 59.6°C, 60.8°C ; Tm HisA13=55.2°C, 56.8°C, 58.2°C ; Tm HisE5=53.8°C, 55.2°C, 56.8°C ; Tm HisE6=55.2°C, 56.8°C, 58.2°C

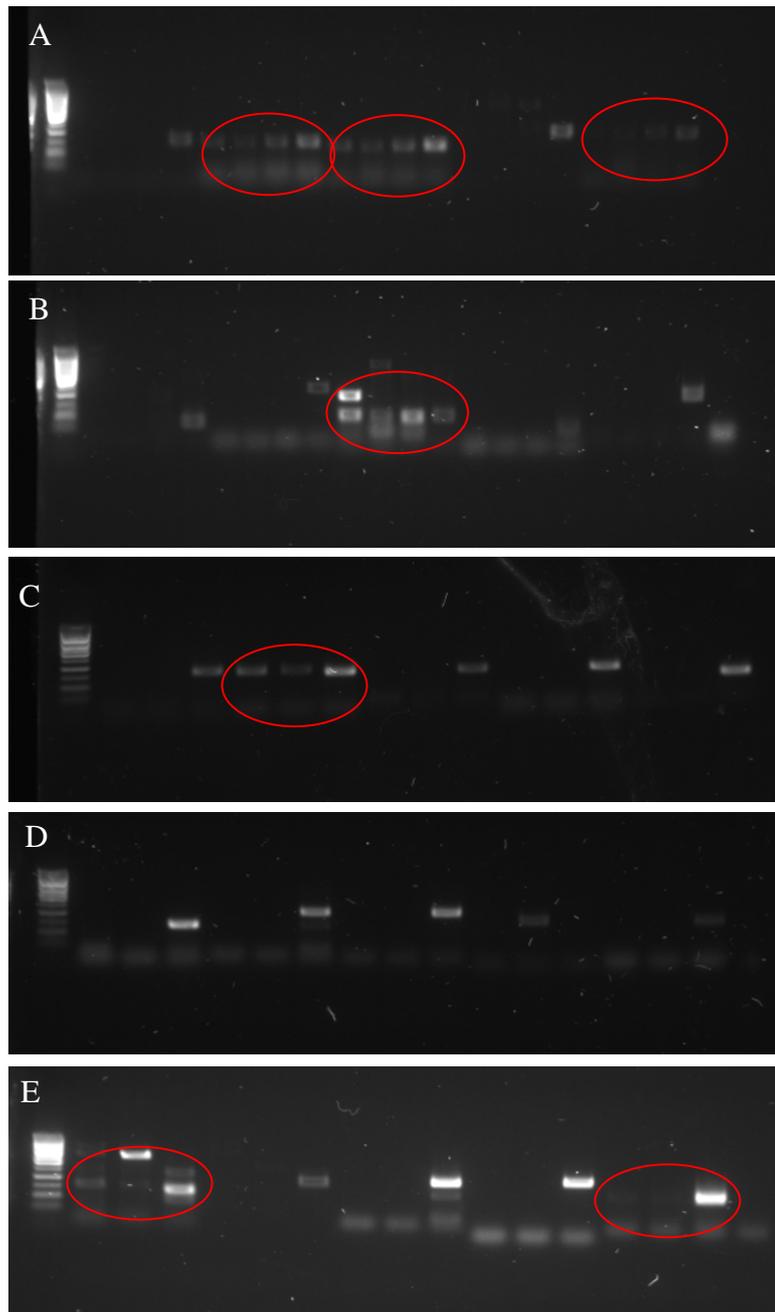


Figure 38: 25 microsatellites sur gel d'agarose 1 %. A, B, C, D et E. chaque paire d'amorces a été testée sur deux individus clonés de Namur et le clone de Harvard respectivement : A. HisA1, HisA2, HisA6, HisA7, HisA9 ; B. HisA13, HisE3, HisE5, HisE6, HisI5. ; C, D et E. chaque paire d'amorces a été testée sur 2 individus clonés de Namur et sur le clone de Harvard respectivement : C. HisI7, HisI9, HisI10, HspA4, HspA6 ; D. HpsA7, HspC5, HspD3, HspD6 ; E. HisO9, HisO11, HspD8, HspD9, HspD10
Entourés en rouge, les paires d'amorces qui amplifient un microsatellite sur les individus de Namur : dans l'ordre : HisA2, HisA6, HisA9, HisE5, HisI9, HisO9, HspD10
La première ligne de chaque gel correspond au ladder de *Saccharomyces cerevisiae*

