

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Les rotifères bdelloïdes, extrêmo-tolérants, comme modèles pour la recherche spatiale
Quels sont les conséquences et les adaptations de la vie face aux environnements extrêmes ?

Rapport, Eloïse

Award date:
2022

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.



Université de Namur

Faculté des Sciences

**Les rotifères bdelloïdes, extrêmo-tolérants, comme modèles pour la
recherche spatiale : Quels sont les conséquences et les
adaptations de la vie face aux environnements extrêmes ?**

Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Effectué en Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Évolutive (URBE)
Sous la direction de Boris Hesseels et Karine Van Doninck

Eloïse Rapport
Janvier 2022

**Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES**

Une présentation Les rotifères bdelloïdes, extrêmotolérants, comme modèles pour la recherche spatiale : Quels sont les conséquences et les adaptations de la vie face aux environnements extrêmes ?

RAPPORT Eloïse

Résumé

Des modèles d'astrobiologie sont importants afin d'étudier la capacité de la vie à supporter des environnements extrêmes tels que l'espace et l'adaptation physiologique qui s'en suit. Des contremesures à ces défis pourrait éventuellement être trouvés pour protéger les astronautes de l'impact des rayonnements. Les rotifères bdelloïdes, faisant partie des candidats pour la recherche spatiale, sont des invertébrés microscopiques si adaptables qu'ils sont trouvés dans les environnements les plus extrêmes. Ces métazoaires sont caractérisés par leur capacité à tolérer différents types de stress tels que la dessiccation pour la plupart ou les irradiations. Dans la continuité de précédentes missions spatiales, différentes espèces de bdelloïdes seront envoyées dans l'espace pour y être exposé au vide spatial. Nous avons donc cherché à sélectionner les « meilleures » candidats pour ce prochain voyage. L'espèce étudiée durant ce mémoire a été *Habrotrocha atacama*. Il s'agit d'une espèce résistante à la dessiccation et vivant dans l'endroit le plus aride et le plus exposé aux UV : le désert d'Atacama. Sa radiorésistance, évaluée par son taux de survie et de reproduction, ainsi que sa capacité de réparation de l'ADN, évaluée par une électrophorèse en gel à champ pulsé (PFGE), ont été mesurés suite à une exposition aux rayonnements ionisants à faibles LET, comme les rayons X, et à haut LET, comme aux ions Fer et comparée à d'autres espèces. L'évaluation de l'impact de l'oxydation sur les rotifères créé par la radiation a également été exploré par l'analyse de l'accumulation de carbonylation des protéines. Une étude la réparation au sein des cellules germinales a été analysée par PFGE. En vue de cette future expérience d'astrobiologie, *H. atacama* a été exposé à des conditions spatiales simulées tels que le vide, les variations de température et les ultraviolets pour estimer leur persistance face la simulation de certaines composantes de l'environnement spatiales. L'objectif ultime de ces recherches est donc de mettre en évidence des organismes capable de résister à l'environnement spatial simulé sur Terre et les envoyer en orbite basse, lors des prochaines missions spatiales pour confronter nos hypothèses à la réalité spatiale.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2022

Promotrice : K. Van Doninck

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Karine Van Doninck, ma promotrice, de m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant et de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci également pour les conseils et remarques pour l'écriture de l'article et du mémoire.

Un tout grand merci à Boris Hespels, mon co-promoteur, de m'avoir accompagné et conseillé durant ces 10 mois de mémoire. Merci de m'avoir appris tant de chose sur les rotifères et d'avoir pris autant de temps pour que mon travail soit le plus complet possible. Merci également pour ses encouragements me poussant à m'améliorer.

Un grand merci également à Jérémy Berthe pour m'avoir épaulé et conseillé au cours de toutes les expériences réalisées. Et surtout merci également pour sa bonne humeur et sa gentillesse au quotidien. Un grand merci également à Victoria Moris pour son implication dans certaines de mes expériences et pour la réalisation des statistiques.

Merci aux scientifiques du LARN, Richard Coos et Sébastien Penninck de m'avoir respectivement aidé à la simulation des conditions spatiales et à la création de graphes. Je remercie également Rohan de m'avoir permis de réaliser l'expérience concernant les dommages oxydatifs.

Je remercie également les personnes de mon bureau, Martin , Cécile et Alexandre pour leur bonne humeur et leur soutien tout au long de cette année.

Enfin, un immense merci aux membres de ma famille qui ont toujours été là pour m'écouter et me conseiller. Merci pour de votre présence et de votre soutien au quotidien.

TABLE DES MATIERES

I. Introduction	8
1.1. Généralités	8
1.2. Caractéristiques morphologiques	8
1.3. Résistance à la dessiccation.....	10
1.4.1 Généralités	10
1.4.2 Mécanisme de résistance à l'anhydrobiose	11
1.4. Mode de reproduction des rotifères bdelloïdes : Une asexualité ancienne.....	12
1.5. Les rotifères bdelloïdes, un organisme modèle pour étudier la radiorésistance ?..	14
1.4.3 Généralités	14
1.5.1 Conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants	15
1.6. Un système de réparation de l'intégrité génomique	16
1.7. Résistance au stress oxydatif induit par les rayonnements ionisants	17
1.7.1 Les dommages oxydatifs	17
1.7.2 Un système anti-oxydatifs performant	18
1.8. Les enjeux de l'exposition à un environnement spatial	19
1.8.1 La place des rotifères dans l'étude de l'espace	19
1.8.2 Composition et risque de l'environnement spatial	19
1.8.3 Dosimétrie des rayonnements.....	20
1.9. Objectifs	21
II. Matériels et méthodes	23
2.1. Culture de rotifères bdelloïdes	23
2.2. Dessiccation et réhydratation	23
2.3. L'exposition aux rayons X	24
2.4. L'exposition aux ions lourds (Fer)	24
2.5. Taux de survie et capacité de reproduction	24
2.6. Statistiques et graphes	25
2.7. L'électrophorèse en gel à champ pulse ou <i>Pulse-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	26
2.8. Mise au vide et aux variations de température	27
2.9. Détection des groupements carbonyles des protéines	27

2.10. Élaboration d'un protocole pour l'isolation d'œufs au stade précoce	28
III. Résultats	30
3.1 Impact de l'exposition aux rayons X sur les rotifères bdelloïdes	30
3.2.1 Survie de l'espèce <i>R. rotatoria</i>, sensible à la dessiccation, face à 1000 Gy de RX mais impact important au niveau reproductif	30
3.1.2 Radiorésistance similaire au RX entre <i>H. atacama</i>, résistante à la dessiccation et isolé dans le désert de l'Atacama, et <i>A. vaga</i>	30
3.1.3 Cinétique de réparation similaire chez ces deux espèces après une irradiation aux RX de 800 Gy	31
3.2 Impact de l'exposition aux ions lourds tels que le Fer sur les rotifères bdelloïdes....	32
3.2.1 Survie et fertilité plus persistante face aux ions Fe chez les <i>H. atacama</i> par rapport aux <i>A. vaga</i>	32
3.2.2 Réparation rapide et similaire de l'intégrité génomique chez l'espèce <i>H. atacama</i> après une irradiation de 500 Gy aux ions Fer	33
3.3 Impact de l'exposition au vide, aux variations de température et optionnellement aux UVs sur les rotifères bdelloïdes	33
3.3.1 Survie des <i>H. atacama</i> et <i>A. vaga</i> dans un état desséché pendant 2 mois	34
3.3.2 Persistance de l'espèce <i>A. vaga</i> après 2 mois d'exposition au vide et aux variations de température	34
3.3.3 Capacité de reproduction maintenue après 2 mois d'exposition au vide et aux variations de température pour les deux espèces	35
3.3.4 Persistance de l'espèce <i>H. atacama</i> après un mois d'exposition au vide, aux variations de température et aux UVs	35
3.3.5 Capacité de reproduction maintenue pour les deux espèces <i>H. atacama</i> et d'<i>A. vaga</i>	36
3.4 Impact de l'irradiation aux rayons X : évaluation de la carbonylation des protéines.....	36
3.5 Dynamique spatio-temporelle de la réparation d'ADN au sein des cellules germinales	37
3.5.1 Hypothèses	37
3.5.2 Intégrité génomique des cellules germinales de l'espèce <i>A. vaga</i>	38
IV. Discussion et Perspectives	40
4.1 Radiorésistance des rotifères bdelloïdes aux rayons X.....	40
4.2 Mécanisme de réparation des cellules somatique des rotifères bdelloïdes aux rayons X	42
4.3 Mécanisme de réparation des cellules germinales de l'espèce <i>A. vaga</i> aux rayons X	42
4.4 Efficacité du système antioxydant	43
4.5 Radiorésistance de l'espèce <i>H. atacama</i> et <i>A. vaga</i> aux ions lourds tels que le Fe ...	44

4.6 Mécanisme de réparation de l'espèce <i>H. atacama</i> face aux ions lourds tels que le Fe.....	45
4.7 Radiorésistance de rotifères bdelloïdes face au vide, aux variations de température et alternativement aux UV.....	46
4.8 Tentative	47
4.9 Conclusion	48
V. Annexes	49
VI. Bibliographie	50

Mots-clés : Bdelloïdes ; Radiation ; Réparation de l'ADN ; PFGE ; Dommages à l'ADN.

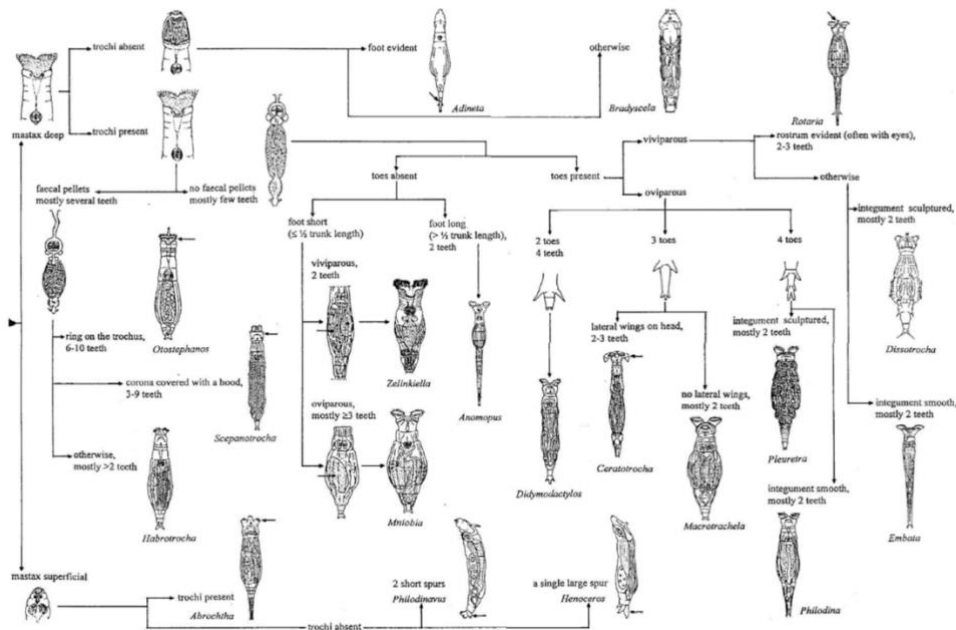


Figure 1 (Fontaneto 2001) : Les différentes morphologiques entre les genres de rotifères bdelloïdes.

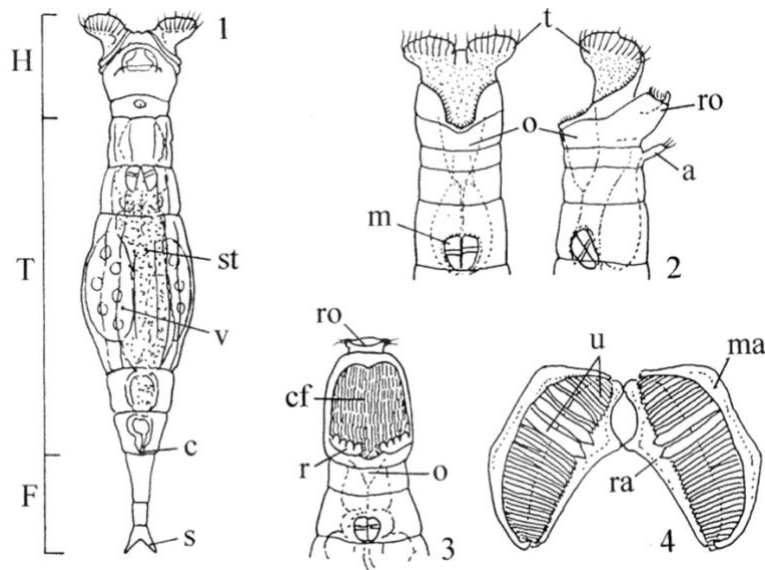


Figure 2 (Claudia Ricci and Melone 2000): Morphologie d'un rotifère bdelloïde. (1) Vue de dos de son anatomie. (2) Vue ventrale (gauche) et vue latérale (droite) de la tête et de la partie antérieure du tronc d'un *Philodina*. (3) Vue ventrale de la tête et de la partie antérieure du tronc d'un *Adineta*. (4) Trophi ramifié. H, tête ; T, tronc ; F, pied. A, antenne ; c, cloaque ; cf, champ cilié ; m, mastax ; ma, manubrium ; o, oesophage ; r, râteau ; ra, ramus ; ro, rostre ; s, éperons ; st, estomac ; u, uncus ; v, vitellarium.

I. Introduction

1.1 Généralités

Les rotifères sont parmi les plus petits animaux vivants sur Terre depuis plus de 40 millions d'années (Waggoner and Jr. 1993) et sont identifiés pour la première fois au 17^{ème} siècle par A. Van Leeuwenhoek (Dobell 1958). Ils tiennent leur nom de leur structure buccale particulière car le mouvement d'aspiration de la couronne ciliée rappelle celui d'une roue, « rota » (Wallace and Snell 2010). Ces organismes multicellulaires sont un phylum diversifié de métazoaires qui présentent une taille variant de 50 à 2000 μm . Leur embranchement se compose de plus de 2000 espèces réparties en trois clades principaux : Seisonides (3 espèces), Monogonontes (1570 espèces) et Bdelloïdes (461 espèces)(Segers 2007). Ces clades diffèrent de par leur morphologie mais également de par leur génétique et leur mode de reproduction. Les seisonides sont sexués, alors que les bdelloïdes sont asexués strictes et que les monogonontes sont des parthénogénétiques cycliques (alternant asexualité et sexualité).

Les rotifères bdelloïdes vivent dans différents milieux car ils sont ubiquitaires. Allant du milieu aquatique à terrestre, ils sont généralement trouvés dans les environnements limnoterrestres comme la mousse ou le lichen, occasionnellement dans les milieux marins comme les eaux douces et les milieux extrêmes comme les glaciers de l'Antarctique ou les plantes du désert d'Atacama (Rice and Friberg 2009)(Ricci 1987).

Le type de nutrition des rotifères est différent en fonction de l'espèce mais ils sont en général omnivores et se nourrissent majoritairement de microorganismes comme les bactéries, des algues, des spores de champignons ou encore des microdéchets (Kutikova 2003).

1.2 Caractéristiques morphologiques

Les caractéristiques morphologiques des rotifères varient en fonction des classes et des espèces (Fig. 1) mais la description dans ce travail est uniquement axée sur les bdelloïdes. Les rotifères bdelloïdes sont microscopiques avec une taille allant de 100 à 1000 μm mais certains possèdent une taille plus importante comme 1600 μm pour *Rotatoria neptunia* (Ricci and Melone 2000). Ils sont eutéliques ce qui signifie qu'ils possèdent un nombre fixe de cellules au moment de l'éclosion (ou de la délivrance pour les vivipares) du juvénile. Leur croissance se réalise ensuite par grossissement cellulaire (Ricci and Fascio 1995). Leurs tissus post-embryonnaires sont syncytiaux, c'est-à-dire sans membrane qui sépare les cellules individuelles. Il peut alors être observé de 900 à 1000 noyaux variant en fonction de l'espèce (Nogrady, Wallace, and Snell, 1993). Ces 1000 cellules (ou noyaux) sont répartis en cellules somatiques qui composent le corps et en germinales qui sont des cellules, au nombre approximatif de 30, spécialisées dans la transmission génétique. Leur tégument est souple et transparent (Paul de Beauchamps n.d.). La surface de certains rotifères est épaisse et rugueuse au niveau du tronc mais lisse et fine au niveau de la tête et du pied (Segers 2004).

Leur corps de symétrie bilatérale peut être subdivisé en trois régions corporelles (Fig.2.1). La tête possède des organes sensoriels et une couronne de cils impliquée dans la locomotion et la prise de nourriture qui peut être plutôt prolongée ou élargie. Par exemple, la couronne des Philodinida possède deux disques ciliés (Fig.2.2) alors que les Adinetida possèdent un champ cilié ventrale avec une partie rigide, le râteau (Fig.2.3). Les rotifères bdelloïdes possèdent également un rostre apical rétractable. Certaines espèces possèdent des yeux, visibles comme

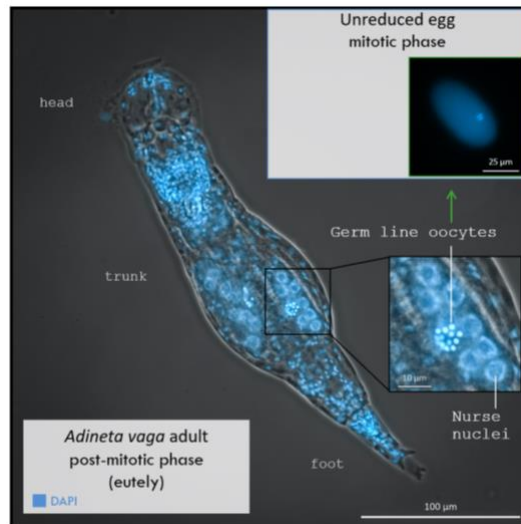


Figure 3 (Données non publiées : Terwagne et al, 2021) : Composition cellulaire d'un rotifère bdelloïde eutélique (*Adineta vaga*). L'ADN a été mis en évidence par une coloration au DAPI. Les cellules somatiques sont réparties entre la tête, le tronc et le pied. Les cellules germinales, contenues dans le germovitellarium, sont réparties en cellules nourricières et en oocytes.

des taches rougeâtres au niveau du cerveau ou dorsalement (Claudia Ricci and Fascio 1995). Le tronc est constitué d'autres organes qu'un appareil masticatoire musculaire appelé mastax qui contient des structures assimilées aux mâchoires appelées les trophi (Fig.2.4). Ces derniers sont organisés en une structure symétrique divisée en 3 parties : les manubria (difficile à détecter), les unci (dents larges / étroites) et médialement les rami (relient les deux moitiés). Le pied postérieur est effilé et se termine par deux appendices coniques rigides, les éperons. À l'intérieur de celui-ci, il y a des glandes adhésives qui leur permettent de se fixer au substrat, le plus souvent de manière temporaire (Gasiowski, Furu, and Hejnol 2019). Cependant, il n'y a pas de véritables segmentations entre ces différentes parties mais uniquement des plis transversaux (Segers 2004).

Le pseudocœlome contient au niveau du tronc la plupart des organes du système digestif et reproducteur qui occupe la majeure partie, mais aussi du système excréteur, musculaire et nerveux (Rice and Friberg 2009). Les rotifères ne possèdent pas de systèmes circulatoire ou respiratoire mais l'oxygène diffuse à travers la cuticule. L'élimination des déchets se fait par un système excréteur protonephridien trouvé aussi chez les plathelminthes qui consiste en deux réseaux latéraux de tubules. Elles sont disposées une de chaque côté le long de l'animal et s'ouvrent sur un cloaque représentant la vessie. Des cellules flammes permettent de filtrer les déchets et assurent à la fois l'excrétion et l'osmorégulation du milieu intérieur (Segers 2004).

Le système digestif commence par la prise de nourriture par la couronne ciliée qui crée des courants catalysant les nutriments. Le mastax qui broie les aliments renferme le trophi qui est divisé en sept types différents et sert d'identification de l'espèce. Il s'en suit un œsophage, l'estomac constitué de deux glandes gastriques, l'intestin et le cloaque qui débouche dorsalement au pied. Une fois digérées, les substances nutritives traversent la paroi de l'estomac et de l'intestin pour circuler dans le pseudocœlome qui est en contact avec toutes les cellules de l'animal (Pourriot and Francez 1986)(Verolet 2007). Leur déplacement est médié par le mouvement du rotifère et les contractions musculaires.

Le système musculaire se compose de fibres splanchniques (viscérales) et somatiques qui sont constituées de deux couches : la couche externe constituée d'anneaux circulaires séparés et la couche interne de muscles longitudinaux. Les anneaux entourent le tronc soit complètement soit incomplètement si les anneaux s'arrêtent ventralement. La couronne ciliée tourbillonnant et le rostre capable de se rétracter servent tous deux à la locomotion. Ils se déplacent généralement en faisant un mouvement de contraction-élongation de leur corps grâce à l'appui de leur pied mais certains sont plutôt nageurs (Leasi and Ricci 2010).

Le système nerveux n'est pas complexe. Il est constitué d'un seul ganglion cérébral situé dorsalement sous la couronne (« corona »), de quelques neurones éparpillés ainsi que des organes sensoriels tactiles et photosensibles (Nogrady, Wallace and Snell 1993)(Paul de Beauchamps n.d.).

Enfin, le système reproducteur des bdelloïdes contient une paire d'ovaires définie comme un germovitellarium syncytial (Bentfeld 1971) de par ces trois parties qui le composent (Fig. 3). Pour commencer, le germarium ou ovaire est constitué d'oocytes qui sont présents dès la naissance. Il est situé sur le bord interne du vitellarium auquel les oocytes sont reliés par un pont cytoplasmique réduit. Le vitellarium est la plus grande partie de la gonade et présente généralement un nombre de huit noyaux qui sont les plus grands noyaux de tout le corps et dont le nombre dépend de l'espèce.

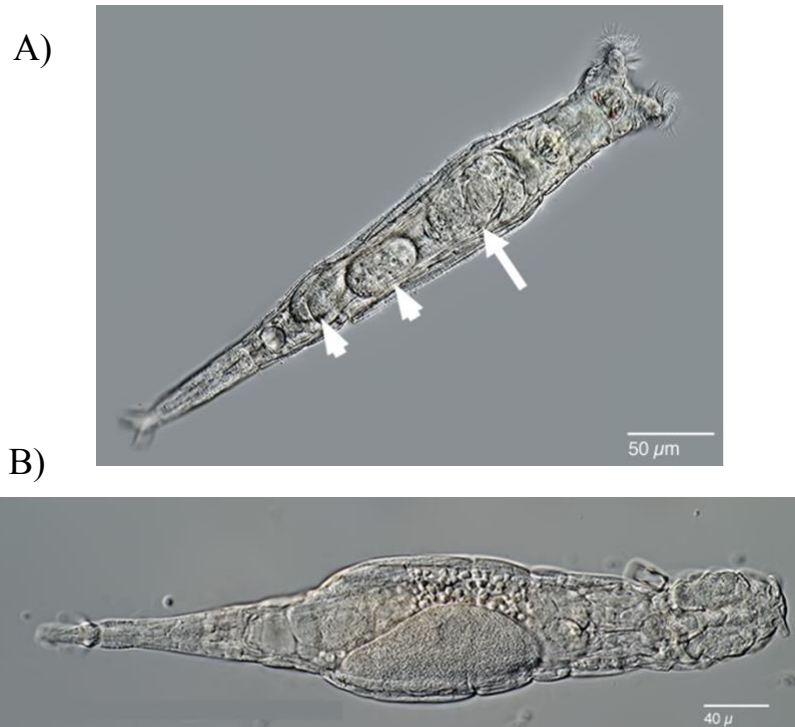


Figure 4 (plingfactory website): Morphologie de deux espèces de rotifères bdelloïdes. **(A)** *Rotaria rotatoria* gravide avec 3 descendants : deux ovocytes développés (têtes de flèches) et un embryon complètement développé (flèche). Ces individus sont vivipares. **(B)** *Adineta vaga* qui est ovipare. Les photos ont été prises par Michael Plewka (2020).

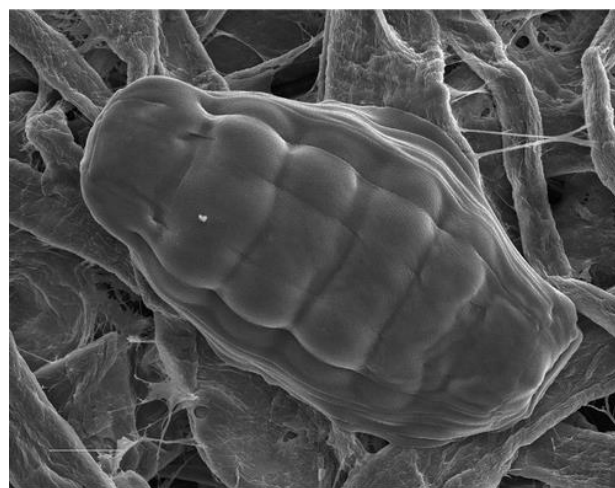


Figure 5 : (Ricci and Fonteneto 2009) Forme « Tun » d'un rotifère bdelloïde induite par une dessiccation et observée par microscopie électronique à balayage (Photo prise par Giulio Melone).

Les noyaux nutritifs ou « nurse cells » fournissent les réserves nutritives nécessaires au développement. Enfin, la fine couche folliculaire recouvre l'entièreté du germovitellarium sauf au niveau du pont cytoplasmique. Cette couche syncytiale doit être perméable aux substances dissoutes dans le fluide du pseudocoelome nécessaire à la croissance et au métabolisme normal. Un oviducte a été observé et part de la face interne du dos de la gonade. Les parties glandulaires sont visibles à côté de l'intestin chez les rotifères matures et reproducteurs. La formation d'œufs se réalise à partir d'oocytes primaires. Le stock d'oocytes est définitif à la naissance car il n'y a aucune division cellulaire dans l'ovaire (Amsellem and Ricci 1982).

La plupart des espèces sont ovipares, comme *Adineta vaga* (Fig. 4A), mais certains peuvent être vivipares, comme *Rotaria rotatoria* (Fig. 4B). Certaines espèces sont également ovovivipares comme *Adineta grandis*. La viviparité d'une espèce est observée par la présence de masses segmentées à l'intérieur du corps du rotifère (Ricci and Melone 2000). Les bdelloïdes ovipares pondent des œufs non segmentés. L'embryon ou l'œuf, une fois pondu, passe par une phase mitotique afin d'obtenir le nombre de cellules adéquates. Après cette phase de clivage, la gastrulation permet de réarranger les cellules pour établir le plan du corps. Ensuite, la différenciation des cellules spécialisées est permise lors d'organogenèse. La phase post-mitotique représentant alors l'adulte. Le développement des rotifères est assez rapide et dure de 1 à 5 jours (Ricci and Boschetti 2003).

1.3 Résistance à la dessiccation

1.4.1 Généralités

La plupart des espèces de rotifères bdelloïdes sont capables de résister à la dessiccation complète qui correspond à la suppression de l'eau dans le corps jusqu'à un niveau inférieur à 10 % de la masse de l'organisme desséché (Hespeels et al. 2014). Ces espèces peuvent subir ce dessèchement à n'importe quel stade de leur cycle de vie. Elles entrent alors dans un état d'anhydrobiose dans lequel elles sont métaboliquement inactives et peuvent subsister généralement des semaines et même des années (Kanazawa, Nanri, and Saigusa 2017). Ce manque d'eau provoque cet état de dormance, car les macromolécules ne sont plus protégées, ce qui empêche les réactions enzymatiques de se réaliser et par extension, le métabolisme (Hespeels et al. 2014). Ce mécanisme est réversible, car une fois réhydratées, elles reprennent leur forme active. Cette résistance leur permet de coloniser différents environnements avec une présence d'eau limitée ou momentanée. Les bdelloïdes ne sont pas les seuls animaux dotés de cette résistance à la dessiccation. Ce phénomène est également bien décrit chez les tardigrades et certaines espèces de nématodes (Alpert 2006).

Des ajustements morpho-physiologiques sont induits par la mise en quiescence des bdelloïdes. En effet, leur tête et leurs pieds se retirent dans le tronc et tassent l'intestin. Ce rétrécissement de leur corps en une forme compacte, appelé « tun » (Fig 5) (Marotta et al. 2010). La condensation des tissus et des cellules permettrait de diminuer la perte d'eau supplémentaire par évaporation (Hespeels et al. 2014). La morphologie en « tun » n'est pas uniquement observée en réponse à la dessiccation chez les bdelloïdes. En effet, un comportement similaire est observé lorsque les rotifères font face à un stress chimique ou physique comme l'augmentation ou la diminution rapide et importante de la température ou lors de jeûne. L'état de « tun » semble donc être associé à une réponse de défense (Ricci et al. 2003). Par exemple, cette capacité de dessiccation permet également aux rotifères bdelloïdes de survivre au gel, dans un état de crytobiose.

Bien que les bdelloïdes soient résistants à la dessiccation, celle-ci engendre un impact de leur intégrité génomique lors de périodes prolongées de dessèchement. Cet effet a été initialement observé chez la bactérie radio-résistante et résistante à la dessiccation *Deinococcus radiodurans* (Mattimore and Battista 1996). En 2014, Hespeels *et al* ont mis en évidence la présence de cassures doubles brins (ou « *doubles strand breaks* » ou DSB) provoquées par la dessiccation chez l'*A. vaga* qui augmentait avec le temps passé en état desséché. Néanmoins, les rotifères possèdent un système de réparation de ces cassures qui leur permettent de survivre à ce stress. La manière dont les rotifères desséchés évitent l'apoptose ou la nécrose qui suivraient la génération de cassures doubles brins restent encore inconnu (Hespeels et al. 2014).

Si la présence et l'accumulation de DNA DSB durant une période prolongée de dessiccation ont pu être mises en évidence chez *A. vaga*, la dessiccation devrait également être associée à d'autres types de dommages. Bien qu'aucune étude n'ait encore été réalisée, il est probable que la dessiccation soit également associée à la présence d'une perte des mécanismes qui maintiennent une concentration faible en ROS ainsi qu'une modification de la conformation des protéines qui peuvent alors s'agréger (Smolikova et al. 2021).

1.1.2 Mécanismes de résistance à l'anhydrobiose

Pour survivre à la dessiccation, les rotifères bdelloïdes devraient soit réparer les dommages soit préserver l'intégrité des molécules (protéines et ADN) à l'aide de sucres et d'antioxydants (França, Panek, and Eleutherio 2007). Ce mécanisme de résistance à la dessiccation était généralement associé à la présence de tréhalose, un disaccharide non réducteur, que l'on considérait comme la molécule universelle préservant les cellules du dessèchement. Celui-ci servirait à remplacer l'eau en agissant comme un stabilisateur thermodynamique et cinétique des molécules et des membranes (Crowe, Carpenter, and Crowe 1998). Pour donner un exemple de son utilisation, les nématodes *Aphelenchus* produisent 10 à 15 % de son poids séché de tréhalose ce qui est lié à la résistance au dessèchement (Madin and Crowe 1975).

Cependant, avant que la tolérance à la dessiccation ne soit atteinte, le taux de tréhalose était déjà maximal. De même, les faibles taux de tréhalose trouvés chez les plantes ou certains animaux suggéreraient que d'autres adaptations sont nécessaires pour la tolérance à la dessiccation. Pour les rotifères bdelloïdes, certains gènes du métabolisme du tréhalose ont été mis en évidence, mais la présence de tréhalose n'a pas été observée. Il ne peut être exclu qu'au même titre que les plantes, les bdelloïdes produisent une très faible quantité qui remplirait un rôle de signalisation dans les changements métaboliques (Hespeels et al. 2015).

Pour démontrer que le tréhalose n'était pas suffisant pour conférer cette résistance, certains ont introduit le tréhalose dans des cellules de mammifères, mais cela n'a eu qu'un succès limité. Il semble alors exister diverses stratégies pour mener cette tolérance à l'anhydrobiose (Lapinski and Tunnacliffe 2003).

De nouveau chez les nématodes (Browne, Tunnacliffe, and Burnell 2002), il a été observé une induction élevée de protéines hydrophiles comme les protéines LEA (late embryogenesis abundant) lors de stress hydrique. Une inactivation des gènes codants induit une diminution de la résistance à la dessiccation chez *Deinococcus radiodurans*, une bactérie anhydrobiotique (Battista, Park, and McLemore 2001). Découverte dans les premiers stades du développement embryonnaire des graines de coton (Dure, Greenway, and Galau 1981), la structure primaire de cette protéine indique qu'elles sont stables dans une grande échelle de température. Les LEA sont répandues puisqu'elles sont trouvées au sein du règne végétal (mousse, algues...) mais aussi dans d'autres organismes comme les bactéries ou encore les crevettes (Kijak and Ratajczak 2020). Des études basées sur les graines de plantes ont mis en évidence leur rôle de

chaperonne durant la déshydratation, c'est-à-dire qu'elles peuvent interagir avec des protéines endommagées ou mal repliées et stabiliser leur structure. En séquestrant les composés ioniques qui s'accumulent durant la dessiccation, les LEA protègent les protéines membranaires et les enzymes de la dégradation qui est due à une concentration en sel importante. Leur structure aléatoire est ainsi remodelée pour donner des structures avec plus d'hélice α amphiphile qui améliore la liaison avec les molécules telles que les protéines ou l'ADN (Smolikova et al. 2021). Malgré la connaissance de leur mode d'action, la connaissance de leur fonction dans un environnement cellulaire reste inconnue. Les protéines LEA ont été identifiées chez les rotifères bdelloïdes dans l'ensemble de gènes activés par la dessiccation (Tripathi et al. 2012).

Les plantes sont donc de bons modèles pour étudier la base moléculaire permettant de résister à la déshydratation. Le mécanisme de cette tolérance serait associé à l'accumulation de protéines LEA, d'antioxydants, d'oligosaccharides non réducteurs éventuels et enfin de protéines de choc thermique (sHSP)(Denekamp et al. 2009). Les régulateurs de la tolérance sont, d'une part, l'acide abscissique (ABA) étant donné que les promoteurs des gènes codants pour les LEA contiennent des éléments sensibles à l'ABA et, d'autre part, la protéine DOG1 qui agissent sur un réseau de facteurs de transcription. L'induction du système HSP correspond à une réponse aux facteurs de stress. Les HSP sont réparties en cinq familles selon leur poids. Les petites HSP (sHSP) sont caractérisées par un domaine α -cristallin en C-terminal très conservé. Elles favoriseraient le repliement des protéines qui viennent d'être synthétisées et des polypeptides avec une structure endommagée, et engendreraient une protection antioxydante. En condition de stress, elles sont capables de former de grands complexes oligomériques qui peuvent atteindre 5000 kDa et ceux-ci posséderaient l'activité de chaperonne. Au sein des graines des plantes, la régulation épigénétique joue également un rôle dans la formation d'une tolérance à la dessiccation (Smolikova et al. 2021).

Bien que certains gènes associés à cette tolérance ont été identifiés, les mécanismes qui contrôlent cette tolérance sont peu connus. Certaines espèces de rotifères bdelloïdes n'ont pas les mêmes capacités de résistance à l'anhydrobiose ce qui indique que d'autres conditions moléculaires ou génétiques seraient nécessaires (Hespeels et al. 2014).

1.4 Mode de reproduction des rotifères bdelloïdes : Une asexualité ancienne

Les rotifères bdelloïdes éveillent l'intérêt de nombreux chercheurs depuis qu'ils ont été découverts. En effet, aucun mâle ou hermaphrodite n'a été observé jusqu'à présent (Birky 2010). Pendant longtemps, il a alors été établi que les rotifères bdelloïdes se reproduisaient de manière asexuée (Davis 1873) par un mécanisme de parthénogenèse. Il s'agit du développement d'un embryon à partir d'une gamète femelle sans contribution d'un gamète mâle. Ce processus induit la génération d'une descendance venant d'un œuf non fertilisé (Lampert 2008). La parthénogenèse décrite pour les bdelloïdes s'effectue par une ovogenèse mitotique (apomictique) donnant lieu à des clones définis (Siang Hsu 1956). Ils ont alors été considérés comme un scandale évolutif (Maynard Smith 1986) car les animaux utilisant ce type de reproduction purement clonale ne parviennent généralement pas à constituer des « espèces », c'est-à-dire des organismes morphologiquement et écologiquement différents classés dans différents genres, voire familles (Schwander 2016). Or, les rotifères bdelloïdes présentent une diversification d'espèces importantes ainsi qu'une persistance à travers le temps malgré l'absence de recombinaison génétique.

Flot *et al* (2013) démontraient l'assemblage d'une structure génomique incompatible avec la méiose conventionnelle chez *A. vaga*. Les auteurs semblaient confirmer les précédentes

observations selon lesquelles la production d'œufs s'effectuerait par deux divisions de maturation, toutes deux équationnelles, sans réduction du nombre de chromosomes ni indication d'appariement des chromosomes (Hsu 1956). Cependant, en 2021, Simion, P. et al ont publié un assemblage du rotifère *A.vaga* à l'échelle des chromosomes qui montraient une compatibilité avec la méiose. En effet, elle a été envisagée par la présence de chromosomes homologues, paires de chromosomes associés durant une méiose. Ces résultats d'assemblage ont été confirmés par hybridation in situ. La découverte de chromosomes homologues ouvrait la possibilité d'une recombinaison homologue. Cette recombinaison aurait comme conséquence la perte d'hétérozygotie et se produirait soit lors de la réparation mitotique des cassures doubles brins, soit lors de l'appariement méiotique. Il reste donc à savoir si la recombinaison des bdelloïde est due à leur mode de reproduction ou dirigée par des processus de leur résistance à la dessiccation induits par la réparation de l'ADN ou au deux.

Les bdelloïdes ont donc été définis comme scandaleux sans présence de recombinaison et de méiose, c'est-à-dire dans un contexte apomictique. Néanmoins, Simion *et al* 2021 ont émis l'hypothèse qu'ils se reproduiraient par parthénogenèse automictique compatible avec une méiose modifiée qui permettrait une recombinaison. Il s'agit d'un mode de reproduction parthénogénétique dans lequel les chromosomes homologues ou les chromatides sœurs ne sont pas ségrégués lors de la division méiotique. Des données cytologiques obtenues par l'équipe du Prof. K. Van Doninck (Données non publiées) confirmeraient cette parthénogenèse automictique avec les chromosomes homologues qui ne se séparent pas en deux cellules durant la méiose I. Cette parthénogenèse a déjà été retrouvée dans d'autres métazoaires comme *Apis mellifera capensis* (Goudie and Oldroyd 2014) ou *Daphnia magna* (Svendsen et al 2015).