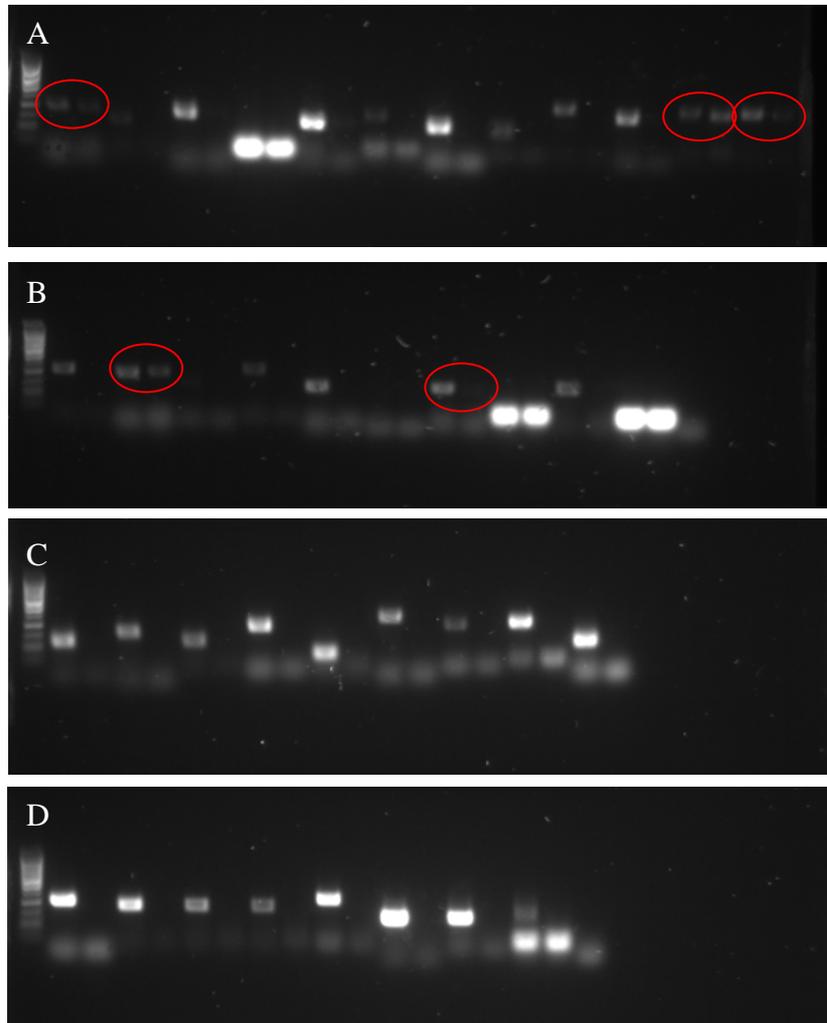


Figure 39 : 39 microsatellites sur gel d'agarose 1 %. Chaque paire d'amorces a été testée sur le clone *A. vaga* de Harvard et un individu de *A. vaga* de Namur respectivement :

A. HisA11-HisI11-HisI14-HisE4-HisE5-HisA10-HisE1-HisE2-HisI13-HisA12-HisI2-HisO2-

B. HisA4-HisI8-HisI15-HisI6-HisO1-HisI4-HisA3-HisI8-HisI1-HisI12

C. HisO3-HspC2-HspD4-HspA2-HspA3-HspD2-HspA1-HspC6-HspD7

D. HisO5-HisO8-HspC1-HspD5-HisO4-HspA5-HspA9-HspD1

La première ligne de chaque gel correspond au ladder *Saccharomyces cerevisiae*

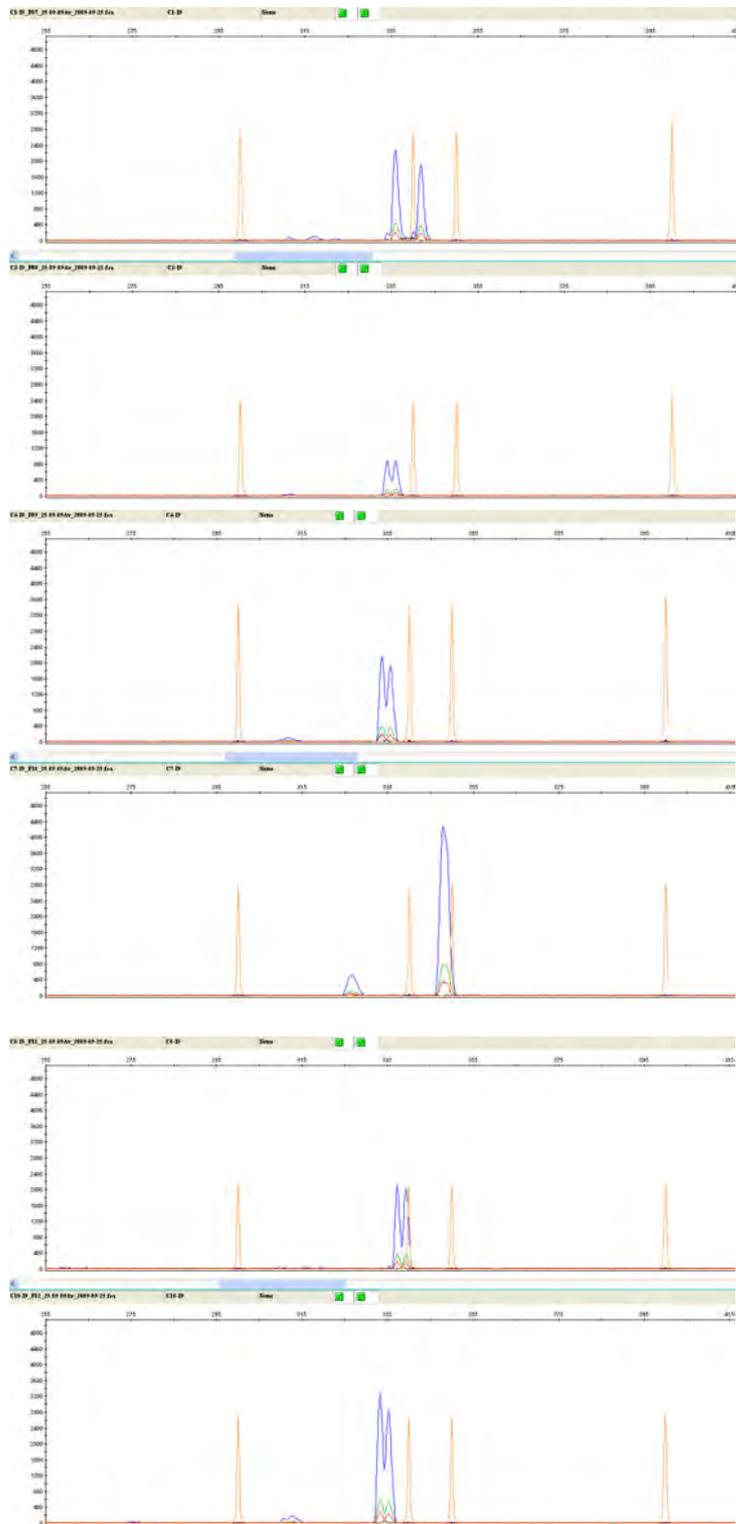


Figure 40 : Résultat du génotypage sur l'électrophorèse capillaire ABI 3130XL du locus microsatellite HisI9. Présentation à une T_m de 52.4 °C

	Nom amorce	séquence (5'-3') de l'amorce reverse	séquence (5'-3') de l'amorce forward
Group 1	HisA6	FAM-TTTGTTCCATCATTCTTTATCGACT	GTTTCTTTGTTATTACTGTTGTGCGAGT
	HisI2	dragon fly orange-TTTGTTTTCTTTCAGTGGCTT	GTTTCTTTTGTTTTGCTTTTTGTTATTGT
Group 2	HisA3	FAM-CTCGTTAATCTCACTTATGTGTCC	GTTTCTTTCTGACGAATAAGTATAAGCTTGAA
	HisA11	dragon fly orange-CTTTGTCGTTTTTGCT	GTTTCTTTCTTTATGCTTGGCAATG
Group 3	HisI9	FAM-GAGTACAATTTTGCTGAGTT	GTTTCTTCTGCTGGTTTCGTTGAAT
	HisI8	dragon fly orange-TGTAGGGAGTGTGCGTGAG	GTTTCTTTGTGGATATCTCTTAGCAATCTAA
Group 4	HisA9	FAM-TGTTTTTATGTTTTCTTTCTTCT	GTTTCTTGTGGTAGCTTGAGTTTTTGG

Tableau 3 : Nom et séquences des amorces utilisées pour le génotypage final. L'amorce « reverse » est couplée à un fluorochrome. Les 2 paires d'amorces en rouge sont les deux amorces n'ayant permis l'amplification de microsatellite que pour quelques individus