L'acquisition d'ADN externe dans l'évolution des rotifères bdelloïdes reste énigmatique puisqu'aucun mâle n'a été observé. Néanmoins 8 à 10 % de gènes d'origine non-métazoaire (Simion et al. 2021) ont été confirmés dans le génome de *A.vaga* obtenu par transferts horizontaux de gènes (HGT), constaté ultérieurement (Flot et al. 2013) (Gladyshev, Meselson, and Arkhipova 2008). Il s'agit du processus par lequel un organisme intègre le matériel génétique d'un autre organisme sans en être le descendant. Les régions subtélomériques sont enrichies en HGT, mais on en trouve également le long des chromosomes (Simion et al. 2021). Les mécanismes moléculaires exacts de ces transferts ne sont pas connus. Certaines hypothèses précisent qu'ils résulteraient des événements de dessiccation subis par les rotifères puisque l'ADN serait intégré lors de la réparation des cassures pendant de la réhydratation (Hespeels et al. 2014). Cela serait rendu possible, car la dessiccation induit une perturbation de l'intégrité des membranes permettant à l'ADN étranger de s'intégrer dans la lignée germinale après avoir été transféré de l'intestin aux oocytes (Boschetti et al. 2012).

Il reste encore à savoir si les signatures d'échanges alléliques entre rotifères bdelloïdes, découvertes par différentes études (REFs), se font par reproduction sexuée ou par transferts horizontaux. Cependant, ces signatures de recombinaison sont compatibles avec trois hypothèses qui expliqueraient le partage d'allèles : le partage d'allèles rapporté pourrait être dû à une contamination, ou résulter d'une sexualité facultative comme la parthénogenèse cyclique dont les mâles ou la fécondation n'auraient jamais pu être observés ou être dû au transfert horizontal de gènes entre les individus bdelloïdes (Simion et al. 2021).

Jusqu'ici, on peut confirmer que les chromosomes homologues sont présents chez les rotifères bdelloïdes et que les changements d'hétérozygotie entre les échantillons démontrent la présence de recombinaison homologue suggérant un appariement des chromosomes homologues.

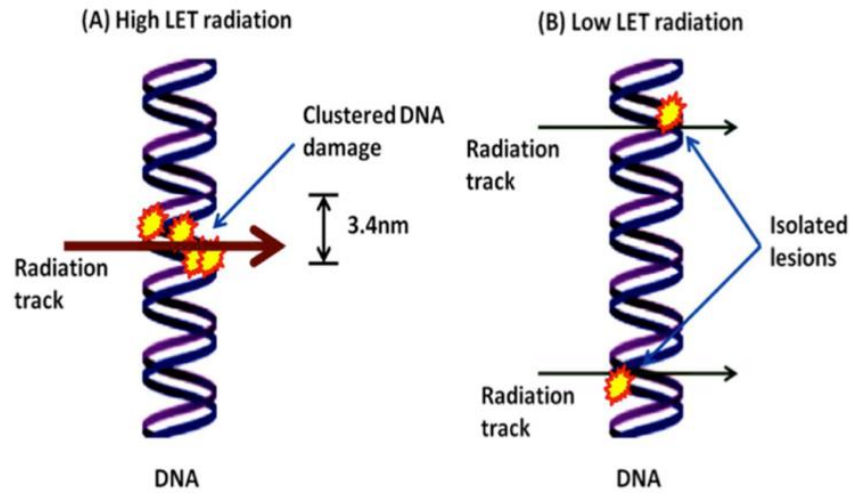


Figure 6 (Zhu et al. 2021): Création de dommages à l'ADN par les rayonnements ionisants. (A) Radiation à LET élevé (dense) qui induit des dommages à l'ADN dans une zone restreinte de quelques nm. (B) Radiation à LET faible (éparpillée) qui induit des dommages dans un zone plus importante.

Ils sont alors présentés comme d'anciens scandales asexués au même titre que les acariens oribatides (Heethoff et al. 2009) ou les ostracodes darwinulides (Schön, Rossetti, and Martens 2009) qui auraient également persisté sans reproduction sexuée. Les bdelloïdes sont considérés comme tels, car ces résultats mettent en avant l'importance de la méiose et de la recombinaison dans la garantie d'une évolution à long terme d'une lignée.

1.5 Les rotifères bdelloïdes, un organisme modèle pour étudier la radiorésistance ?

1.5.1 Généralités

En 2008, deux espèces de bdelloïdes, *Adineta vaga* et *Philodina roseola* ont été décrites comme résistantes à des doses extrêmes de rayonnement ionisant (ou IR) (Gladyshev and Meselson 2008). Classiquement, on considère qu'une cellule humaine résiste à des doses de ± 6 Gy mais cette radiorésistance varie en fonction du type cellulaire. La sensibilité à la radiation est en corrélation avec le taux de prolifération cellulaire. Par exemple, les cellules hématopoïétiques, dont le taux de division est élevé, sont caractérisées par une radiorésistance plus faible que les cellules reproductrices. Ces cellules sont donc altérées à des doses modérées (1-7 Gy). (Moreels et al. 2020).

En comparaison, il a été mis en évidence que *A. vaga* était capable de survivre à des doses pouvant atteindre 7500 Gy (= Gray ; dose absorbée) de rayons X (ou RX), une des résistances les plus élevées pour un animal (Hespeels et al. 2020). En comparaison, des insectes tolérants tels que la drosophile ou la guêpe parasitoïde peuvent supporter des doses respectives de 1000 Gy (Vaiserman, Cuttler, and Socol 2021) et 1 800 Gy (Tilton and Brower 1983) de rayons X.

Les rayonnements ionisants, que les rotifères bdelloïdes tolèrent, correspondent à un transfert d'énergie libérée par les atomes qui se propage par le biais d'ondes électromagnétiques (comme les rayons X) ou de particules (comme les neutrons). S'ils présentent une énergie suffisante, ils peuvent induire une ionisation des atomes de la matière qu'ils traversent. Le degré d'ionisation de ces rayonnements est différent en fonction du transfert d'énergie linéaire (LET) qui représente la quantité d'énergie déposée (KeV) par unité de longueur (1 μm). Les rayons X sont des rayonnements ionisants à faible LET caractérisés par une ionisation dispersée. À l'inverse, les particules à hauts numéros atomiques (Z), comme les ions Fe, sont des particules à haut LET puisque les ionisations produites au niveau de l'ADN sont rapprochées (Hagiwara et al. 2019). La réponse biologique est liée à la distance entre les événements de dépôts d'énergie (Fig. 6).

Les rotifères bdelloïdes sont capables de survivre et de se reproduire suite à une exposition aux rayonnements faible LET mais également au LET élevé. Les individus appartenant à l'espèce *A. vaga* sont capables de survivre à des doses variant entre 5000 et 7500 Gy aussi bien pour une exposition aux rayons X qu'aux protons 4 MeV. À la suite de l'étude de l'exposition aux particules de Fe de 0,5 GeV, la survie a été observée jusqu'à une dose de 3000 Gy, la plus haute dose testée. Le pourcentage de survie à ces doses est plus élevé suite à l'exposition aux faibles LET (82,7 % de rayons X SD $\pm 11,4$) par rapport aux hauts LET (19,1 % de protons SD $\pm 34,1$) (Hespeels et al. 2020).

La capacité de reproduction des êtres vivants est également affectée par une exposition aux radiations. La stérilité survient à des doses plus faibles de rayonnements. Cela est probablement dû à la plus faible tolérance des cellules germinales à tolérer des cassures d'ADN lors de la division cellulaire. La reproduction est impactée en fonction du type de radiation et est plus

sévèrement touchée suite à une exposition au LET élevé (Hespeels et al. 2020). Effectivement, ils ont été stérilisés par des doses de 750, 1 000 et 2 000 Gy pour les rayonnements aux Protons, Fe et aux rayons X respectivement. En comparaison avec les autres clades de rotifères, il faut une dose 5 fois supérieure à celle imposée aux monogonontes pour rendre les bdelloïdes stériles. Une telle résistance est donc associée au clade bdelloïdes (Gladyshev and Meselson 2008). Les doses à fournir pour empêcher la reproduction divergent en fonction des organismes. Parmi les arthropodes mâles, la dose stérilisante est de 200 Gy pour l'espèce la plus radio-résistante qui est le lépidoptère *Spilosoma obliqua* (Bakri et al. 2005). L'invertébré *Caenorhabditis elegans* est stérile suite à une dose de 30 Gy (Hartman and Herman 1982). Concernant les animaux anhydrobiotiques, les tardigrades sont stériles aux doses testées de 1000 Gy (Jönsson, Harms-Ringdahl, and Torudd 2005).

1.5.2 Conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants

Une liste complète et détaillée de l'ensemble des dommages induits par les différents IR ne sera pas dressée ici. Cependant, il a été constaté que les rayonnements interagissent avec des molécules biologiques telles que l'ADN ou les protéines, soit directement, par ionisation des bases et du 2-désoxyribose, soit indirectement, par la création d'espèces réactives de l'oxygène (Cortese et al. 2018). Toutes sortes de dommages peuvent être induits par les radiations : cassures doubles brins de l'ADN - cassures simple brin - délétions de bases - dommages oxydatifs à l'ADN - dommages aux membranes cellulaires et aux protéines. Les faibles LET ont tendance à engendrer des oxydations de l'ADN et des cassures simples brins alors que les hauts LET induisent principalement des cassures doubles brins. Il est important de préciser que les rayons X sont également capables d'engendrer des cassures doubles brins (Havránková 2020).

Il est donc probable que la capacité des bdelloïdes à rester fertiles, mais aussi à survivre à la suite de cassures d'ADN et d'autres dommages reflète un système qui répare ces dommages et qui protège les systèmes de réparation. Les rotifères réhydratés sont bien capables de réassembler les grands fragments d'ADN ce qui sous-tend la présence d'un mécanisme de réparation de l'ADN utilisé à n'importe quel stade de leur vie (Latta, Tucker, and Haney 2019). Concernant les dommages oxydatifs, il a été montré que l'*A. vaga* présente un taux plus faible de carbonylation des protéines suite à une irradiation que le nématode *C. elegans* (Krisiko et al. 2012). Ils se protégeraient de ces dommages grâce à un système efficace d'antioxydant.

Certaines études telles que celle de Gladyshev et Meselson (2008) soutiennent que cette importante résistance aux irradiations serait la conséquence d'une adaptation à la dessiccation qui induit des cassures doubles brins qui sont réparés par les rotifères. Une étude réalisée sur les bactéries pourrait confirmer l'hypothèse d'une adaptation, car ils ont observé que des mutations diminuant la résistance aux rayonnements diminuent également la tolérance à la dessiccation (Mattimore and Battista 1996). Cependant, cette hypothèse est discutée, car en étudiant les rotifères bdelloïdes, nous nous apercevons que ce n'est pas si simple. Certaines espèces sont résistantes à la dessiccation et radiosensibles alors que d'autres sont sensibles à la dessiccation mais radiorésistantes. Serait-ce réellement une adaptation ? Cette interrogation sera analysée par la suite. Mais il n'en reste pas moins que certaines espèces de rotifères bdelloïdes possèdent la radiorésistance la plus importante pour un animal.

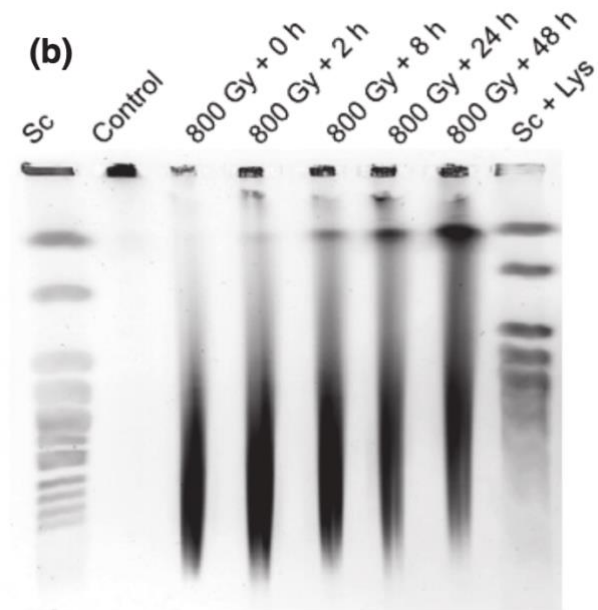


Figure 7 (Hespeels et al 2014) : Cinétique de réparation de l'ADN de l'espèce *A. vava* réhydraté après différent période de temps. La première et dernière voie correspondent aux chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* respectivement avec et sans tampon de lyse. Le contrôle correspond à 1000 individus *A. vava* hydratés. La troisième voie correspond aux individus desséchés et irradiés à 800 Gy. Les autres voies correspondent à des individus irradiés et réhydratés après 2h, 8h, 24h et 48h.

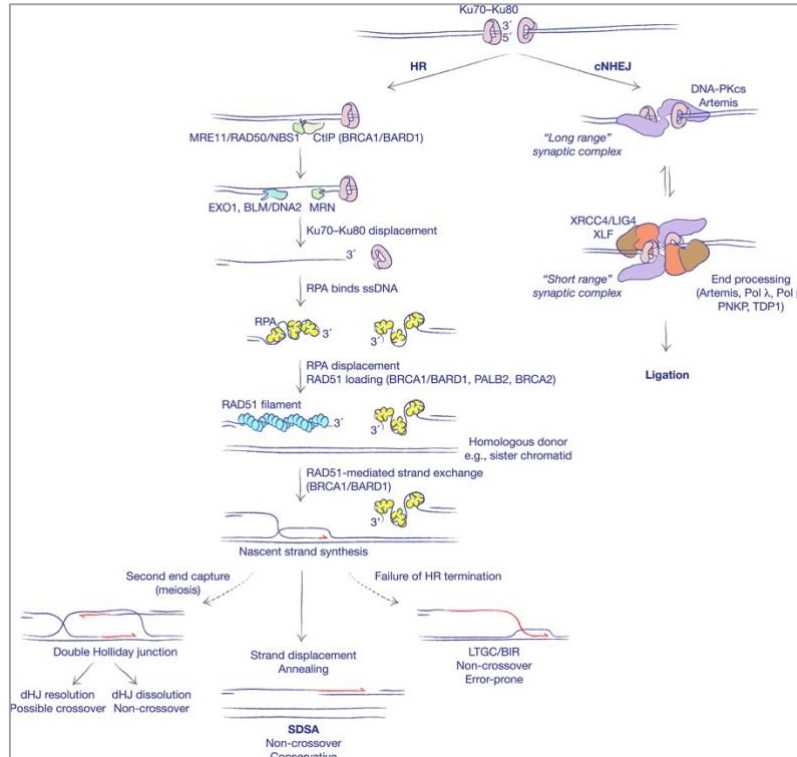


Figure 8 (Scully et al, 2020): Deux voies de réparation des cassures doubles brins. cNHEJ, classical non-homologous end joining (ou jonction des extrémités non homologues); HR, homologous recombinaison (ou recombinaison homologue).

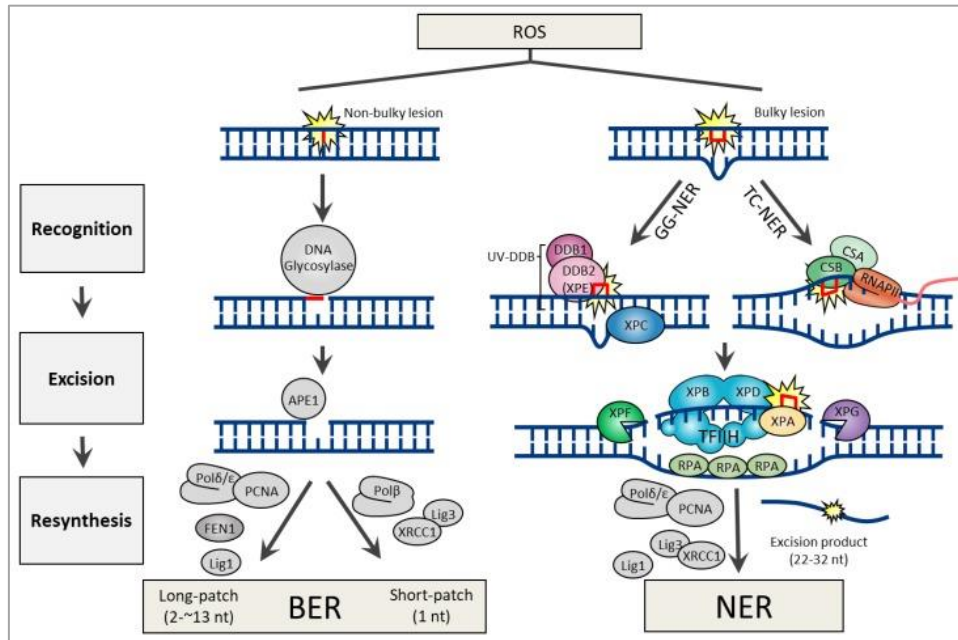


Figure 9 (Lee and Kang 2019): Deux voies de réparation par excision de l'ADN au niveau de lésion volumineuse ou non engendrées par des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS).

1.6 Un système de réparation de l'intégrité génomique

Les rotifères bdelloïdes peuvent résister à la dessiccation et tolérer de fortes doses de radiations grâce en partie à leur capacité à réparer les lésions génomiques. L'électrophorèse de gel à champ pulsé (ou « *Pulse Field Gel Electrophoresis* » ou PFGE) permet d'analyser les fragments d'ADN obtenu par cassures doubles brins à la suite de ces stress. Grâce à cette technique, Hespeels et al (2014) ont observé une diminution des fragments génomiques de petites tailles au profit de la réapparition de fragments de plus grande taille (Fig 7). Ces données suggéraient un mécanisme de réparation qui consisterait à réparer les différents fragments d'ADN au sein des cellules somatiques des rotifères bdelloïdes.

Cette réparation n'est pas active pendant la dessiccation, car le métabolisme est suspendu, mais est activée dans les heures suivant la réhydratation des individus suite à la réactivation des systèmes enzymatiques. Cette réparation est progressive, car plus le temps passé à l'état réhydraté augmente, plus les fragments de taille moins importante diminuent (Hespeels et al. 2014). Un processus de réparation est observé durant les 24 premières heures après réhydratation. Passé ce timing, la réduction du nombre de petits fragments n'est plus observée. En dépit d'un processus de réparation, il a néanmoins été observé qu'une partie de l'intégrité du génome n'était pas restaurée dans la lignée d'individus desséchés et/ou irradiée (Fig 7). En effet, une perte de l'intégrité du génome est toujours observée après une semaine de l'activation du mécanisme de réparation (Hespeels et al. 2020). L'interprétation de ces résultats est aujourd'hui encore soumise à différentes hypothèses. De plus, la technique de PFGE n'est pas capable de discriminer les processus de réparation entre les cellules somatiques et germinales. Si des DSBs peuvent ne pas être réparées dans les cellules somatiques, il semble peu probable que cela puisse être le cas des cellules germinales qui devront assurer le développement embryonnaire et de nombreuses divisions cellulaires.

Le mécanisme utilisé pour réassembler le génome fragmenté chez les rotifères bdelloïdes n'est pas totalement connu. En s'intéressant aux mécanismes universels et aux différents acteurs fonctionnels typiques de toutes les cellules eucaryotes, plusieurs voies de réparation de l'ADN sont étudiées dont les deux plus importantes impliquées dans la réparation des cassures doubles brins (Fig 8): la recombinaison homologue (HR) et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ). D'une part, HR est un système fidèle qui utilise un modèle homologue pour réparer la cassure au cours duquel, le complexe NBS1-RAD50-MRE11 permet la résection de l'ADN alors que RPA maintient l'ADN en simple brin. BRCA1/2 recrute RAD51 qui scanne l'ADN pour trouver des séquences homologues pour s'y appairer. L'ADN est synthétisé par une polymérase et la résolution des brins est faite par des résolvases (Wright, Shah, and Heyer 2018). D'autre part, NHEJ est un système moins fiable qui joint deux extrémités d'ADN avec une référence minimale à la séquence d'ADN mais robuste et flexible. La détection des cassures se fait par Ku70-Ku80 qui recrute la DNA-PKcs qui recrute à son tour d'autres protéines de réparation comme Artemis ou encore XRCC4 (Dueva and Iliakis 2013). L'ADN polymérase lambda (Pol λ) est enfin utilisé pour synthétiser l'ADN.