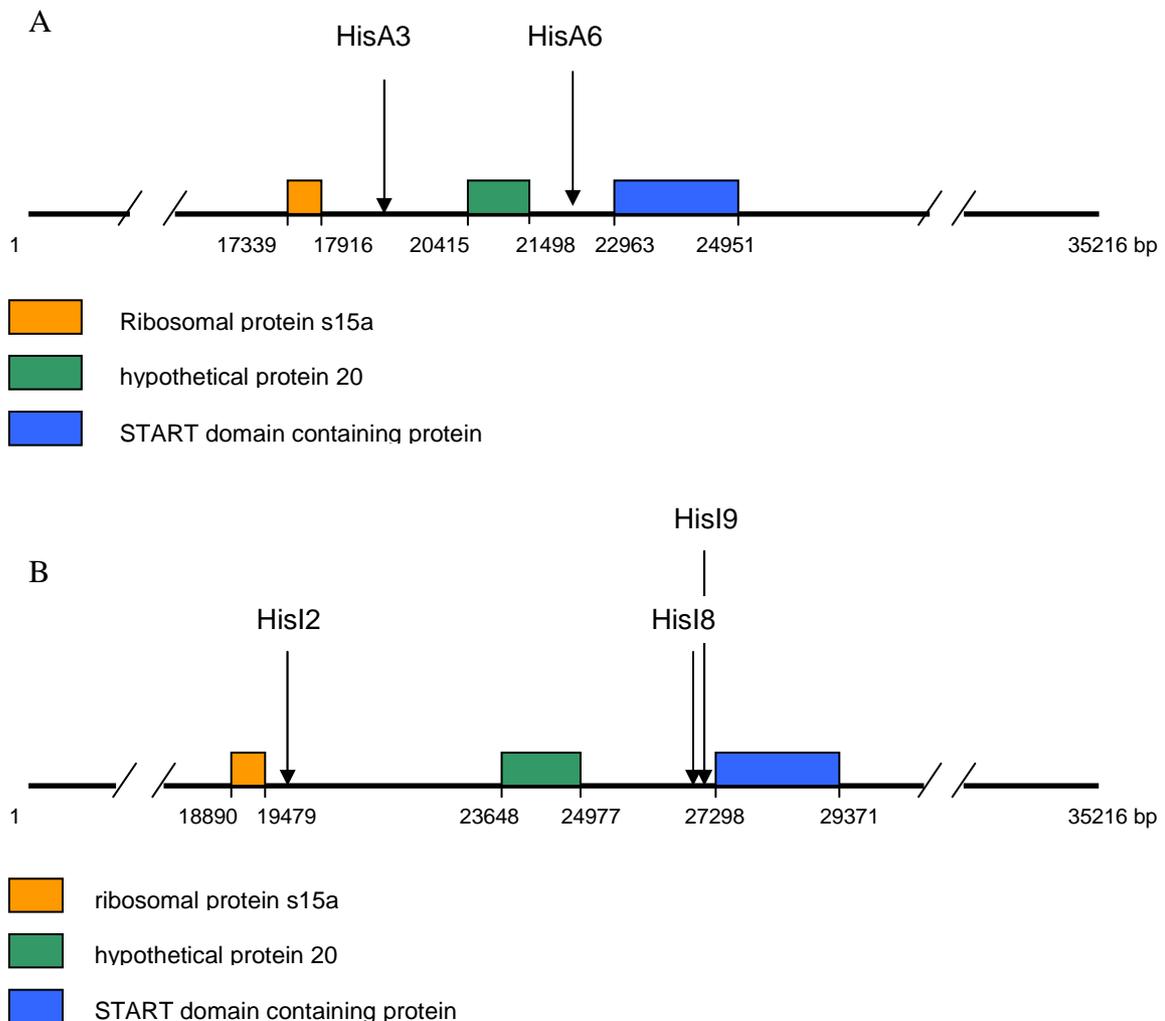


Figure 41 : Schéma de la position des 5 microsatellites analysés sur les contigs Histones 1 et 3 d'*Adineta vaga* ; A. Contig Histone 1 ; B. Contig Histone 3

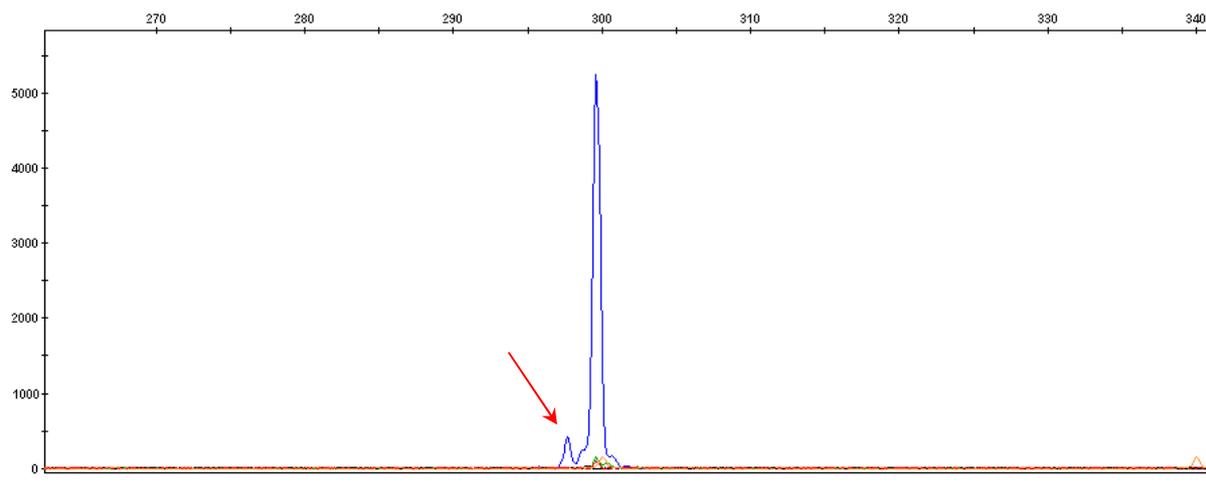


Figure 42 : Résultat du génotypage sur l'électrophorèse capillaire ABI 3130XL du locus microsatellite HisA3 pour un individu *A. vaga*. La flèche rouge indique la présence d'une « stutter band »

	Locus	Séquence amorce (5'-3')	Motif répété	T _a (°C)	Gamme de taille	A	H _O	H _E	HWE
Gr 1	HisA6	F: GTTTCCTTTGTTATTACTGTTGTGCGAGT R: FAM -TTTGTTCATCATCTTTTATCGACT	(CT)11	60.8	239-251	4	0.304	0.573	0.000
	HisI2	F: GTTTCCTTTGTTTTGCTTTTTGTTATTGT R: Dragonfly orange -TTTGTTCCTTTTCAGTGGCTT	(TG)7	58.2	375-391	6	0.391	0.613	0.000
Gr 2	HisA3	F: GTTTCCTTCTGACGAATAAGTATAAGCTTGAA FAM -CTCGTTAATCTCACTTATGTGTCC	(CT)8	62	275-299	5	0.174	0.490	0.000
Gr 3	HisI8	F: GTTTCCTTTGTGGATATCTCTTAGCAATCTAA R: Dragonfly orange -TGTAGGGAGTGTGCGTGAG	(CT)7	59.6	400-408	4	1.000	0.741	0.000
	HisI9	F: GTTTCCTCCTGCTGGTTTCGTTGAAT R: FAM -GAGTACAATTTTGCTGAGTT	(TA)9	52.4	324-349	7	0.522	0.740	0.000
						Mean 5.2	0.478	0.631	