Deux autres voies de réparation sont également explorées et réparent d'autres types de dommages (Fig 9). Premièrement, la réparation par excision des bases (BER) a comme caractéristique d'éliminer les petits dommages de bases causées par l'oxydation, l'alkylation, la désamination ou encore la perte de bases. L'ADN est de nouveau synthétisé par l'ADN polymérase bêta (Pol β). Enfin, la réparation par excision de nucléotides (NER) reconnaît et élimine les lésions plus volumineuses formant des hélices (Hecox-Lea and Mark Welch 2018).

La plupart des acteurs cités ci-dessus présentent une homologie de séquence avec *l'A. vaga*. Une prolifération du nombre de gènes de NHEJ et de BER par rapport aux gènes HR a été mise en évidence et leur régulation suite une irradiation ou une dessiccation a été augmenté par rapport aux autres voies de réparation qui était également induite. Cette observation n'est pas étonnante puisque certaines enzymes de ces deux mécanismes s'occupent de réparer principalement les bases endommagées et l'ADN cassé par l'oxydation. Des études fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer le rôle de ces candidats potentiels. Il reste indispensable de caractériser les dommages des bdelloïdes et la capacité de ces derniers à pouvoir les réparer ou pas (Hecox-Lea and Mark Welch 2018).

Le réassemblage des fragments observé par PFGE illustre la réparation des dommages au sein des cellules somatiques. En effet, un rotifère possède 1000 cellules somatiques contre <30 cellules germinales qui ne sont donc pas détectées. Nous observons que les cellules somatiques activent rapidement la réparation, mais ne récupèrent pas entièrement l'intégrité génomique. Cette réparation limitée est tolérée au vu du maintien de la survie de ces individus eutéliques dans lesquelles les cellules somatiques ne se divisent plus. Concernant la lignée germinale, aucune information n'est alors obtenue (Hespeels et al. 2014). Cependant, l'étude de Gladyshev & Arkhipova (2010) a tout de même démontré que l'ADN des oocytes est impacté par l'irradiation, car ils ont observé la perte d'une copie d'un transposon (Avmar1) au cours des multiples générations concluant à la présence de cassures doubles brins. Ces cassures doivent être réparées pour permettre la transmission correcte du génome, sans perte de gènes importants, et éviter une instabilité génomique qui peut conduire à la mort cellulaire.

Des études récentes dans l'équipe du Prof. K. Van Doninck (Données non publiées : M.Terwagne et al, 2021) ont également montré que cette réparation de l'ADN est différente au sein des cellules germinales et somatiques. Dans une mère irradiée, ils ont observé par fluorescence que les cellules somatiques synthétisaient de l'ADN au contraire des cellules germinales. Cette observation est due à un retard dans le temps de la réparation au sein des cellules germinales, réparation qui a lieu à un stade spécifique de la méiose lors de l'oogénèse. Pour que l'œuf pondu possède une structure génomique comparable à la mère, ce qui a été observé ultérieurement, ils supposent que les cellules germinales utilisent un système de réparation fiable.

1.7 Résistance au stress oxydatif induit par les rayonnements ionisants

1.7.1 Les dommages oxydatifs

L'exposition aux radiations et à la dessiccation induit également des dommages oxydatifs importants auxquels doivent faire face les rotifères. Le manque d'eau et l'arrêt du métabolisme provoqué par la dessiccation pourraient altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire et induire la réduction partielle de l'oxygène (Senaratna et McKersie, 1986). De même, les rayonnements ionisants engendrent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (« *Reactive Oxygen Species* » ou ROS) par radiolyse de l'eau (Gusev et al. 2010).

Un stress oxydatif se produit lorsque la quantité de ROS est anormalement élevée. Le radical anionique superoxyde (O_2^-) représente le type primaire de ROS qui peut être converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à son tour converti pour donner le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ils peuvent réagir avec presque toutes les molécules biologiques, tels que les lipides, l'ADN et les protéines. L'accumulation de ROS entraîne une augmentation de la peroxydation des lipides, qui peut conduire à la destruction des membranes cellulaires. Elle induit également l'oxydation

des protéines qui peut, par exemple, engendrer la formation de groupements hydroxyles et carbonyles, et des dommages indirects à l'ADN, tel que le 8-oxo-2-deoxyguanosine (8OxoDG). Les lésions d'ADN rapprochées peuvent conduire à des cassures de brin, une étape tardive des dommages oxydatifs. (Smolikova et al. 2021). En effet, certains dommages aux protéines peuvent engendrer la destruction cellulaire même avant la production de dommages significatifs à l'ADN chez les espèces hautement radiosensibles, comme la bactérie *S. oneidensis* (Qiu et al, 2006).

Dans des conditions normales, sans stress, un ensemble d'antioxydants et de capteurs de radicaux libres détoxifie les ROS. Cependant, lorsqu'une accumulation de ROS est engendrée par des radiations et/ou dessiccation, l'activité du système peut être dépassée et n'est plus capable de les neutraliser. Ainsi, le stress oxydatif se développe en inactivant des enzymes, en dégradant des protéines, ... (Smolikova et al. 2021)

1.7.2 Un système anti-oxydatif performant

La capacité des rotifères bdelloïdes à réparer leur ADN à la suite de stress telle que les irradiations et la dessiccation a été mise en évidence précédemment, mais également, suite à ces deux stress, une surproduction de ROS pouvait être engendrée qui induit un certain nombre de dommages oxydatifs. Ce mécanisme de réparation pourrait alors devenir non fonctionnel puisque ces enzymes pourraient être oxydées. Cependant, certains rotifères survivent à ces deux stress ce qui indique qu'ils possèderaient une « protection » de leur enzyme de réparation contre les dommages oxydatifs (Daly et al, 2007).

Cette hypothèse a été analysée par Krisko et Radman (2010) qui ont étudié le taux de carbonylation des protéines chez *Escherichia coli*, un organisme radiosensible, et *D. radiodurans*, un organisme radiorésistant. La carbonylation est une réaction de radicaux hydroxyles avec les chaînes latérales accessibles d'acides aminés. Ces altérations irréversibles induisent une perte de fonction de la protéine en modifiant sa forme. Il a fallu une dose 10 fois plus importante pour obtenir le même taux de carbonylation chez *D. radiodurans* que *E.coli*. Les organismes radiosensibles montraient une sensibilité plus prononcée aux dommages oxydatifs. Cette protection n'est pas absolue puisqu'une mortalité était observée lorsque le taux de carbonylation était trop important pour les cellules (Krisko et Radman, 2010). Des expériences similaires ont été faites par Krisko *et al.* (2012) qui ont comparé la fertilité et le taux de carbonylation des rotifères bdelloïdes et de *C. elegans*, plus radiosensible. De même, un effet protecteur est observé puisque les rotifères bdelloïdes nécessitent une dose d'irradiation plus importante pour atteindre le même taux de carbonylation des protéines que *C. elegans*. Les dommages oxydatifs de type carbonylation ont aussi été caractérisés comme nocif puisque la fertilité diminuait plus la carbonylation augmentait.

L'acquisition d'un système d'antioxydant efficace chez les bdelloïdes pourrait donc être responsable de cette tolérance à la dessiccation et aux irradiations, car il est nécessaire de piéger les espèces réactives engendrés par ceux-ci et pour protéger les protéines et autres composants utilisés dans la réparation des cassures doubles brins. Les rotifères sensibles à la dessiccation seraient alors moins tolérants aux dommages oxydatifs.

Les données génomiques soutiennent cette hypothèse d'un système antioxydant efficace puisqu'elles montrent que les familles de gènes impliqués dans la résistance à l'oxydation sont plus abondantes dans l'espèce *A.vaga* en comparaison avec d'autres organismes modèles (Flot et al. 2013) dont un grand nombre a été acquis par transfert horizontal. Les constituants de ce système ne sont pas bien caractérisés, mais des recherches (Latta, Tucker et Haney 2019) démontrent que les rotifères utiliseraient des antioxydants à petites molécules (de poids moléculaire faible) et que les antioxydants placés dans leur culture contribueraient à leur survie.

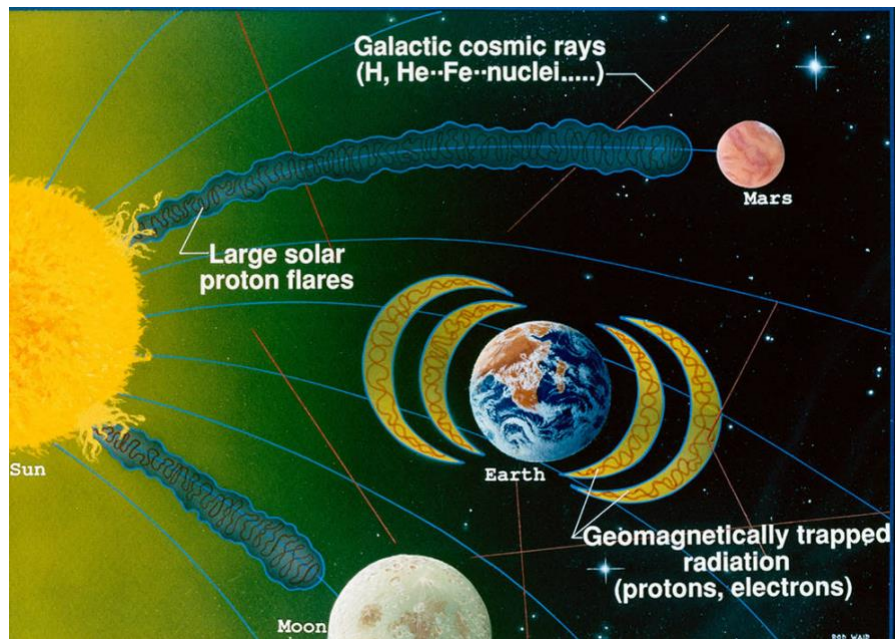


Figure 10 (NASA website) : Éléments de l'environnement spatiale. Les principales sources de rayonnements spatiaux sont les rayons cosmiques galactiques, du soleil et des ceintures de Van Allen.

Étant donné que les rotifères sont un modèle unique pour l'étude des conséquences de dommages oxydatifs et de la protection contre ceux-ci chez les animaux en général, il serait intéressant de décrire au sein des bdelloïdes des radiorésistances différentes et ainsi voir s'il y a un lien avec la résistance à l'oxydation.

1.8 Les enjeux de l'exposition à un environnement spatial

1.8.1 La place des rotifères dans l'étude de l'espace

Les rotifères bdelloïdes présentent une stratégie efficace de survie qui leur permet de coloniser les environnements terrestres les plus extrêmes tels qu'une plante au sein du désert d'Atacama et l'Antarctique. Ils sont alors devenus un modèle pour l'étude de l'astrobiologie puisqu'ils permettent d'appréhender les limites de la vie. Leur utilisation au sein de la recherche spatiale a été motivée principalement par leur résistance à des conditions extrêmes telle que la dessiccation et l'exposition à des rayonnements ionisants. Étant des métazoaires multicellulaires, ils sont sélectionnés pour leur complexité par rapport à d'autres organismes envoyés dans l'espace tels que les bactéries. D'autres raisons pratiques sont également à prendre en compte comme leur miniaturisation possible, une facilité en s'en procurer puisque leur distribution est variée et leur capacité de reproduction rapide permettant d'obtenir des clones denses (Ricci and Boschetti 2003). Après différents organismes tels que *Bacillus subtilis*, *D. radiodurans* ou les tardigrades, ils ont été envoyés dans l'espace au sein de la station spatiale internationale (ou « *International space station* » ou ISS) en 2019 dans le cadre de Rob1 et en 2020 dans le cadre de Rob2. Lors de Rob1, *Adineta vaga* a été envoyé dans un état hydraté alors que Rob2 a envoyé des individus desséchés, tous deux ayant comme but d'étudier comment les voyages spatiaux affectent le métabolisme via l'étude des expressions géniques. En 2025, une autre expédition est prévue dans le cadre de RoA mais cette fois-ci, différentes espèces seront placées en dehors de l'ISS.

1.8.2 Composition et risque de l'environnement spatial

Pour décrire l'impact de l'espace sur la vie, il est nécessaire de caractériser ce par quoi les bdelloïdes ont été exposés lors des précédents voyages ainsi que lors des simulations réalisées dans ce mémoire et à quoi ils seront exposés au cours des prochaines missions (Fig. 10). Sur Terre, les IR sont présents et proviennent soit de radionucléides naturels créés au sol ou de neutrons créés dans l'atmosphère par le soleil ou les supernovas. L'environnement spatial est très différent de celui de la Terre et est principalement composé de radiations ainsi que de particules accélérées (Thirsk et al. 2009). Certaines caractéristiques des rayonnements leur permettent d'être différenciées : leur énergie, généralement en mégaelectronvolt (MeV), leur transfert linéaire d'énergie (LET) et leur intensité exprimé en débit de dose ($\mu\text{Sv/h}$).

Pour commencer, les rayons cosmiques galactiques sont une des principales sources de rayonnement qui consistent en des particules énergétiques provenant de l'extérieur de notre système solaire. Ils sont produits par le reste de supernova qui correspond à l'explosion d'une étoile en fin de vie. Ce flux continu de particules énergétiques chargées provient de toutes les directions et est composé de protons (85%), de noyaux de ^4He (12%) ainsi que de noyaux lourds (1%) caractérisé par un LET élevé, d'électrons et de positrons (2%). Il faudrait alors un blindage de quelques mètres d'épaisseur pour créer la protection réalisée par l'atmosphère sur Terre. Malheureusement, il constitue 75 % de la dose reçue, car en raison des limites de poids, c'est impossible de vraiment s'en protéger (Moreels et al. 2020).

Le soleil émet en permanence un flux de particules, appelé le vent solaire, comprenant des électrons, des protons énergétiques et des noyaux lourds en concentration réduite. Son énergie reste limitée puisqu'une petite quantité de blindage, quelques centimètres, suffit pour fournir une protection adéquate. Cependant, le soleil étant instable, certains événements comme les éruptions solaires et les éjections de masse coronale (CME) peuvent émettre temporairement des électrons et des protons très énergétiques. Ces épisodes correspondent alors à des événements à particules solaires (SPE), une autre des principales sources de rayonnement. Lorsque l'activité du soleil est au maximum, la probabilité de SPE est la plus importante, mais est difficile à prévoir. Au niveau de l'ISS, les SPE n'engendrent pas une dose reçue élevée puisqu'elle se trouve à 400 km de la Terre et bénéficie toujours de la protection partielle du champ magnétique terrestre (Benton and Benton 2001).

Les rayonnements peuvent également provenir de particules piégées dans le champ magnétique terrestre qui a pour rôle de protéger la Terre et son environnement des rayonnements cosmiques. Les particules chargées suivent et tournent autour des lignes du champ magnétique et seules les plus énergétiques arrivent à l'atmosphère terrestre alors que les moins énergétiques sont dirigées vers les pôles. Les particules chargées piégées dans le champ géomagnétique forment deux ceintures autour de la Terre, appelées ceintures de Van Allen. La ceinture interne située à 3000 km au-dessus de la surface de la Terre contient des électrons (max 5 MeV) et des protons (max 700 MeV) venant des GCR. Cette ceinture présente une perturbation anormale du champ géomagnétique terrestre, appelée l'anomalie de l'Atlantique Sud, où sont piégées ces particules, mais à une altitude plus basse de 200 km car son axe magnétique ne coïncide pas avec l'axe de rotation. L'ISS, qui possède une inclinaison orbitale de 52°, traverse quotidiennement cette anomalie et des flux élevés de IR sont recensés. La ceinture externe située à 22000 km contient des électrons (max 7 MeV) et est remplie par les SPE (Thirsk et al. 2009) (Moreels et al. 2020).

Le type de rayonnement dans l'espace est donc principalement composé de protons et de particules HZE (comme le fer, le carbone, l'oxygène et le silicium). Ils représentent 90 % des rayonnements trouvés dans l'espace lointain et participent grandement aux conséquences biologiques (Moreels et al. 2020).

L'espace profond est caractérisé par une microgravité de $10^{-6}g$. L'attraction gravitationnelle s'affaiblit à mesure que deux objets sont éloignés l'un de l'autre. Ainsi, au sein de l'ISS, la gravité de la Terre est encore fortement présente. Au sein de l'ISS, le champ gravitationnel représente environ 89 % de celui de la surface de la Terre. Pour donner un ordre d'idée, la microgravité terrestre est de 1g alors que la microgravité lunaire est respectivement de 0,16g (Elgindi et al. 2021). Les températures et le vide sont également extrêmes. Lorsque l'ISS se situe du côté de la Terre éclairée par le soleil, sa température du vaisseau peut atteindre 100°C à l'inverse, dans l'ombre de la Terre, la température peut tomber à -100°C.

La pression à proximité de l'ISS dépend de son altitude et de son orientation. De plus, les matériaux subissent un phénomène de dégazage, ce qui fait augmenter la pression avoisinante. La pression recensée au niveau de l'avant de l'ISS est donc de 10^{-7} Pa et à l'arrière de 10^{-4} Pa.. Quant au vide spatial, il atteint des pressions allant de 10^{-7} à 10^{-4} Pa (Horneck, Klaus, and Mancinelli 2010).

1.8.3 Dosimétrie des rayonnements

Les doses reçues sur Terre sont très différentes de celles reçues par les astronautes car ces derniers sont exposés à des doses beaucoup plus élevées et à des types de rayonnements très

différents. Avant d'étudier les différentes doses reçues, il est nécessaire de différencier les deux unités utilisées : le sievert (Sv) et le gray (Gy). Le sievert est l'unité de dose efficace utilisée pour évaluer le risque d'effets biologiques alors que le gray est utilisé pour mesurer la dose de rayonnement absorbée (CEA 2016). La dose annuelle du rayonnement naturel est de 1mSv/an, mais celle-ci doit rester inférieure à la limite légale de 20 mSv. Dans l'ISS, le débit de dose est d'environ 20 μ Sv/h soit 200 fois plus élevé que sur Terre. Et lors d'un séjour de 6 mois, la dose augmente à environ 100 mSv ce qui représente 5 fois la limite de dose légale pour les travailleurs sur Terre (Moreels et al. 2020). Ces doses ne devraient pas induire d'effets aigus significatifs des rayonnements, mais les risques seraient augmentés à long terme. Au fur et à mesure que la durée de la mission augmente et qu'ils s'éloignent de la Terre, les doses deviennent plus élevées. Cependant, le débit de dose dans l'espace peut augmenter lors d'événements solaires. Il est compliqué de prévoir et de contrôler les doses reçues par les astronautes. Les effets sur la santé sont incertains au vu du nombre réduit de données sur leur exposition (Benton and Benton 2001)(Thirsk et al. 2009).

1.9 Objectifs

La perspective de vols spatiaux à long terme engendrerait une exposition des astronautes à des doses importantes de radiations et de microgravité. Des modèles d'études sont donc importants afin d'étudier la capacité de la vie à supporter des environnements extrêmes tels que l'espace et l'adaptation physiologique qui s'en suit. Des contre-mesures à ces défis pourraient alors éventuellement être trouvées. Les rotifères bdelloïdes, précédemment envoyés dans l'espace, ont été étudiés en leur qualité de métazoaire extrémotolérants. Ce mémoire s'intègre donc dans une expérience d'astrobiologie vivante à sélectionner des espèces de bdelloïdes qui serait capable de survivre à la simulation de certaines composantes de l'environnement spatiale. L'objectif final serait de les envoyer pour la prochaine mission en dehors de l'ISS.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié l'espèce *Habrotrocha atacama* venant de l'endroit le plus aride au monde, le désert de l'Atacama situé au nord du Chili. Sa résistance à la dessiccation et à la radiation aux rayons X a été évaluée en mesurant leur survie et leur fertilité. Leur compétence à réparer l'ADN sera également explorée à l'aide de l'électrophorèse sur gel à champ pulsé (PFGE), qui analyse la taille des fragments du génome obtenus par des cassures double brin et le réassemblage de ces fragments au fil du temps.

Nous avons ensuite étudié l'espèce *Rotaria rotatoria* qui ne fait pas de dessiccation et qui provient d'un environnement constamment hydraté tel qu'une marre. Nous avons alors déterminé ce qu'il en est de sa radiorésistance aux rayons X par la mesure de la survie, de la fertilité et de sa capacité à réparer son ADN. Puisque l'origine de l'extrême radiorésistance des bdelloïdes reste controversée, l'utilisation de cette espèce est d'autant plus importante, car les données contribueront à la compréhension de la diversité des tolérances aux radiations pour ensuite élucider les mécanismes qui rendent ces espèces résistantes et d'autres non.

Nous avons ensuite mesuré la résistance de *H. atacama* face aux conditions spatiales simulées telles que le vide à long terme, les variations de température et sélectivement aux UV, paramétrés pour reproduire l'exposition en orbite basse. De plus, ces individus ont subi une exposition isolée de rayonnements d'ions lourds, en particulier le fer. L'impact sur la survie et la fertilité de toutes ces expositions a été testé et comparé à notre espèce de référence du projet RISE de l'ESA (2021), *A. vaga* cultivée depuis au moins 30 ans dans des conditions de laboratoire et utilisés comme standard. Suite à l'exposition aux particules de Fer, l'état et la capacité à réparer le génome a également été analysés par une PFGE.

Nous avons également évalué dans quelle mesure la résistance à la dessiccation ou à la radiation peut être liée à la tolérance au stress oxydatif. En effet, le haut niveau de radiorésistance chez les rotifères pourrait être également dû à un système amélioré d'antioxydants. L'efficacité de ce système a été explorée par l'analyse de la capacité à résister à la carbonylation des protéines de deux espèces. Nous avons donc mesuré le taux de groupements carbonyles sur les protéines de l'*Adineta editae* et de l'*Adineta vaga* suite à une exposition à des doses croissantes de rayons X. L'espèce *A. editae* est une espèce venant de l'Antarctique, résistante à la dessiccation, mais dont la fertilité chute aux environs de 500 Gy à l'inverse de l'*A. vaga* qui présente une chute de fertilité aux environs de 1000 Gy.

Enfin, nous avons exploré la dynamique spatio-temporelle du mécanisme de réparation de l'ADN au sein des cellules germinales. En effet, nous avons analysé si elle pouvait se dérouler soit lorsque l'œuf est au sein de la mère, avant la maturation de l'œuf, soit lorsque l'œuf est pondu et qu'il commence à se diviser. La PFGE classique, chargée de rotifères adultes, ne pouvait pas être utilisée car celle-ci démontrait la cinétique de réparation de l'ADN au sein des cellules somatiques puisque les cellules germinales sont trop peu nombreuses pour être détectées. Des œufs pondus par des mères irradiées ont été isolés et chargés dans une PFGE pour évaluer leur intégrité génétique. L'absence de cassures doubles brins démontrerait une réparation durant l'oogenèse.

II. Matériels et Méthodes

2.1 Cultures de rotifères bdelloïdes

Les différentes cultures de rotifères sont maintenues au laboratoire d'écologie et génétique évolutive (URBE) du Professeur Karine Van Doninck. Les expériences ont été réalisées sur différentes espèces de rotifères bdelloïdes : *Rotaria rotatoria*, *Habrotrocha atacama*, *Adineta vaga* et *Adineta editae*. Les expériences sur *R. rotatoria* ont été réalisées à partir d'échantillons collectés directement sur le terrain, dans un étang belge, au vu des difficultés survenues lors de la culture en laboratoire. *H. atacama*, isolée d'un échantillon de plante sèche, a été collectée dans le désert d'Atacama (23°29'28.8 "S, 67°46'09.4 "W) et clonée par J. W. Larrick. Cette espèce est cultivée dans le laboratoire du LEGE depuis >2 ans. Les cultures d'*A. vaga* proviennent d'un individu unique venant du laboratoire de Matthew Meselson. Les cultures d'*A. editae* ont été créées à partir d'un individu isolé d'un échantillon venant de l'Antarctique (65°15'03.60"S 64°14'33.50"W) fourni par Karel Janko.

Ces espèces sont cultivées hydratées dans des boîtes de pétris de 150x20 mm contenant de l'eau de source Spa®, et incubés à 21°C dans notre laboratoire. Ils sont nourris à intervalles réguliers avec du jus de laitue stérilisé (*Lactuca sativa* sp). La culture de *R. rotatoria* a été rendue possible au fur et à mesure du temps en fournissant un mélange composé de 300 µl de jus de laitue, de 50 µl d'une culture de *Escherichia coli*, de 20 µl d'astaxanthine (pigment antioxydant) et de 50 µl de Phytone™ Peptone (Soja).

2.2 Dessiccation et réhydratation

Les cultures de bdelloïdes ont été sélectionnées en fonction de leur propreté et de leur densité. Les animaux morts et les résidus biologiques ont été retirés de la boîte de pétri à l'aide d'un grattoir à cellules. Ensuite, les cultures ont été affamées, c'est-à-dire contenues dans 15 ml d'eau de Spa® pendant 24h. La collecte des individus des boîtes sélectionnées a commencé par le détachement des rotifères par l'ajout de 450 µl de NaCl et l'utilisation d'un vortex. Les individus ont été rassemblés dans un tube falcon de 15 ml à l'aide de quatre centrifugations consécutives de 15 minutes à 4000 rpm. Nous avons compté le nombre d'individus contenu dans 2 µl à six reprises afin de déterminer la quantité à prélever dans l'échantillon pour obtenir le nombre d'individus souhaité. Les individus bdelloïdes sont placés dans une dépression au centre d'une boîte avec un fond d'agarose. Ces boîtes de dessiccation ont nécessité 30 ml d'agarose 3 % à bas point de fusion (« *Low Melting Point* » ou LMP) obtenu avec un mélange d'eau thermale. Les rotifères ont ensuite été desséchés dans une chambre climatique WEKK 0028 avec les paramètres suivants (optimisés à partir de Hespeels et al. 2014) : diminution linéaire de l'humidité relative de 70% à 55% en 17 h, diminution linéaire de l'humidité relative de 55% à 41% pendant 1 h, suivie de 19h à 41% d'humidité relative. Après cette période, le substrat d'agarose était complètement sec avec un amas de bdelloïdes desséchés au centre. Une découpe est alors effectuée autour des rotifères regroupés en « patch » qui sont utilisés pour l'analyse. Pour la réhydratation, le patch a été submergé par 15 ml d'eau. Les échantillons réhydratés ont été stockés à 21°C et alimentés avec 100 µl de jus de salade après 1 heure. Le patch desséché contenait pour les différentes espèces entre 20.000 et 40.000 bdelloïdes. La dessiccation effectuée sur *R. rotatoria* a nécessité 35.000 individus, représentant la plupart des cultures.

Espèce	État	Dose	Répliques	Individus	But
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	0 Gy	9	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	25 Gy	3	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	50 Gy	3	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	100 Gy	3	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	175 Gy	3	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	250 Gy	4	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	500 Gy	3	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	750 Gy	5	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	1000 Gy	3	80	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>H. atacama</i>	Desséchés	0 Gy	4	40 000 (dont 60 sont isolés pour mesurer la fertilité)	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>H. atacama</i>	Desséchés	500 Gy	4	40 000 (dont 60 sont isolés pour mesurer la fertilité)	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>H. atacama</i>	Desséchés	1000 Gy	5	40 000 (dont 60 sont isolés pour mesurer la fertilité)	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>H. atacama</i>	Desséchés	1500 Gy	4	40 000 (dont 60 sont isolés pour mesurer la fertilité)	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>H. atacama</i>	Desséchés	2000 Gy	3	40 000 (dont 60 sont isolés pour mesurer la fertilité)	Mesurer le taux de survie et de fertilité
<i>A. vaga</i>	Hydratés	0 Gy	2	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. vaga</i>	Hydratés	100 Gy	1	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. vaga</i>	Hydratés	500 Gy	1	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. vaga</i>	Hydratés	1500 Gy	1	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. editae</i>	Hydratés	0 Gy	1	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. editae</i>	Hydratés	100 Gy	1	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. editae</i>	Hydratés	500 Gy	1	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. editae</i>	Hydratés	1500 Gy	1	200 000	Mesurer le taux de carbonylation
<i>A. vaga</i>	Hydratés	500 Gy	6	± 50 000	Isolation d'œufs irradiés ou venant de mères irradiées

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes irradiations dont les doses, les espèces, les répliques et les nombres d'individus isolés varient. Par exemple, 80 individus de l'espèce *Rotaria rotatoria* ont été isolés et irradiés à quatre reprises à 250 Gy dans le but de mesurer leur survie et leur capacité à se reproduire. Il est important de préciser que les irradiations sur les individus *H. atacama* ont été réalisées ultérieurement par des membres de l'unité de recherche.

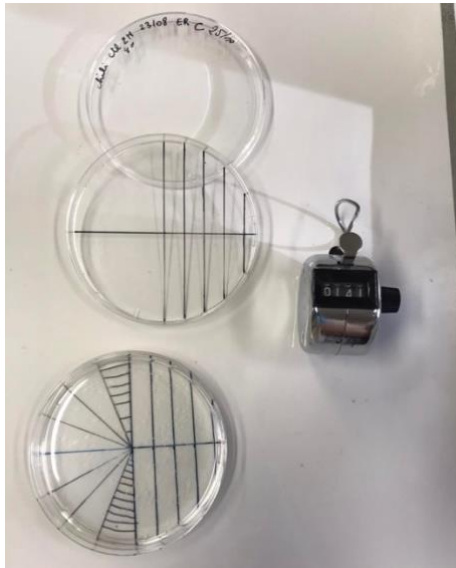


Figure 11 : Méthode de comptage de rotifères. Un couvercle d'une boîte de pétri a été marqué avec des lignes et placé sous la boîte de pétri contenant les individus. A l'aide du binoculaire, les rotifères des différents cadrant sont comptés.

2.3 L'exposition aux rayons X

Les rotifères bdelloïdes ont été irradiés à l'aide de l'irradiateur à rayons X PXi X-RAD 225 XL disponible au LARN (Université de Namur, Belgique) avec un débit de dose de $\pm 8,2$ Gy/min. Les paramètres utilisés lors de l'irradiation étaient un courant de 19 mA, une tension de 225 kV ainsi que l'emploi du filtre 1 en aluminium de 2 mm qui élimine les rayonnements de faible énergie. Les échantillons ont été placés sur un bloc de refroidissement utilisé pour éviter la mort thermique des rotifères. Les échantillons à irradier étaient soit desséchés, soit hydratés.

Certains individus ont été séchés un jour avant l'irradiation et exposés à l'intérieur d'une boîte de pétri scellée. Plusieurs conditions de 80 individus, isolés manuellement, de *R. rotatoria* hydratés ont été irradiés à des doses de départ de 25 Gray et limitées à 1000 Gy. Des *H. atacama* desséchés ont été irradiés à des doses de 500 et limitées à 2000 Gy. Ces dernières ont été réalisées ultérieurement par des membres de l'unité de recherche. Chaque exposition a été réalisée au minimum à trois reprises afin de mesurer la survie et la fertilité. Des échantillons de 200 000 *A. vaga* et *A. editae* ont été irradiés hydratés séparément à des doses de 100, 500 et 1.500 Gy dans le but de quantifier des dommages protéiques (Tableau 1).

2.4 L'exposition aux ions lourds (Fer)

Deux espèces de rotifères bdelloïdes ont été irradiées par des particules chargées à l'aide d'un faisceau horizontal au synchrotron à ions lourds (SIS) du GSI Helmholtz Centre for Heavy Ion Research en Allemagne en utilisant du ^{56}Fe (1 GeV et 1550 MeV/g/cm^2). Les *H. atacama* et *A. vaga* ont été desséchés à l'UNamur selon le protocole cité ci-dessus. Le jour précédant l'irradiation, les échantillons ont été transportés dans des conditions réfrigérées. Les échantillons répartis en trois répliques ont été assemblés dans un porte-échantillon permettant une exposition simultanée de plusieurs couches et exposés à 250 Gy et à 500 Gy. Un ensemble d'individus desséchés ont été préparés et stockés à 21°C au laboratoire LEGE alors que d'autres échantillons desséchés ont été transportés jusqu'en Allemagne mais non irradiés.

2.5 Taux de survie et capacité de reproduction

Suite aux différents types d'irradiation, le taux de survie a été calculé sur plusieurs répliques par dose. Pour chaque exposition de l'espèce *R. rotatoria* à différentes doses de rayons X, 60 individus ont été isolés et placés un par puits dans des plaques multipuits. Ils ont ensuite été remplis avec 2 ml d'eau de Spa® et de 50 μl de jus de salade par puits. Cette survie a été évaluée en comptant les individus vivants et morts après 48 heures à l'aide du binoculaire. Les rotifères sont considérés comme vivant soit s'ils recouvrent leur capacité de mouvement soit si le mastax bouge chez les individus contractés. Pour les autres espèces et différentes expositions telles que le vide ou aux ions lourds, le taux de survie est obtenu par le ratio entre les individus morts et le nombre total d'individus. Le comptage des individus morts est d'abord réalisé en plaçant la boîte de pétri qui contient l'ensemble des individus sur un quadrillage (Fig. 11). Les individus sont ensuite concentrés dans un volume final de 1000 μl grâce à plusieurs centrifugations de 15 minutes à 4000 rpm. La totalité des individus est alors mesurée en comptant à 6 reprises le nombre d'individus contenu dans 2 μl .

La capacité de reproduction des rotifères est déterminé comme leur capacité à pondre des œufs (ou des juvéniles pour les individus vivipares) et de créer une population clonale à partir d'un individu isolé. 60 individus vivants ayant subi différents stress ont alors été isolés et placés individuellement dans chaque puits d'une plaque à 12 puits. Un mois après l'exposition, les

puits ont été observés au binoculaire et les puits étaient répartis entre la présence d'une population (1), la présence d'œufs non éclos (avec la possibilité de la présence de l'adulte) (2) et la présence d'individus morts (3). Le taux de fertilité est alors calculé en fonction de nombre de puits présentant une population et le nombre d'individus au total (60). Quand le nombre d'individus vivants n'atteignait pas 60, le nombre d'individus manquants était considéré comme morts pour éviter de biaiser les données. Les *R. rotatoria* sont considérés comme fertiles s'il y a 5 ou plus d'individus dans le puit. En effet, un individu adulte peut contenir un maximum de trois individus déjà formé pendant l'exposition. Ainsi, s'il y a plus de 5 individus dans le puit, cela signifie que malgré l'irradiation, il a été capable d'engendrer une descendance. Puisque ces rotifères sont vivipares, la présence d'œufs n'a pas été évaluée. Les *H. atacama* et les *A. vaga* étaient considérés comme fertiles s'il y avait 3 ou plus d'individus dans le puit. Le nombre d'œufs et d'individus a donc été évalué ici puisqu'ils sont ovipares.

Les échantillons, dont la survie et la fertilité ont été investiguées, étaient soit hydratés, soit réhydratés après une dessiccation. Certaines mesures ont été réalisées par J. Berthe et illustrée dans ce mémoire, tel que les données de survie et de fertilité des *Habrotrocha atacama* desséchés, des *A. vaga* desséchés soumis au vide et aux variations de température et enfin des *A. vaga* desséchés exposés aux ions Fer.

2.6 Statistiques et graphes

Les données ont été exprimées en moyennes \pm écart-type (SD). Les analyses statistiques et les graphes sous forme de box-plots ont été effectués à l'aide du programme R (Version 4.1.2) et l'extension RStudio par Victoria Moris. Pour la plupart de nos données qui présentaient une distribution anormale, les effets de la dose des rayonnements (Rayons X, et Fer) et du temps exposé aux conditions spatiales simulées ont été mesurés par un test de Kruskal-Wallis. Les procédures non paramétriques de comparaisons multiples ont ensuite été permises par le software *nparcomp* (analyse Gao_cS) après une correction Bonferroni de la P-valeur (Konietschke et al, 2015). Pour les données qui présentaient une distribution normale, les effets de l'exposition au Fer ont été mesurés par un test ANOVA (one ways). Ainsi, des comparaisons multiples étaient également faites par l'utilisation d'un test Tukey. Ces approches permettent de comparer les conditions entre elles et pas seulement en fonction des contrôles (représentant les échantillons non irradiés) et d'évaluer les différences significatives (valeur $P < 0,05$) entre les conditions. Les graphes ont été illustrés par des lettres qui indiquent, lorsqu'elles sont identiques, une différence non significative.

Une approche similaire au calcul de la DL50 (Dose Létale) a été réalisée pour mesurer la SD50, représentant la dose nécessaire pour stériliser 50 % de la population irradiée, de certaines espèces de bdelloïdes. En fonction des points expérimentaux mesurés lors des expériences, une courbe illustrant les taux de fertilité est obtenue à l'aide du logiciel OriginLab® (MA, USA) par Sébastien Penninck du LARN (UNamur). Ces courbes des différentes espèces sont réalisées et ajustées à l'aide d'une équation dose-réponse qui permettra également de calculer la SD50 :

$$Fertilité = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log x_0 - x) p}}$$

Avec A_1 qui est l'asymptote minimum, A_2 qui est l'asymptote maximum, $\log x_0$ qui correspond à la SD50, x qui représente la dose, et enfin p qui représente la pente.

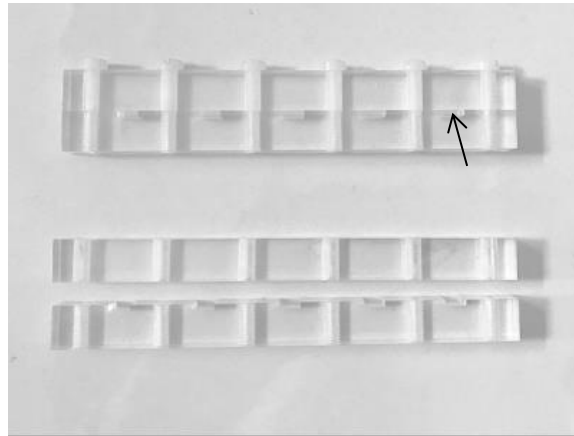


Figure 12 : Moule. Ces cadrans associés l'un à l'autre permettent la formation de plug (→) suite à l'ajout de l'échantillon contenu dans de la solution A et d'agarose.