Tableau 4 : Caractérisation des cinq loci microsatellites pour 23 individus rotifères bdelloïdes (*Adineta vaga*) venant d'une mousse à Namur (Belgique). Les 5 loci sont séparés en 3 Groupes de multiplexage PCR. Pour chaque locus : nom du locus ; séquence de l'amorce « forward » et « reverse », l'amorce « reverse » (R) était marqué par un fluorochrome; colonne du motif répété; T_a, annealing temperature; Gamme de taille, gamme de tailles des allèles (bp) observée dans notre étude; A, nombre d'allèle par locus; H_O, hétérozygotie observée; H_E, hétérozygotie attendue; HWE, valeurs de probabilité (*P-value*) des tests de déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg; la dernière ligne représente la valeur moyenne pour A, H_O et H_E

Clone	A6		I2		A3		I8	
	Allele1	Allele 2	I3	Allele 2	Allele1	Allele 2	Allele1	Allele 2
C01	241	245	I4	383	275	293	400	408
C02	239	245	I5	379	295	295	400	408
C03	241	245	I6	377	275	289	400	408
C04	239	245	I7	379	299	299	400	408
C05	251	251	I8	391	299	299	402	404
C07	251	251	I9	391	299	299	402	404
C08	241	245	I10	379	299	299	400	402
C09	245	245	I11	379	299	299	400	402
C10	239	245	I12	379	295	295	400	408
C11	239	245	I13	379	295	295	400	408
C12	251	251	I14	391	299	299	402	404
C13	251	251	I15	391	299	299	402	404
C14	251	251	I16	391	299	299	402	404
C15	251	251	I17	391	299	299	402	404
C16	251	251	I18	391	299	299	402	404
C17	251	251	I19	391	299	299	402	404
C18	251	251	I20	391	299	299	402	404
C19	251	251	I21	391	299	299	402	404
C20	251	251	I22	391	299	299	402	404
C21	245	245	I23	379	295	295	400	408
C22	251	251	I24	391	299	299	402	404
C23	251	251	I25	391	293	299	402	404
C24	251	251	I26	391	299	299	402	404
H	245	249	389	389	293	293	400	400

Tableau 5 : Comparaison des allèles entre les clones de Namur (C01-C24 excepté C6) et le clone d'*Adineta vaga* de Harvard (H). Les allèles en bleu correspondent aux allèles communs entre les clones de Namur et celui de Harvard

mtDNA CO1	nbre clones	clones	microsat	nbre clones	clones
Hap_1	1	C1	Genotype_1	1	C1
Hap_5	2	C8, C9	Genotype_7	1	C8
			Genotype_8	1	C9 (1 allele diff. du Genotype_7)
Hap_2	5	C2, C4, C10, C11, C21	Genotype_2	3	C2, 10,11
			Genotype_3	1	C4 (1 locus diff. du Genotype_2)
			Genotype_4	1	C21 (1 allele diff. du Genotype_2)
Hap_3	1	C3	Genotype_5	1	C3
Hap_4	13	C5, C7, C12-20, C22, C24	Genotype_6	13	C5, C7, C12-20, C22, C24
Hap_6	1	C23	Genotype_9	1	C23
Clones partageant les mêmes génotypes microsatellites et le même haplotype CO1					
clones ayant des génotypes microsatellites différents mais un même haplotype CO1					

Tableau 6 : Comparaison de la diversité génotypique des microsatellites et la diversité haplotypique du gène mitochondrial CO1. Les haplotypes génétiquement proches (voir figure 43 B) sont rassemblés par des cadres plus épais et sont séparés les uns des autres par un espace

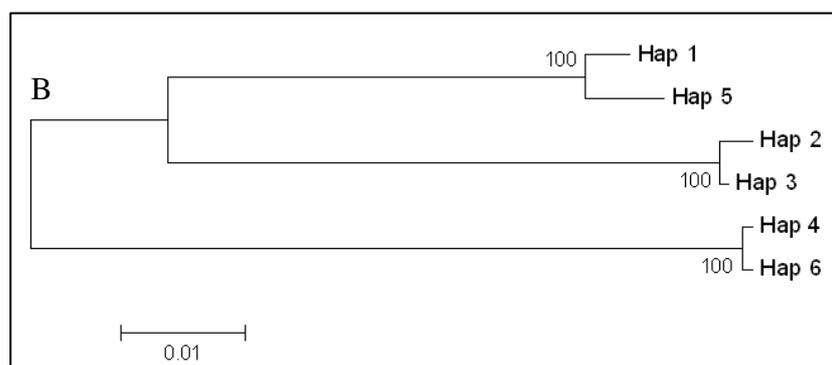
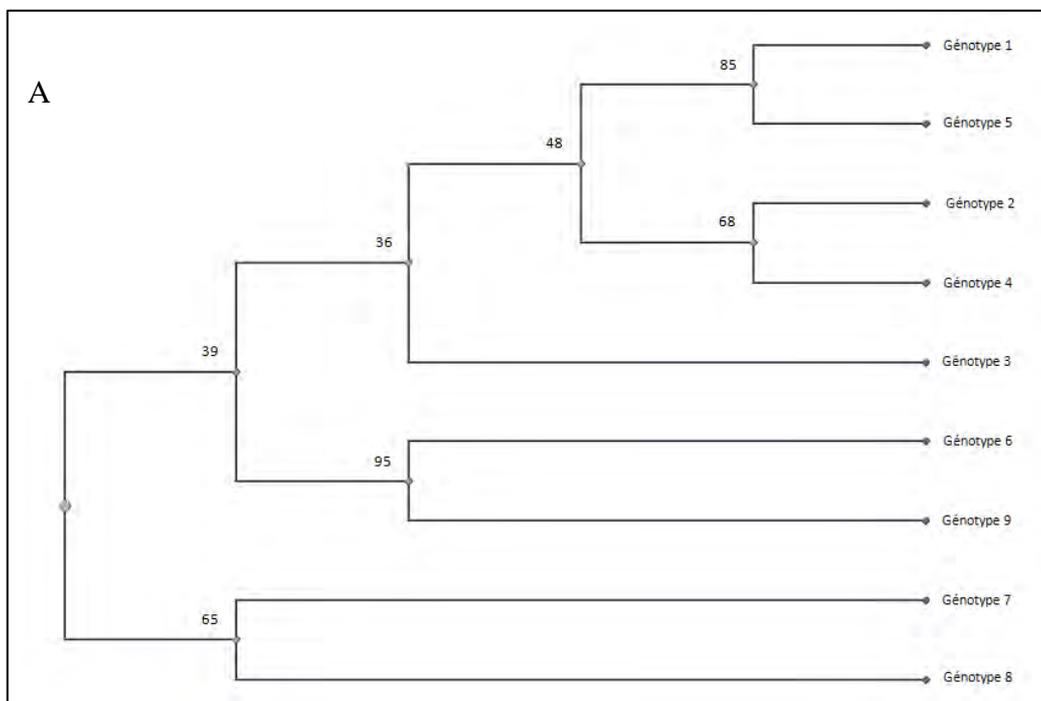


Figure 43 : Arbres phylogénétiques réalisés par la méthode du neighbour joining (NJ) dans le software Populations 1.2.30. 1000 Bootstrap réalisés. A. arbre phylogénétique sur base des génotypes microsatellites (ADNn) ; B. arbre phylogénétique sur base des haplotypes COI (ADNmt)