2.7 L'électrophorèse en gel à champ pulsé ou *Pulse-Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

La préparation des échantillons réalisée pour cette technique est différente en fonction des questions expérimentales à résoudre. En outre, le principe de base consiste à compter le nombre d'individus présent dans 2 µl de l'échantillon pour déterminer le volume à collecter pour obtenir 1000 individus et à déposer dans un eppendorf. Les 1000 individus de chaque conditions, fixés dans 35 µl de solution A (50 mM EDTA et 10 mM Tris pH 8,0), ont été mélangés avec 19 µl d'agarose 2 % et déposé dans un moule adéquat (Fig 12). Pour permettre leur polymérisation, les échantillons ont été placés à 4°C pendant 20 minutes. Une fois polymérisés, ils ont été placés séparément dans une solution de digestion constituée de 207,34 µl d'eau, 250 µl de solution B (200 mM EDTA et 100 nM Tris), 26 µl de protéinase K (utilisée pour détruire le contenu des rotifères à l'exception de l'ADN) et 16,66 µl de Sarkosyl (permettant la lyse)(Thibeault et al. 2019) pendant 1h à 4°C et incubés à 56°C pendant 18h. Ces échantillons ont ensuite été transférés dans un autre eppendorf et rincés trois fois en ajoutant 2ml de TBE 0,5X successivement utilisé comme tampon de migration et comme tampon pour la préparation du gel (Zhang, Wang, et Wang 2011). Une fois ces rinçages effectués, une attente de 3h à 4°C s'était déroulée. Un dernier rinçage a été réalisé pour remplacer le TBE par 500 µl d'EDTA. L'ensemble a été placé à 4°C jusqu'à son utilisation. Les conditions, à nouveau immergées dans le TBE, ont été placées dans un gel d'agarose à 0,8% permettant l'emplacement de 10 échantillons. L'échantillon polymérisé utilisé comme contrôle contenait des chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* utilisé comme standard de poids moléculaire. La migration du gel a été réalisée à l'aide d'un BioRad CHEF-DR II (14 °C ; 5,5 V/cm, angle de commutation 120° et temps de commutation 60-185 s pendant 22 h avec une rampe linéaire). L'ADN a été marqué en utilisant 10 µl de SYBER Gold dans 100 µl de TBE et révélé avec une caméra BioRad Chemidoc XRS. Le logiciel de quantification ImageLab 3.0 (paramètres SYBR Gold) et ImageJ ont été utilisés pour traiter les images (Hespeels et al. 2014).

Les échantillons d'espèces diverses tels que l'espèce *H. atacama*, *R. rotatoria* ou *A. vaga* ont été obtenus différemment. Les PFGE sur les *H. atacama* desséchés et les *R. rotatoria* hydratés ont nécessité respectivement 1000 et 250 individus par condition. Les conditions hydratées ont été obtenues à partir de boîtes de pétris qui ont été regroupées dans un eppendorf, fixé par addition de solution A jusqu'à 1,5 ml et stocké directement à -80°C jusqu'à utilisation. Les échantillons desséchés ont été réhydratés, à l'exception des contrôles séché et des échantillons fixé dès la fin de la radiation. Pour étudier la restauration de l'intégrité génomique, toutes les conditions hydratées des deux espèces ont ensuite été fixées à des intervalles spécifiques (après 2 h30, 8 h, 24 h, 48 h et 1 semaine) et stockés à -80°C. Une fois décongelés, les échantillons ont été centrifugés et les individus compté dans un volume déterminé.

Pour étudier la sensibilité du signal de cette technique, le nombre d'individus *A. vaga* déposé dans les puits a été modifié. 10, 50 et 100 individus adultes ont été isolés manuellement pour trois conditions : le contrôle hydraté, un échantillon d'individus irradiés à 500 Gy et un échantillon d'individus d'une semaine post-irradiation. Les différents individus ont été directement placés dans de la solution A qui, après une centrifugation, a été enlevé au maximum pour en ajouter un volume connu de 35 µl. De la même manière, 500 œufs fixés ont été placés dans un puits au cours d'une autre PFGE. Une PFGE se concentrant sur la résolution de fragments de faible taille a été également réalisée afin d'analyser l'intégrité génomique dans son ensemble. La concentration du gel qui passe à 1% et les paramètres de migration (15 °C ; 6 V/cm, angle de commutation 120° et temps de commutation 1-25 s pendant 24 h avec une rampe linéaire) étaient dès lors modifié. Le ladder utilisé est le même que pour les autres PFGE

Espèces	État	Type de rayonnements	Dose	Nombre d'individus placés par plug	Résolution	But
<i>R. rotatoria</i>	Hydratés	Rayons X	800 Gy	250	2200-225 Kb	Analyse de la réparation de l'ADN
<i>H. atacama</i>	Desséchés	Rayons X	800 Gy	1000	2200-225 Kb	Analyse de la réparation de l'ADN
<i>H. atacama</i>	Desséchés	Rayonnement d'ions lourds (Fer)	250-500 Gy	1000	2200-225 Kb	Mesure de l'intégrité génomique
<i>H. atacama</i>	Desséchés	Rayonnement d'ions lourds (Fer)	500 Gy	1000	2200-225 Kb	Analyse de la réparation de l'ADN
<i>H. atacama</i>	Desséchés	Rayons X	800 Gy	1000	<945-150 Kb	Analyse de la réparation de l'ADN
<i>A. vaga</i>	Hydratés	Rayons X	500 Gy	10-50-100	2200-225 Kb	Analyse de la sensibilité du signal
<i>A. vaga</i>	Hydratés	Rayons X	500 Gy	- 50 adultes - 500 œufs	2200-225 Kb	Analyse de la réparation d'ADN au sein des cellules germinales

Tableau 2 : Résumé des sept électrophorèses en gel à champ pulsé (PFGE) réalisées avec différents but et paramètres appliqués.

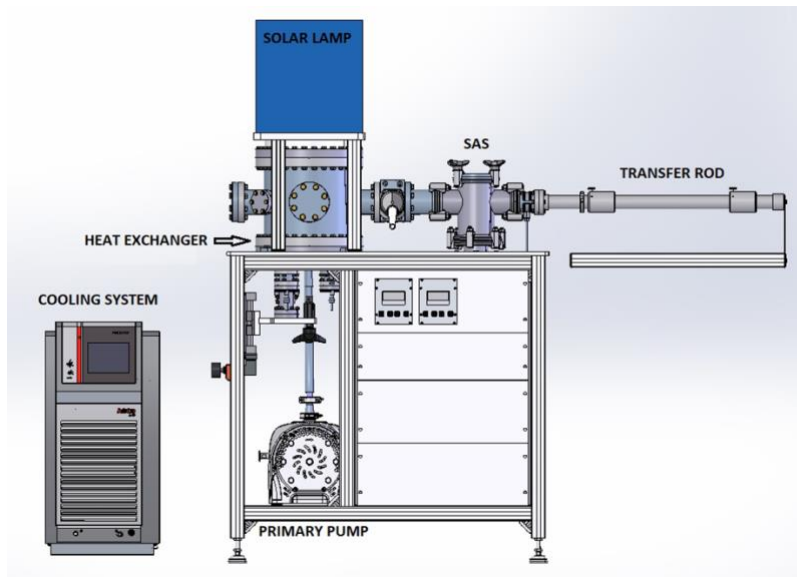


Figure 13 : Design du simulateur spatial. Ce simulateur peut exposer les échantillons au vide en appliquant une pression de 10^{-7} Pa à l'aide de pompes, aux UV par une lampe solaire au-dessus de la chambre principale et aux variations de température à l'aide d'un module de refroidissement situé dans la chambre principale. Les échantillons ont été placés dans le sas et déplacés dans la chambre où ils sont maintenus à l'aide de la tige de transfert.



Figure 14 : Module et filtres d'exposition au vide et aux variations de température. (1) Il s'agit du module en aluminium dans lequel sont placés les répliques des échantillons. (2) Il s'agit d'un filtre OD4 qui ne laisse passer que 0,01 % d'UVs. (3) Il s'agit d'un autre filtre de type OD2. (4) Il s'agit d'une plaque en aluminium qui ne laisse pas passer d'UVs. (5) Cet anneau a été confectionné pour être positionné sur les filtres pour éviter le passage d'une concentration non voulue d'UVs au niveau des bords.

Espèce	Exposition au vide et aux variations de température	Exposition aux UVs	Temps d'exposition / incubation	Réplicas	Nombre d'individus exposé / incubé
<i>H. atacama</i>	Oui	Non	Un jour	3	30 000
<i>H. atacama</i>	Oui	Non	Une semaine	3	30 000
<i>H. atacama</i>	Oui	Non	Un mois	3	35 000
<i>H. atacama</i>	Oui	Non	Deux mois	6	Entre 25 000 et 40 000
<i>H. atacama</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à 21°C	Non	Un jour	9	Entre 22 000 et 30 000
<i>H. atacama</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à 21°C	Non	Deux mois	4	Entre 22 000 et 30 000
<i>H. atacama</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à 4°C	Non	Deux mois	6	Entre 25 000 et 40 000
<i>H. atacama</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à -20°C	Non	Deux mois	1	34 000
<i>H. atacama</i>	Oui	Oui (0,01 %)	Un jour	3	35 000
<i>H. atacama</i>	Oui	Oui (0,01 %)	Une semaine	3	Entre 35 000 et 40 000
<i>H. atacama</i>	Oui	Oui (0,01 %)	Un mois	3	Entre 35 000 et 40 000
<i>H. atacama</i>	Oui	Oui (0,01 %)	Deux mois	3	10 000
<i>A. vaga</i>	Oui	Non	Un jour	3	Entre 30 000 et 40 000
<i>A. vaga</i>	Oui	Non	Une semaine	3	25 000
<i>A. vaga</i>	Oui	Non	Un mois	3	25.000
<i>A. vaga</i>	Oui	Non	Deux mois	4	Entre 15 000 et 25 000
<i>A. vaga</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à 21°C	Non	Un jour	9	Entre 15 000 et 30 000
<i>A. vaga</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à 21°C	Non	Deux mois	7	Entre 15 000 et 30 000
<i>A. vaga</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à 4°C	Non	Deux mois	3	Entre 15 000 et 25 000
<i>A. vaga</i>	Non : Il s'agit d'un contrôle placé à -20°C	Non	Deux mois	1	26 000
<i>A. vaga</i>	Oui	Oui (0,01%)	Un jour	3	23 000
<i>A. vaga</i>	Oui	Oui (0,01%)	Une semaine	3	18 000
<i>A. vaga</i>	Oui	Oui (0,01%)	Un mois	4	Entre 15 000 et 25 000
<i>A. vaga</i>	Oui	Oui (0,01% sans UVC)	Une semaine	4	30 000

Tableau 3: Résumé de toutes les expositions au vide et aux variations de température subies par deux espèces desséchées, *H. atacama* et *A. vaga* ainsi que des contrôles maintenus à différentes températures. Par exemple, des *A. vaga* desséchés ont été exposés au vide, aux variations de température et aux UVs pendant une période d'une semaine et étaient au nombre de trois patch contenant chacun une moyenne de 18 000 individus.

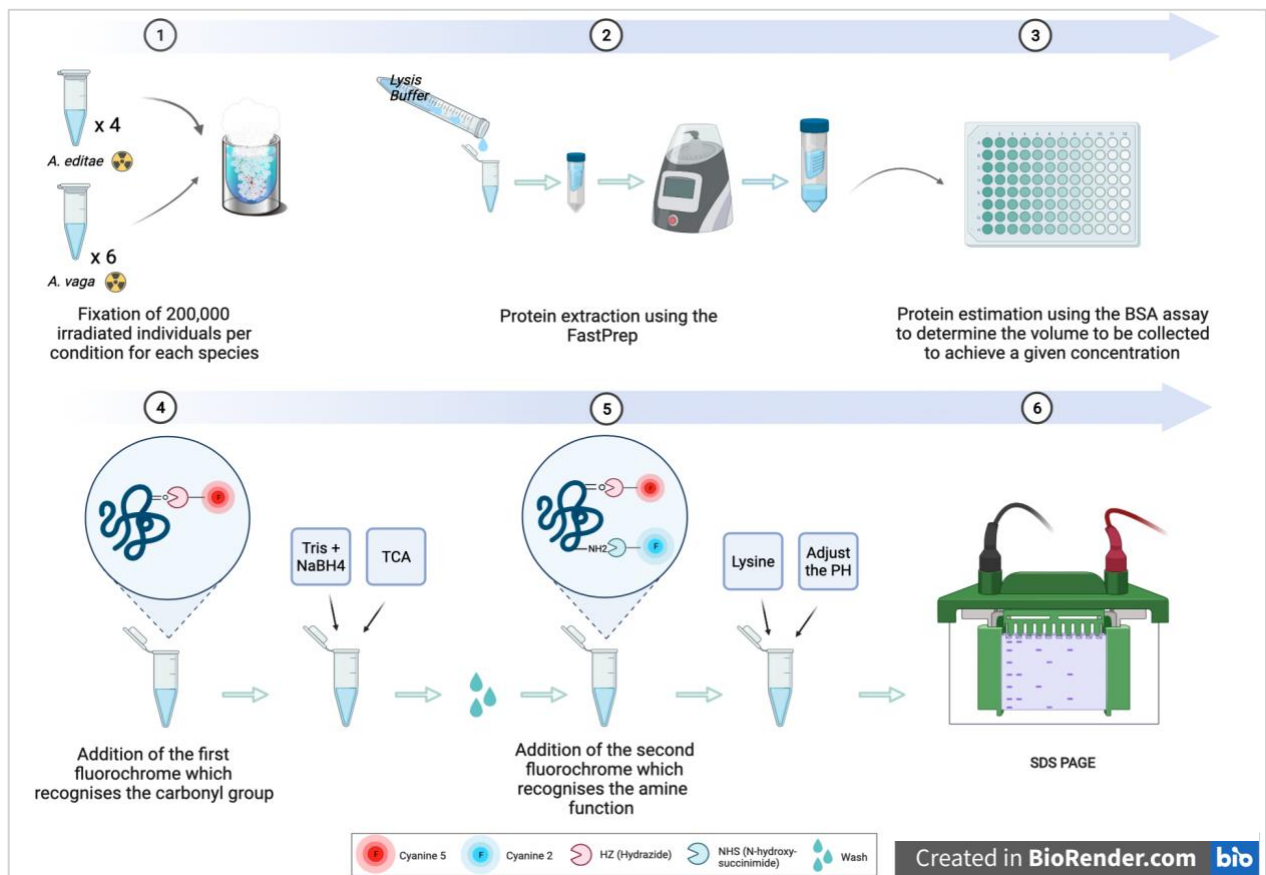


Figure 15 : Vue d'ensemble de l'expérience analysant la présence de carbonylation au sein des protéines d'*A. vaga* et d'*A. editae* après une irradiation. 200 000 individus par conditions ont été collectés et fixé dans de l'azote liquide. Après l'ajout d'une solution de lyse, les protéines étaient extraites à l'aide de la FastPrep permettant différentes agitations. Le surnageant était récupéré et centrifugé à deux reprises. 5 µl de chaque échantillon ainsi que de 8 standards ont été ajoutés sur une plaque 96 puits et immergés dans 150 µl de Pierce. Grâce à cette analyse BSA, le volume à prélever pour avoir une certaine concentration a été obtenu et mélangé au premier fluorochrome Cy5-Hz émettant dans le rouge qui se lie aux groupements carbonyle. La réaction était arrêtée par ajout de Tris et de NaBH4. En outre, les fluorochromes non réactifs étaient retirés grâce au TCA. Suite à quelques lavages, le deuxième fluorochrome Cy2-NHS qui émet dans le bleu est ajouté ainsi que la lysine qui stoppe la réaction. Suite à l'ajustement du pH par quelques réactifs, une électrophorèse sur gel SDS-page est réalisée.

puisque celui-ci offre une résolution de fragments de taille inférieure à 225 Kb. L'ensemble des expériences de PGFE sont résumées au Tableau 2.

La quantification de l'ADN migré lors de cette PFGE a été réalisée et représentées en graphe à l'aide du logiciel ImageJ.

2.8 Mise au vide et aux variations de température

L'exposition au vide et aux changements de température sur Terre est permise grâce à un simulateur spatial disponible et conçue au laboratoire LARN (UNamur) dans le cadre du projet Rotifer In Space (RISE) par Richard Coos. Ce simulateur (Fig. 13) permet la simulation de variations de température, de pression et d'ultraviolets (UVs) sous forme de cycles caractérisés par une période de 91 minutes (= temps pour que l'ISS fasse le tour de la Terre) avec 40 minutes de fonctionnement. Le vide est paramétré à une pression constante de 10^{-7} Pa reproduite à l'aide d'une pompe à vide qui extrait l'air. Les cycles de la machine sont donc également constitués de variations de température entre 30° et 45°C qui sont induites par un module de refroidissement et qui représentent les changements de position que pourrait prendre l'ISS en fonction du soleil. Et enfin, ils comprennent une exposition des échantillons aux UVs à une valeur de 100 W/m² représentant le spectre solaire en orbite basse et sont émis par le biais d'une lampe solaire. Cette exposition aux UVs peut être modulée par des filtres qui absorbent les rayons.

Après une dessiccation de deux jours, les patches de rotifères d'*H. atacama* et d'*A. vaga*, ont été placés séparément dans une sorte de boîte de pétri en aluminium (Fig. 14). Le simulateur pouvait contenir au maximum 6 boîtes en aluminium et chacune d'elles possédait trois patches de dessiccation définis comme des répliques. Si une exposition uniquement au vide et aux variations de température est analysée, cette boîte sera fermée par un filtre ne laissant passer aucun rayonnement UV (Plaque en aluminium). Si l'impact des UVs et du vide est exploré, le filtre sera remplacé par un autre ayant une persistance moins élevée aux UVs et ne laissant passer qu'une certaine concentration de 0,01 % (Filtre OD4). Les échantillons ont été exposés durant différentes périodes allant de 1 jour à 2 mois. Une fois leur temps d'exposition terminé, ils sont retirés de la machine, préhydraté pendant une journée à 90% d'humidité dans le dessiccateur et réhydratés dans 15 ml d'eau de Spa®.

Les contrôles, quant à eux, sont des individus dans un état desséché pendant des périodes d'un jour et de deux mois. Ils ont été pour la plupart maintenus à une température de 21°C dans un incubateur en 3 répliques pour chaque condition. Cependant, différents contrôles desséchés pendant 2 mois ont été également placés à des températures différentes de 4°C ou -20°C.

Les expositions sur les individus *A. vaga* ont été réalisées par J. Berthe. L'ensemble des expositions sont démontrées au Tableau 3.