Annexe

Name	Sequence (5'-3')		Tm
HisA3_F	GTTTCTTTCTGACGAATAAGTATAAGCTTGAA	(TC)8	62.6°
HisA3_R	CTCGTTAATCTCACTTATGTGTCC		62.4°
HisA4_F	GTTTCTTTTTCTTTGTTATCGTTTTCTTTCT	(TC)8	62.3°
HisA4_R	TTAGCTTGTTTAGTTTTGTCTTC		60.4°
HisA5_F	GTTTCTTTCATCAACAACAATCGAC	(TC)6	56.0°
HisA5_R	AATAGCAAGGTTATCAAGAAA		57.7°
HisA8_F	GTTTCTTTGGATGTTGTTTGTAGACATTCGT	(TTG)6	63.1°
HisA8_R	GTTGTTTCTGGTCTATTTACGGATG		63.9°
HisA10_F	GTTTCTTGTTGTTAGCTTGAGTTTTTGG	(TGA)6	58.0°
HisA10_R	TGTTTTTATGTTTTCTTTTCTTCT		56.0°
HisA11_F	GTTTCTTTCTTTATGCTTGGCAATG	(ATC)6	50.0°
HisA11_R	CTTTGTCGTTTTTGTGCT		50.0°
HisA12_F	GTTTCTTAGAAAACAACAAAAAGAAAAAC	(CTT)6	60.4°
HisA12_R	GAGACAAGCAGAAGGATTAAC		59.3°
HisE1_F	GTTTCTTTGGTTCATTGGGATGAATATC	(AT)6	57.3°
HisE1_R	TTTTCTCCGTTGGCATGTTG		58.0°
HisE2_F	GTTTCTTCTTTGCTTCTCAATACATAC	(AT)7	56.8°
HisE2_R	CAATTACATCTTTACCACAATTC		57.6°
HisE4_F	GTTTCTTTTGACAAACGACGAGCCAA	(AAG)6	56.0°
HisE4_R	GAGAATGAACAACAAGGAA		54.0°
HisI1_F	GTTTCTTAACATAAACCCAACAGCCCTC	(AT)6	63.6°
HisI1_R	AACCATGACACAAAAGCACTCAC		63.2°
HisI2_F	GTTTCTTTTGTGTTTTGTTTTGTTATTGT	(TG)7	59.2°
HisI2_R	TTTGTTTTCTTTCAGTGGCTT		60.7°
HisI4_F	GTTTCTTTAAGAAGAACGATAAAGAAGAGAAG	(AG)7	61.9°
HisI4_R	CCATAAAAACATTGTCAAGAACGAA		63.0°
HisI6_F	GTTTCTTCTTTAGCCTAATCACACTAATTAT	(GA)6	60.9°
HisI6_R	CCTTCATTTAAGTACCTTCTTCT		60.8°
HisI8_F	GTTTCTTTGTGGATATCTTTAGCAATCTAA	(CT)7	59.6°
HisI8_R	TGTAGGGAGTGTGCGTGAG		60.0°
HisI11_F	GTTTCTTTTTCTTTGTTATCTCCATTG	(TGG)6	52.0°
HisI11_R	TTTCTTTTTCTCTATGGTG		50.0°
HisI12_F	GTTTCTTGACGACCAATGTCGGCTGG	(GGT)6	64.0°
HisI12_R	CCTCCACCTCCAGCAGCATT		64.0°
HisI13_F	GTTTCTTTTTCTTTCATTTCAATCAATCTCTC	(ATT)6	59.3°
HisI13_R	TACTTCTTGCTCATATGTCTCT		57.6°
HisI14_F	GTTTCTTTTCGATTAGTGGTTCCTAT	(ATC)6	52.0°
HisI14_R	TGTATGTAGTCATATCTTTTG		53.3°
HisI15_F	GTTTCTTGAATTGTATTCGTCCATAATGATG	(GAA)6	59.7°
HisI15_R	TTCTTCTTTCTCTTTTCGTTT		61.1°
HisO1_F	GTTTCTTTGGGAAGTAGTTGGTTGATGATTTT	(AT)6	62.1°
HisO1_R	TTGATAGTTTCGAATGAATGACTTG		61.5°
HisO2_F	GTTTCTTTTGTGTTTTGTTTTGTTATTGT	(TG)7	59.2°
HisO2_R	TTTGTTTTCTTTCAGTGGCTT		60.7°
HisO3_F	GTTTCTTAAACCAGAGAAATATATGA	(AT)8	52.0°
HisO3_R	CGACAAAAGAAAGCACA		50.0°
HisO4_F	GTTTCTTTCATTTCCGCCTACACACAAC	(TG)8	63.9°
HisO4_R	AACATCGATCGACAAGAAAAA		62.4°
HisO5_F	GTTTCTTGATAGAAGAACAACAAATCAAGA	(TA)6	61.5°
HisO5_R	GAAGTAGGGAACGTAAGAAAAAG		63.1°
HisO8_F	GTTTCTTTTCTCGTCTATTTTTTCAGATTTTT	(TC)6	60.8°
HisO8_R	GTTTTTCATCCTCTGCTGTTTTTTG		62.7°
HspA1_F	GTTTCTTGCTTTTTGATGGTTGCTCATT	(TC)7	61.1°
HspA1_R	TTTTTCTCTTTTCATTTTCTTCTT		60.3°
HspA2_F	GTTTCTTTTGATCGATTAATGTTTATGTTT	(TA)6	58.1°
HspA2_R	TCTCTTGTTTTATTATCTTTATC		56.6°
HspA3_F	GTTTCTTCATCTTCCCTATTGTGCATTG	(GA)8	56.0°
HspA3_R	TTGTCAGTTGCTCTTTTCGC		56.0°
HspA5_F	GTTTCTTCTGCTTCATTTGTTCTGTTTTCT	(CTG)6	63.4°
HspA5_R	CTGCACGTTTCTTTTCGGC		62.0°
HspA9_F	GTTTCTTCTGCACGTTTTCTTTTCGGC	(AGG)6	62.0°
HspA9_R	TCTGCTTCATTTGTTCTGTTTTCT		63.4°
HspC1_F	GTTTCTTTCTTTTTCTTCTTTTACTTTCTTTT	(TC)6	61.3°
HspC1_R	TTTTGTTGTTCTTAATGTGCTGGG		62.7°
HspC2_F	GTTTCTTTTCTCGATGTTTATAATGC	(AT)8	50.0°
HspC2_R	AACGTTGTCTTTCTCGAT		50.0°
HspC6_F	GTTTCTTCAACAGCAATATCACAAACAACAAA	(GA)7	61.8°
HspC6_R	ACACCATTACCAAGAATAGACAG		60.0°
HspD1_F	GTTTCTTAAACGTAATAGTCGAGGTAATCTTC	(CT)6]	64.0°
HspD1_R	ACACGTTGGAAGAATACAAAATAG		62.0°
HspD2_F	GTTTCTTTGTCTGTCTCTTGACGTTT	(AT)6	56.0°
HspD2_R	GAATGAACCTGTTTTTATTTTTG		57.4°
HspD4_F	GTTTCTTCTTTAGCTCTCTATTTTCC	(TA)7	52.0°
HspD4_R	TTCTTTTGGATTGTTTGTC		50.0°
HspD5_F	GTTTCTTTCTTTTTCTTCTTTTACTTTCTTTT	(TC)6	61.3°
HspD5_R	TTTTGTTGTTCTTAATGTGCTGGG		62.7°
HspD7_F	GTTTCTTAGAAAGGATAATGAAATCGAGAGA	(TA)7	61.3°
HspD7_R	GAGTAGGATGTACTGATAGATTCC		59.6°