2.9 Détection des groupements carbonyles des protéines

Pour effectuer cette technique (Fig 15), 200 000 individus doivent être collectés par conditions. Après leur centrifugation, le culot était fixé dans un bain d'azote liquide. La lyse s'effectuait grâce à un mélange composé de 7880 µl d'H₂O, 300 µl de Tris-HCl (30 mM pH = 7,5), 300 µl de NaCl (150 mM), 1000 µl de TritonX-100 (1%), 100 µl de IGEPAL (NP-40)(1%), 100 µl de SDS (0,1%), 200 µl de Glycérol (2%), 0,05 g de Sodium deoxcholate (0,5%), un cachet de Roche PIC, et en dernier 20 µl de DTT (2 mM) ainsi que 100 µl de PMSF (1 mM) ce qui est suffisant pour traiter un nombre de 10 conditions. Une fois la solution vortexée, 900 µl du tampon de lyse a été déposé sur chaque échantillon. Afin de réaliser au mieux la lyse, l'ensemble était transféré dans des tubes contenant des billes et soumis à une FastPrep

composée de 9 agitations de 20 secondes à une vitesse de 6 m/s. Entre les agitations, un arrêt de 20 secondes est effectué. Les tubes ont ensuite été troués à leur extrémité inférieure à l'aide d'une aiguille chauffée pour permettre le passage du lysat lors d'une centrifugation montant jusqu'à jusqu'à 3000 rpm vers un falcon 15 ml. Le surnageant obtenu était prélevé et centrifugé à deux reprises pendant 20 minutes à 13500 rpm. Une estimation de la concentration des protéines était mesurée par l'analyse BCA (Pierce™) durant laquelle 5 µl de 7 standards de BSA (de concentration 2 – 1,5 – 1 – 0,75 – 0,5 – 0,25 - 0,175 µg/µl) ainsi que 5 µl de chaque échantillon et d'H₂O étaient placés dans une plaque 96 puits. À ces volumes étaient ajoutés 150 µl de réactif Pierce. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre et grâce à la concentration des standards, la formule de la courbe obtenue fournissait la concentration des différents échantillons. Les résultats ont été normalisés pour obtenir le volume de lysat à prélever en fonction des échantillons. Un volume identique à celui du lysat de tampon de marquage du groupement carbonyl réalisé en assemblant 430 µl d'H₂O, 50 µl de SDS (1%), 1 µl de EDTA (1 mM pH=8), 18 µl de Sodium acétate (0,1M pH = 5,2) et 1 µl de fluorochrome liant le carbonyle Cy5-Hz (0,5 mM) était prélevé. Après une incubation dans le noir à 25°C sous 500 rpm, la réaction était stoppée en ajoutant 13,75 µl de Tris (2M) et 2,25 µl de NaBH₄ (0,2 M). Incubés une seconde fois pendant 10 minutes, différents volumes de TCA correspondants à 10 % de l'échantillon final ont été ajoutés afin de précipiter les fluorochromes Cy5-Hz non réactifs. Dans le noir, les échantillons étaient incubés, centrifugés et lavés à trois reprises avec 200 µl d'acétate d'éthyle/éthanol (v/v). 6 µl de buffer UTC9231 étaient ajoutés aux culots séchés sous hotte chimique ce qui a permis de dissoudre le culot et de récupérer les protéines. Suite à une incubation dans le noir de 2h à 30°C sous agitation de 16 000 rpm, le pH ont été ajustés en ajoutant 6 µl de Tris-HCl 50 mM (pH = 8,5).

Les protéines en général ont été mises en évidence par un marquage de la lysine par 1 µl du fluorochrome Cy2-NHS. Un ajustement du pH a été obtenu par l'ajout de 1 µl de lysine 10 mM aux conditions incubée depuis 30 minutes à RT. Lors d'une autre incubation de 10 minutes, le buffer, dans lequel a été placé le gel permettant de réaliser une électrophorèse SDS-page, était préparé avec du BOLT 1x. Les échantillons ont été alourdis par l'ajout de 3 µl de Bis-Tris 150 mM (pH = 6,8) et de 5 µl de tampon de chargement laemmli (pH = 6,8). Le gel était chargé avec 6 µl de ladder et 20 µl par échantillons qui migraient ensuite pendant une heure avec les paramètres suivant : 120 V, 400 mA et 8 W. La longueur d'onde émise par les fluorochromes est capturée par l'appareil d'imagerie Chemidoc. L'imagerie du gel a été traitée par le logiciel ImageJ car il affiche séparément l'intensité fluorochrome Cy2-NHS qui émet dans le bleu et celle du fluorochrome Cy5-Hz qui émet dans le rouge. Pour normaliser le taux de carbonylation en fonction des différentes concentrations de protéines, un ratio a été réalisé entre les données numériques obtenues après quantification de l'intensité des bandes du gel. Les résultats obtenus pour chaque condition ont alors été normalisés en fonction du contrôle de l'espèce concernée et présentés en pourcentage.

Les deux espèces qui ont été utilisées sont l'espèce *A. vaga* et l'espèce *A. editae*. Les conditions étudiées correspondaient à l'irradiation de ces espèces à 100, 500, 1.500 Gy ainsi qu'un contrôle non irradié (utilisé deux fois pour les *A. vaga*).

2.10 Élaboration d'un protocole pour l'isolation d'œufs au stade précoce

Environ 60 000 *A. vaga* (l'équivalent de 3 boîtes de pétris) ont été collectés grâce à une alternance de vortex et de centrifugations dans un volume final de 10 ml qui sera transféré vers une boîte de pétris small (Fig 16). L'ensemble de ces individus sont irradiés à une dose de 500 Gy, nourris avec 200 µl de jus de salade et stocké dans un incubateur paramétré à 25°C pendant

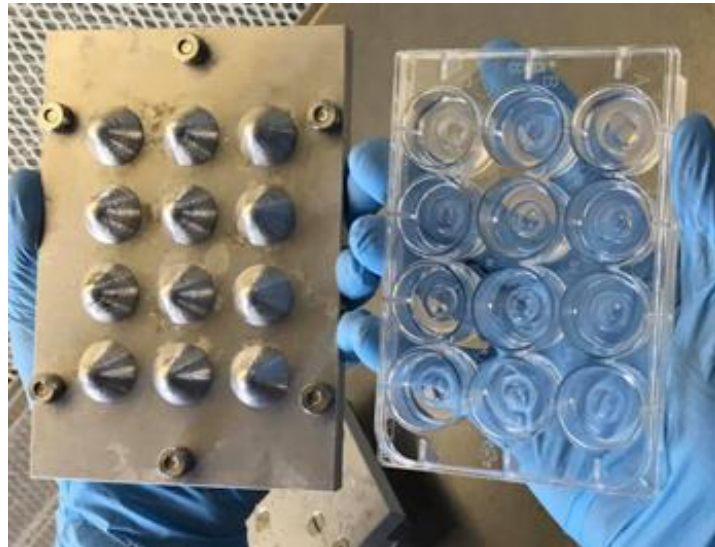


Figure 17 : Moule permettant la création de puits plus spécifique. Ce moule est posé au-dessus de la plaque multi-puits contenant de l'agarose 2% dans chacun des puits. La formation de ces puits nécessite une heure de polymérisation sous hotte à flux laminaire.

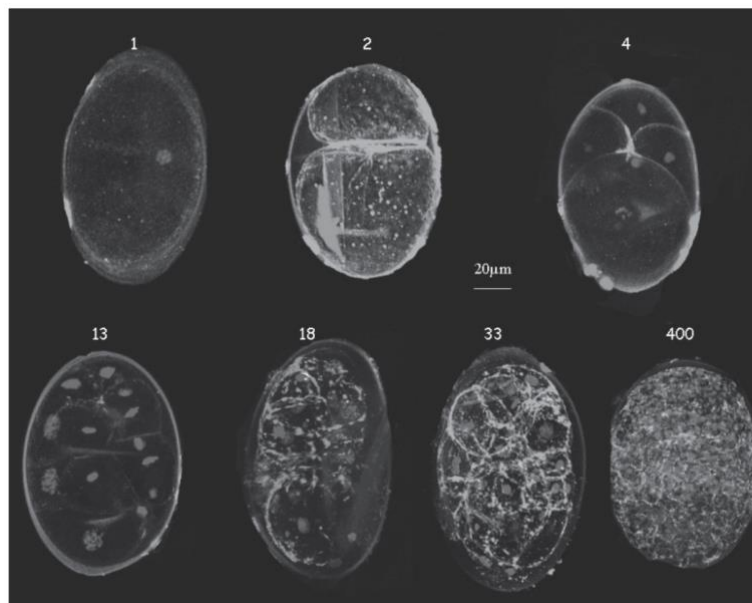


Figure 18 (Ricci Claudia and Boschetti Chiara. 2003): Illustration du développement du *Macrotrachela quadricornifera*. Les différents stades de division cellulaire ont été mise en évidence. Cette fluorescence était utilisé pour confirmer que les œufs observés étaient à des stades précoces, c'est-à-dire inférieur à 33 cellules.

2 jours. Le troisième jour, ils ont été répartis dans plusieurs boîtes et chacune d'elles était boostée par l'ajout d'un volume de 1 ml de jus de salade et par leur positionnement à une température de 21°C. 1 ou 2 mL d'individus prélevés dans une des boîtes a été déposé dans une autre boîte contenant 15 ml d'agarose 2% qui diminue leur adhésion et permet un prélèvement simplifié.

Le cinquième jour, les clones en oogenèse ont été isolés à l'aide d'un microscope optique à fond clair vers une plaque multipuits. Chaque puit avait précédemment été rempli par 2 ml d'agarose LMP 2 % et moulés pour faire un puit plus spécifique afin de concentrer les individus (Fig 17). Une fois polymérisé, 4 à 6 individus possédant deux œufs en priorité étaient placés dans chaque puits dans un nombre total de 10 plaques multipuits. Tous les puits ont été recouverts de 50 µl d'un mélange de 30 ml de Combo et de 1 ml de jus de salade.

Pendant l'isolation des mères, des œufs ont pu être pondus à différents temps de la journée. Cependant, pour obtenir des œufs à des stades précoces (avec un nombre de divisions cellulaires réduit), il faut qu'ils soient isolés à des périodes de temps synchronisés. Ainsi, suite à l'isolation des mères, les premiers œufs pondus à des périodes de temps non synchronisés ont été prélevés et éliminés.

Toutes les trois heures, les nouveaux œufs pondus ont été isolés après une vérification de leur stade de division. Pour confirmer que le stade de développement était bien précoce, chaque œuf était observé au microscope inversé et devait présenter un nombre de cellules inférieures à 33 comme illustré dans une imagerie en fluorescence d'une autre espèce, *Macrotrachela quadricornifer* (Fig 18). Si le stade était plus tardif, les œufs étaient éliminés. Les œufs de stade précoce étaient alors prélevés à l'aide du microscope à fond clair et immergés dans 30 µl de solution A de fixation stoppant leur développement. Une centrifugation à vitesse maximale d'une minute a permis d'enlever le surnageant et de confirmer l'absence d'adulte après vérifier par un microscope optique. 567 œufs ont finalement été isolés après vérification toutes les 3 heures pendant deux jours et deux nuits et stockés à -80°C.

Le protocole différait pour la réalisation des contrôles. Pour le contrôle positif, les œufs synchronisés ont été isolés et irradiés à la fin de la manipulation. Les deux nuits l'ont pas été reproduites donc chaque matin, les œufs non synchronisés sont prélevés 18 heures après la dernière isolation d'œufs et mis à part. Comme contrôle négatif, ces œufs non synchronisés non irradiés ont été utilisés. Par la suite, toutes ces conditions ont été utilisées pour une PFGE.

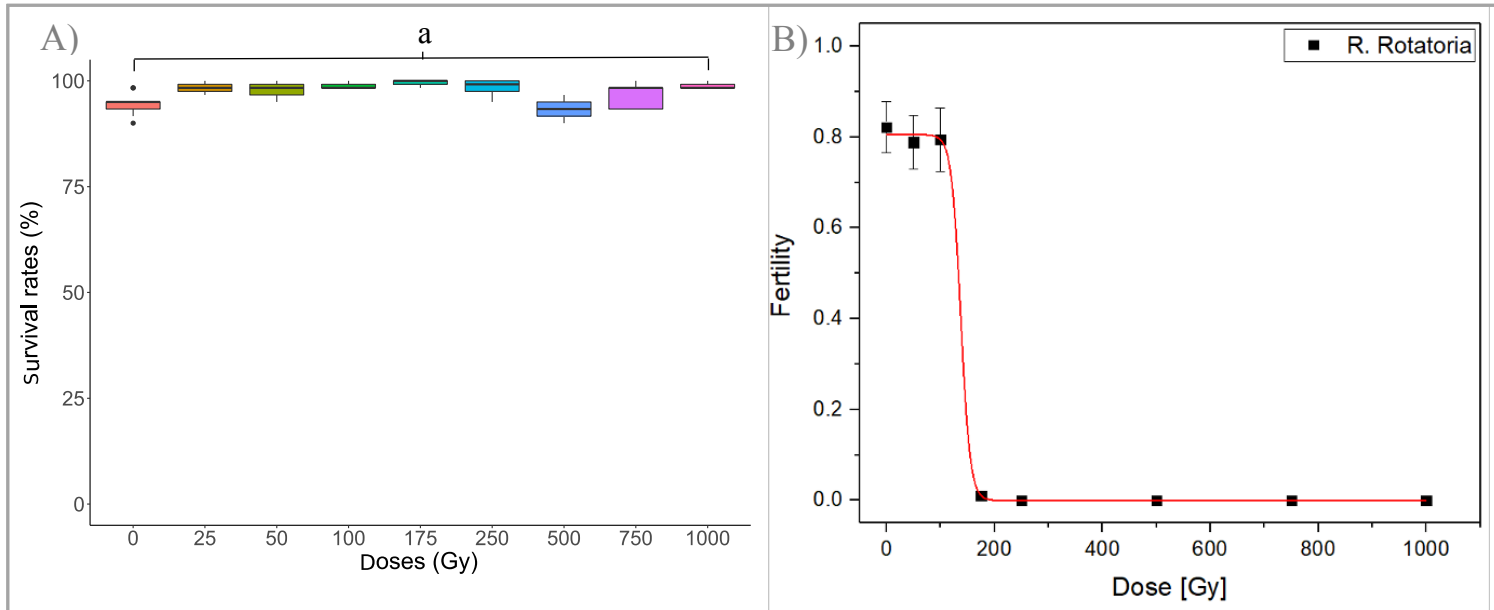


Figure 19 : Taux de survie (%) illustré par un box-plot (A) et de fertilité (%) (B) des *Rotaria rotatoria* hydratés irradiés à des doses croissantes de rayons X. (A) • = données extrêmes ; – = médiane (autant de valeur supérieures qu’inférieures) ; | = maximum et minimum de données. Le « 0 » correspond au échantillons hydratés non exposés. Les lettres représentent les différences significatives entre les groupes (valeur $P < 0,05$). (B) Graphe permettant de calculer la SD50, dose à laquelle 50 % des individus sont stériles, en fonction des données expérimentales.

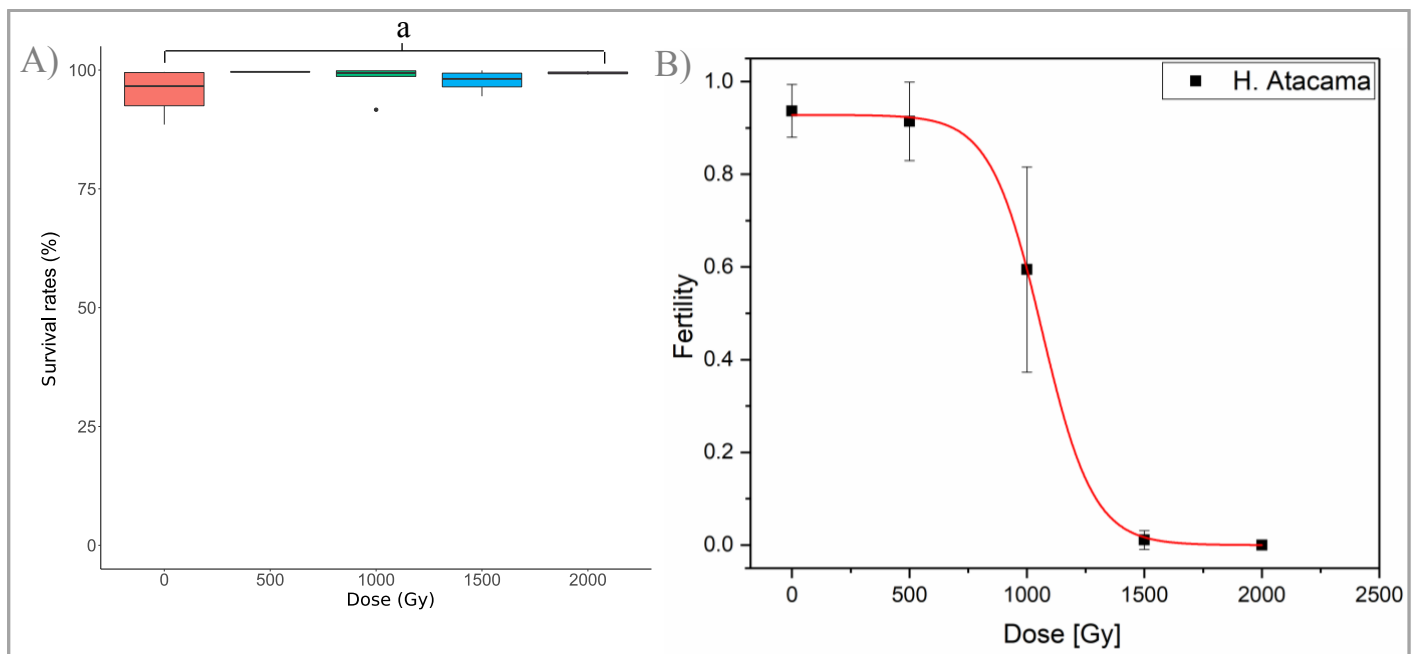


Figure 20 : Taux de survie (%) illustré par un box-plot (A) et de fertilité (%) (B) des *H. atacama* desséchés irradiés à des doses croissantes de rayons X. (A) • = données extrêmes ; – = médiane (autant de valeur supérieures qu’inférieures) ; | = maximum et minimum de données. Le « 0 » correspond au échantillons hydratés non exposés. Les lettres indiquent les différences significatives entre les groupes (valeur $P < 0,05$). (B) Graphe permettant de calculer la SD50, dose à laquelle 50 % des individus sont stériles, en fonction des données expérimentales.

III. Résultats

3.1 Impact de l'exposition aux rayons X sur les rotifères bdelloïdes

3.1.1 Survie de l'espèce *R. rotatoria*, sensible à la dessiccation, face à 1000 Gy de RX mais impact important au niveau reproductif

R. rotatoria est une espèce précédemment décrite comme non résistante à la dessiccation (Ricci 1998). Cette espèce a pu être trouvée et identifiée dans une mare (voir matériels et méthodes). Dans un premier temps, la capacité de résistance à la dessiccation a été évaluée suivant le protocole de dessiccation décrit par Hespels et al., 2014. Après 48h de dessiccation, aucun des individus isolés dans l'environnement n'ont été capable de se réactiver après réhydratation. Les *R. rotatoria* étant incapables de survivre à la dessiccation, la radiorésistance de ces individus a donc été évaluée uniquement sur des spécimens hydratés. Comme cela a été publié dans une étude précédente (Hespels et al., 2020), la radiorésistance de *R. rotatoria* a été évaluée sur base de la survie des individus 48h après l'irradiation aux rayons X (Fig. 19A). Deuxièmement, la fertilité, soit la capacité des individus à produire une descendance viable sur plusieurs générations, a été évaluée après 1 mois (Fig 19B).

Chez les individus contrôles, non irradiés, isolés et cultivés individuellement dans un puit (voir matériels et méthodes), le taux de survie moyen après 48h s'élevait à 94,4 % (Déviation standard : $SD \pm 2,76$ %). La survie a été évaluée après une exposition à 25-50-100-175-250-500-750-1000 Gy. Il n'y a pas eu de différence significative du taux de survie pour les échantillons exposés par rapport au contrôle et entre eux (Fig. 19A ; groupe a). En effet, à 1000 Gy, le taux de survie était toujours de 98,8 % ($SD \pm 0,01$ %). La variation observée entre les différentes expositions représente la variation liés aux échantillons biologiques.

Dans un second temps, la fertilité des rotifères *R. rotatoria* a été évaluée. Des individus non irradiés ont un taux de fertilité moyen de 82% ($SD \pm 5,93$ %) dans les conditions de culture définies (voir matériels et méthodes). Aucune diminution majeure de la fertilité n'est observée jusqu'à 100Gy. Cependant, aucun des *R. rotatoria* exposés à 250 Gy ou plus n'ont été capable de produire plus de trois individus et ont été catégorisé comme stérile. La dose minimale nécessaire pour stériliser 50 % de la population irradiée (SD50) a été évaluée à 137 Gy (± 7 Gy). Enfin, la fertilité a été évaluée en rapportant la taille de la population produite par un individu un mois après son isolation (Suppl Fig 1). La même tendance a alors été observée. Après 250 Gy, un nombre maximum de 2 individus par puit a été mesuré.