Name	Sequence (5'-3')		Tm
HisA1_F	GTTTCTTTTGTTCACTTTCACTTTTCT	(AT)10	58.8°C
HisA1_R	TTGTGTCTTATTGACTATTTTTCG		60.6°C
HisA2_F	GTTTCTTGCTCGTCGTTTGTTC	(AT)9	52.0°C
HisA2_R	CTTTTCTCTGTTATTTTGCT		52.0°C
HisA6_F	GTTTCTTTGTTACTGTTGTGCGAGT	(TC)11	61.3°C
HisA6_R	TTTGTTCATCATTCTTTATCGACT		62.4°C
HisA7_F	GTTTCTTCTCCGATTTGTTTGC	(AT)9	50.0°C
HisA7_R	TCGTTTTGTTTTCTTGCT		50.0°C
HisA9_F	GTTTCTTGTTAGCTTGAGTTTTGG	(TGC)7	58.0°C
HisA9_R	TGTTTTATGTTTTCTTTTCTTCT		60.0°C
HisA13_F	GTTTCTTTCGTTTCGTTTGTTTC	(TCA)7	56.0°C
HisA13_R	GGTAAAAGTAAATGATTTGT		56.1°C
HisE3_F	GTTTCTTTCATCTTGCAACTCTTATGTG	(TTC)6	59.1°C
HisE3_R	ACTTTCATTGCTATTCTATCTGT		59.4°C
HisE5_F	GTTTCTTGTTGCTGCTGCTGTTGTG	(TGA)9	56.0°C
HisE5_R	TGTTCGAGTGATATTAGTTG		54.0°C
HisE6_F	GTTTCTTTATCATGCTTTCATGACAAC	(ATGA)7	56.8°C
HisE6_R	GATTTTTCTGTTTCATTTTCAT		55.1°C
HisI5_F	GTTTCTTTCGCTCTATTTTCAGATTTTT	(TC)11	60.8°C
HisI5_R	GTTTTTCATCCTCTGCTGTTTTTG		62.7°C
HisI7_F	GTTTCTTTATGTATGCATTTTCTTTTC	(AT)11	55.7°C
HisI7_R	TTTGTTCATCTTGCTATGC		56.0°C
HisI9_F	GTTTCTTCTGCTGGTTTCGTTGAAT	(TA)9	56.0°C
HisI9_R	GAGTACAAATTTGCTGAGTT		54.0°C
HisI10_F	GTTTCTTGTATTGATATTTGCACTCC	(AAC)9	57.2°C
HisI10_R	CTCTATAAATATCTTCTCATTTTC		55.8°C
HisO9_F	GTTTCTTGTTGCAATTGATTGTTGGTGT	(GGT)6	56.0°C
HisO9_R	TGCTGCTGGTGGTGGTTTGT		58.0°C
HisO11_F	GTTTCTTTTTTCTTTTCTTATCTATTC	(TTC)8	54.2°C
HisO11_R	TCTCCCTCTCCCTTCTCT		56.0°C
HspA4_F	GTTTCTTCTGCTTTTAGTAAACTGTACTTT	(TCA)6	60.6°C
HspA4_R	TCCTCGTATTGGTGATCCGT		60.0°C
HspA6_F	GTTTCTTTGATCACTACCAACATCAAC	(CAA)7	56.0°C
HspA6_R	AAACGACCACCAACAGAAAA		56.0°C
HspA7_F	GTTTCTTTGATTGACAGCTCCATAGGGAAA	(ATG)6	62.7°C
HspA7_R	GTTTCGTGATGCTCTACTACTT		62.6°C
HspC4_F	GTTTCTTTTTTCTTTTCTATTGAAGGGG	(AT)11	59.8°C
HspC4_R	TCTCGTTTTCCATCACCATC		58.0°C
HspC5_F	GTTTCTTGATAAAGTAAGTGAAGAGGAGAG	(AT)9	61.2°C
HspC5_R	TGTTTTCCAGATGAACGATAATTA		61.6°C
HspD3_F	GTTTCTTCTCTTTTCTTCCATCAT	(TA)10	50.0°C
HspD3_R	TTTATTGTTTGCATCGTACA		52.0°C
HspD6_F	GTTTCTTATGGAGAGAAACGTATATACTGT	(TA)14	60.2°C
HspD6_R	GCAAGTGGATTAAGAAGAAAAAG		61.8°C
HspD8_F	GTTTCTTTTTTCTTTTCTATTGAAGGGG	(AT)9	59.8°C
HspD8_R	TCTCGTTTTCCATCACCATC		58.0°C
HspD9_F	GTTTCTTTCGAAATGGCATCAGGCCAA	(GTC)10	60.0°C
HspD9_R	TTTCCTAAATTACCAACATACAC		58.9°C
HspD10_F	GTTTCTAACGTAATAGTCGAGGTAATCTTC	(TC)26	64.0°C
HspD10_R	ACACGTTGGAAGAATACAAAATAG		62.0°C