3.1.2 Radiorésistance similaire au RX entre *H. atacama*, résistante à la dessiccation et isolée dans le désert de l'Atacama, et *A. vaga*

La radiorésistance de l'espèce *R. rotatoria*, sensible à la dessiccation et vivant constamment hydratée, a été comparée à celle de l'espèce *H. atacama*. Cette espèce a été isolée d'une plante dans l'un des environnements les plus extrêmes de la planète, le désert d'Atacama. Premièrement, la radiorésistance de cette espèce desséchée a d'abord été évaluée par la mesure de la survie 48 heures après l'irradiation à des doses croissantes de rayons X (Fig. 20A). Les expériences de dessiccation sur des individus desséchés 48h et non irradiée ont permis de définir une survie moyenne de 95,35 % ($SD \pm 5,28$ %). Il n'y a pas eu de différence significative du taux de survie pour les échantillons exposés à des doses croissantes de rayons X (Fig. 20A ; groupe a). Ainsi, les échantillons irradiés à 2000 Gy présentaient un taux de survie de 99,4 % ($SD \pm 0,38$ %). Il y a donc pas eu d'effet de la dose de rayonnement sur la survie de ces individus.

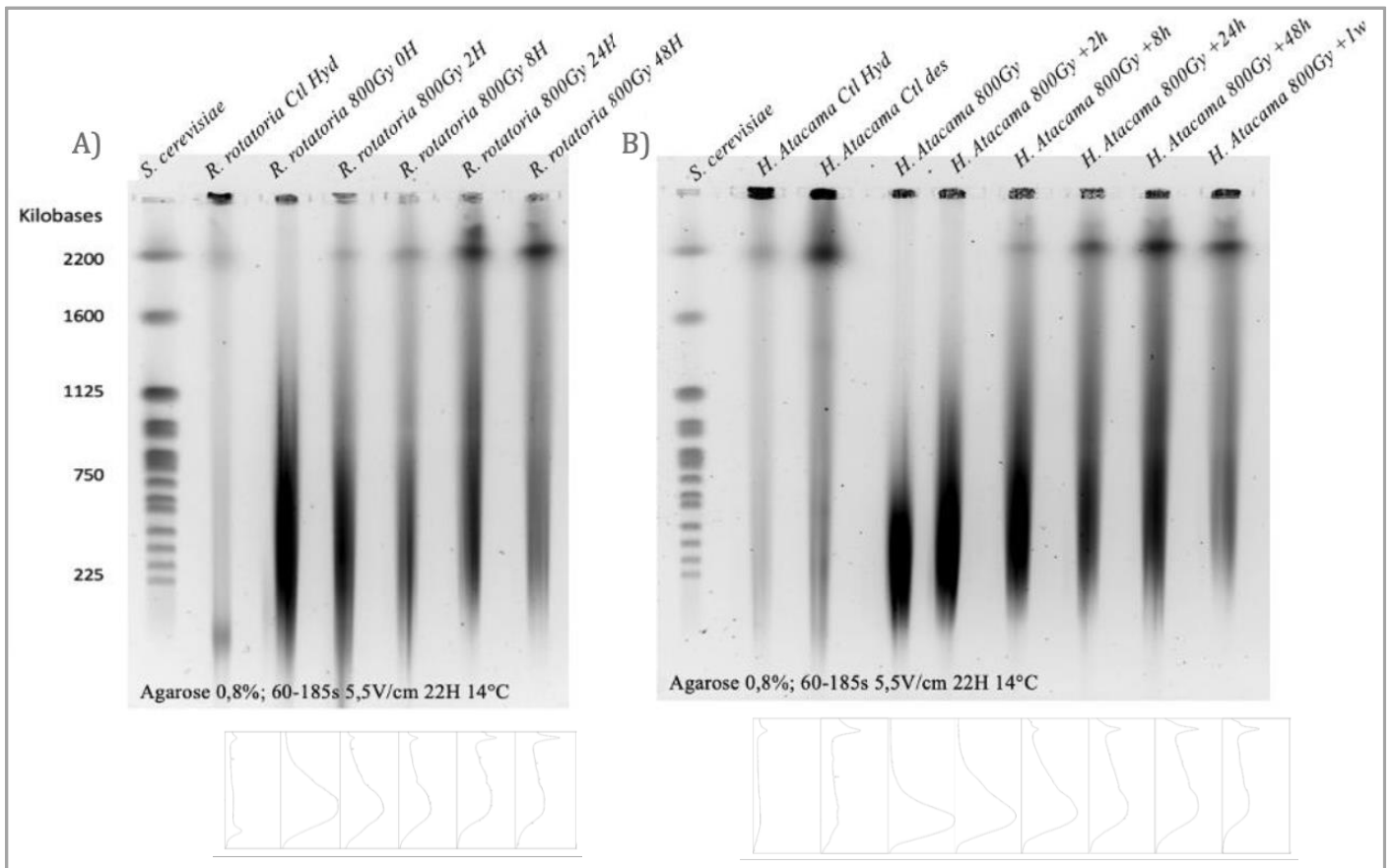


Figure 21 : Cinétique de réparation de l'ADN de *R. rotatoria* hydraté (A) et de *H. atacamensis* desséché (B) qui ont été irradiés avec 800 Gy de rayons X. La première voie des deux PFGE correspond aux chromosomes de *S. cerevisiae*. La deuxième voie correspond au contrôle hydraté des deux espèces. De plus, il existe des individus témoins desséchés pour l'espèce *H. atacamensis*. Les autres voies correspondent à des individus irradiés et fixés à des moments différents. Les graphes représentent l'intensité du SyberGold pour chaque bandes.

Ensuite, leur fertilité a été mesurée en évaluant leur capacité de démarrer une nouvelle population un mois suivant l'irradiation (Fig. 20B). Les rotifères non irradiés possédaient un taux de fertilité de 93,6 % (SD \pm 5,7 %) dans les conditions de cultures. Il n'y a pas eu de diminution importante entre les échantillons irradiés jusqu'à des doses de 500 Gy. Cependant, elle commençait à diminuer pour les individus irradiés à 1000 Gy. Le nombre d'individus irradiés à 1000 Gy pouvant engendrer une population variait fortement avec un taux de fertilité moyen de 59,4 % et une déviation standard de \pm 22,12. La stérilité de *H. atacama* a été observée à 1500 et 2000 Gy puisque ces individus irradiés ne produisaient plus de population. La dose de rayons X nécessaire pour stériliser 50 % de la population a été calculée à 1063,42 Gy (\pm 17,78 Gy). Cette SD50 est assez similaire à celle obtenue chez *A. vaga* (voir discussion). Les individus irradiés qui n'arrivaient pas à recréer une population n'ont pas forcément arrêté de pondre des œufs. À partir de 1500 Gy, un nombre important d'œufs ont été pondus mais ne parvenaient pas à effectuer un développement embryonnaire complet (Suppl Fig. 2).

3.1.3 Cinétique de réparation similaire chez ces deux espèces après une irradiation aux RX de 800 Gy

En utilisant une électrophorèse en gel à champ pulsé, nous voulions déterminer si la sensibilité à la dessiccation du *R. rotatoria* pouvait être une conséquence de l'absence ou d'une diminution de l'efficacité du mécanisme de réparation de l'ADN au sein des cellules somatiques. L'intégrité génomique du *R. rotatoria* hydraté a été analysée ainsi que celle du *H. atacama* desséchés pour comparer si les réparations d'ADN étaient distinctes face à une espèce résistante à la dessiccation. La perte de l'intégrité génomique a été induite par des cassures doubles brins générées par une exposition aux rayons X de 800 Gy. La cinétique de la réparation d'ADN était évaluée par la disparation des fragments de tailles réduites au profit de la réapparition de ceux de grandes tailles. Ce réassemblage était alors mesuré en fonction du temps suivant l'irradiation pour les individus hydratés ou la réhydratation pour les individus desséchés. Le même nombre d'individus se trouvait dans chaque puits.

Le génome chez les individus *R. rotatoria* hydratés non irradiés (Fig. 21A ; voie 2) était caractérisé par des fragments de grandes tailles qui restaient dans le puit. Peu de fragments d'ADN migraient pour donner un signal de faible intensité à environ 2200 kbp. Suite à une dose de 800 Gy, le génome a été fragmenté en plus petits morceaux ayant une taille comprise entre 225 et 1000 kbp (Fig.21 A ; voie 3). La cinétique de réparation d'ADN a été évaluée durant 48 heures après l'exposition aux rayons X. Après 2h de réparation, des fragments réduits d'ADN étaient encore visibles ainsi que des fragments de taille >1000 kbp (Fig. 21A ; voie 4), ce qui reflétait un potentiel mécanisme de réparation des cassures double brins. Au fur et à mesure que la cinétique de réparation se poursuivait (jusqu'à 48h), nous pouvions observer une accumulation des fragments de 2200 kbp (Fig. 21A ; voie 5-7) ainsi qu'une persistance des fragments de 225 à 750 kbp.

Concernant la cinétique de réparation d'ADN chez l'espèce *H. atacama*, les individus hydratés présentaient également des fragments de grandes tailles essentiellement restés dans le puit. L'intensité du signal des fragments d'ADN de \geq 2200 kbp chez les individus desséchés avait augmenté par rapport à ceux des individus hydratés (Fig. 21B ; voie 3). Les individus desséchés exposés à 800 Gy présentaient des fragments d'ADN de taille < 1000 kbp (Fig. 21B ; voie 4).

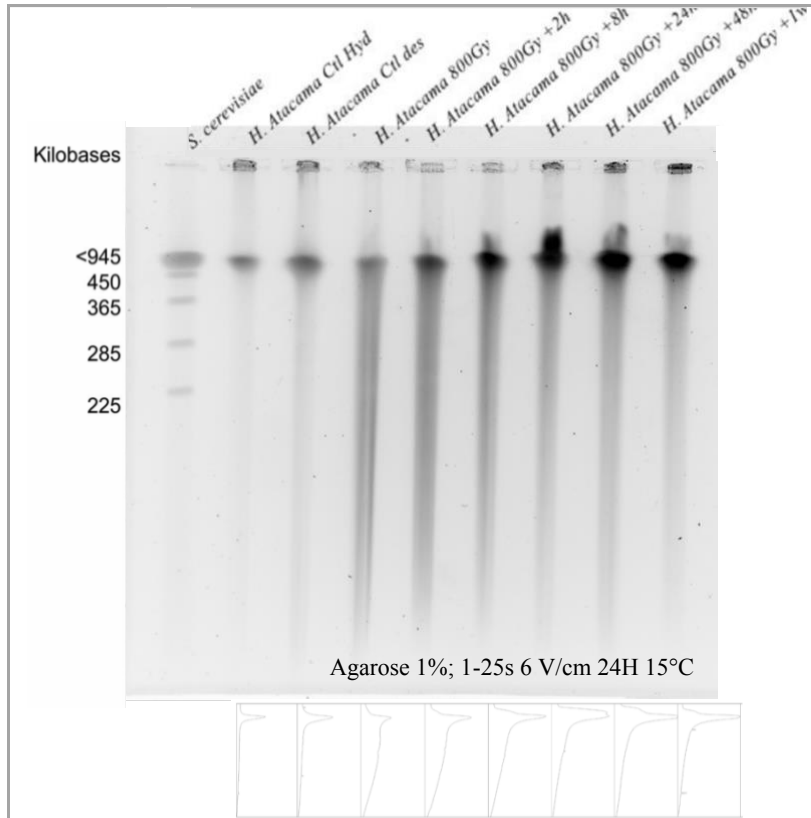


Figure 22 : Cinétique de réparation de l'ADN de *H. atacama* desséché qui ont été irradiés avec 800 Gy de rayons X. Cette PFGE a été réalisé avec des paramètres différents (indiqué sur la figure) et permet alors de faire migrer les fragments de plus petites tailles non visibles avec une échelle plus importante. Les graphes représentent l'intensité du SyberGold pour chaque bande.

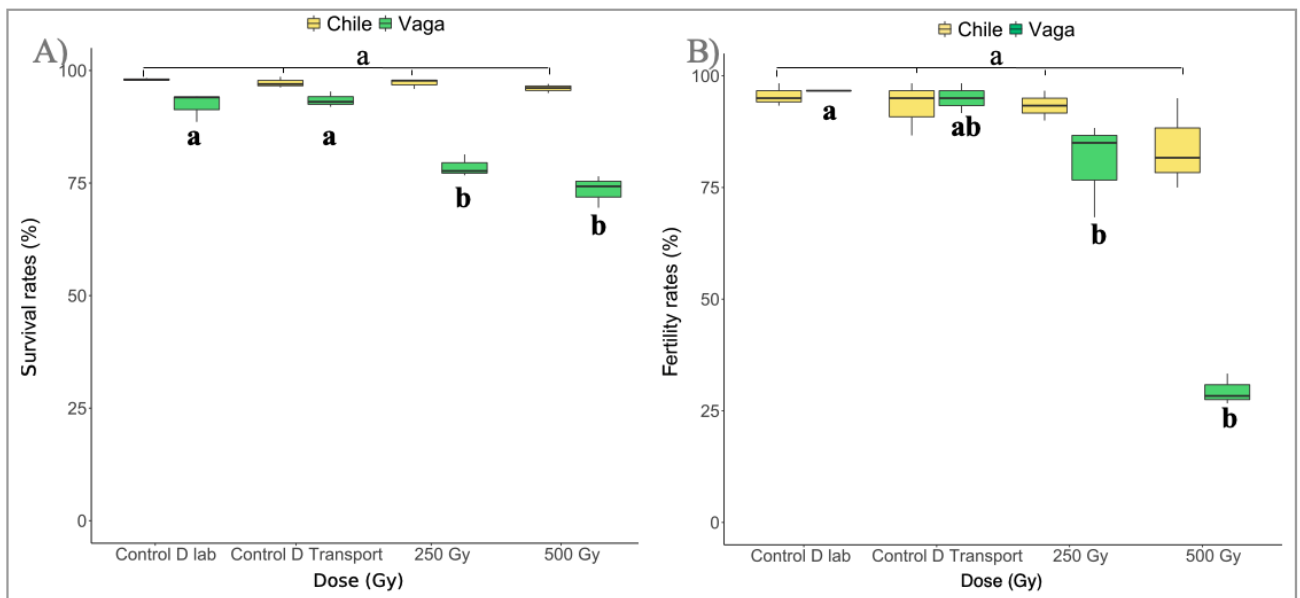


Figure 23 : Taux de survie (%) et de fertilité (%) illustré par un box-plot des *H. atacamensis* (A) (Vert) et des *A. vaga* (B) (Jaune) desséchés irradiés à des doses croissantes d'ions lourds tels que le Fer. (A) La voie « Control D lab » correspond aux individus desséchés non irradiés restés en laboratoire. La voie « Control D Transport » correspond aux individus desséchés qui ont fait le voyage jusqu'au GSI mais qui n'ont pas été irradiés. Les lettres indiquent les différences significatives entre les groupes (valeur $P < 0,05$). a ou b = *H. atacamensis* ; a ou b = *A. vaga*.

Même 2 heures après l'irradiation, aucun fragment d'ADN de taille ≥ 2200 kbp n'a été signalé. Cependant, des fragments de taille plus élevés étaient tout de même visibles (entre 750 et 1125 kbp). Les fragments de taille 2200 kbp ont commencé à être restaurés 8h après irradiation et réhydratation (Fig. 21B ; voie 6). La restauration de ces fragments se poursuivait avec le temps (Fig. 21B ; voie 7-9). Après une semaine, un certain nombre de fragments d'ADN de taille inférieure ont persisté (Fig. 21B ; voie 9). Une cinétique identique a été observée précédemment chez *A. vaga* dans des conditions similaires (Hespeels et al. 2020).

Cette première PFGE effectuée sur des individus *H. atacama* présentait une résolution entre 255 à 1125 kbp. Un deuxième protocole de PFGE a été réalisé dans le but de donner une résolution centrée sur des fragments de 48,5 -727 kb. Cette PFGE va nous permettre d'évaluer si la réparation d'ADN pouvait réassembler des fragments de plus petites tailles. Les échantillons utilisés d'*H. atacama* pour cette nouvelle PFGE étaient les mêmes conditions que celles observées au niveau de la figure 21B pour avoir une comparaison adéquate. Les individus hydratés ne présentent qu'un nombre réduit de fragments de grandes tailles (≥ 954 kbp) (Fig. 22 ; voie 2) alors que les individus desséchés avaient un nombre de ces fragments plus importants ainsi que des fragments de taille < 225 kpb (Fig. 22 ; voie 3). Après une irradiation de 800 Gy, beaucoup plus de fragments de taille < 225 kpb étaient observés ce qui perdure après 2 heures (Fig. 22 ; voie 4-5). Après 8 heures et jusqu'à une semaine, les fragments de tailles réduites diminuaient à l'inverse des fragments de taille ≥ 954 kbp qui augmentent de nouveau (Fig. 22 ; voie 6-9). Les résultats observés renseignaient une cinétique similaire à celle obtenue précédemment avec des fragments de taille réduite qui persistent.

3.2 Impact de l'exposition aux ions lourds tels que le Fer sur les rotifères bdelloïdes

3.2.1 **Survie et fertilité plus persistante face aux ions Fe chez les *H. atacama* par rapport aux *A. vag***

Dans le cadre de ce mémoire, des individus desséchés de l'espèce *H. atacama* et de l'espèce *A. vaga* ont pu être irradiés à des doses croissantes de Fe au GSI (Helmholtz Centre for Heavy Ion Research). Cette expérience a pour objectif de comparer la réponse biologique des *H. atacama* exposée à deux types de radiations respectivement les rayons X caractérisés par un LET faible et les ions Fe caractérisés par un LET élevé. Tout comme lors de l'exposition aux RX, la radiorésistance a été évaluée sur base de la survie et de la fertilité de ces individus irradiés. Il est important de préciser que cette irradiation a été réalisée à l'étranger. De ce fait, certains individus desséchés sont restés au laboratoire alors que d'autres ont été transportés, mais non irradiés. Cela a permis de s'assurer que les cassures doubles brins n'étaient pas dus au transport.

Tout d'abord, 48 heures après réhydratation, la survie a été mesurée chez les individus *H. atacama* (Fig 23A). Les individus hydratés et maintenus au laboratoire présentaient un taux de survie moyen 98 % (SD $\pm 0,2$ %) dans les conditions de culture, ce qui était similaire à celui des individus transportés, mais non irradiés qui était de 97,2 % (SD $\pm 1,2$ %). Il n'y a pas eu de différence significative entre les échantillons irradiés et desséchés (Fig. 23A ; groupe a). En effet, à 500 Gy, le taux de survie était maintenu à 96% (SD ± 1 %). Il n'y a pas eu d'impact significatif de ce type de rayonnements sur cette espèce. Cependant, cette stabilité du taux de survie n'a pas été maintenue pour les individus *A. vaga*. Les individus desséchés et non irradiés présentaient un taux de survie de 92 % (SD $\pm 3,18$ %) en condition de laboratoire et 93 % (SD $\pm 1,7$ %) pour ceux transportés. Une irradiation aux ions lourds a fait diminuer significativement le taux de survie jusqu'à 73 % (SD $\pm 3,5$ %) pour la dose la plus importante de 500 Gy (Fig. 23A ; groupe a - b).

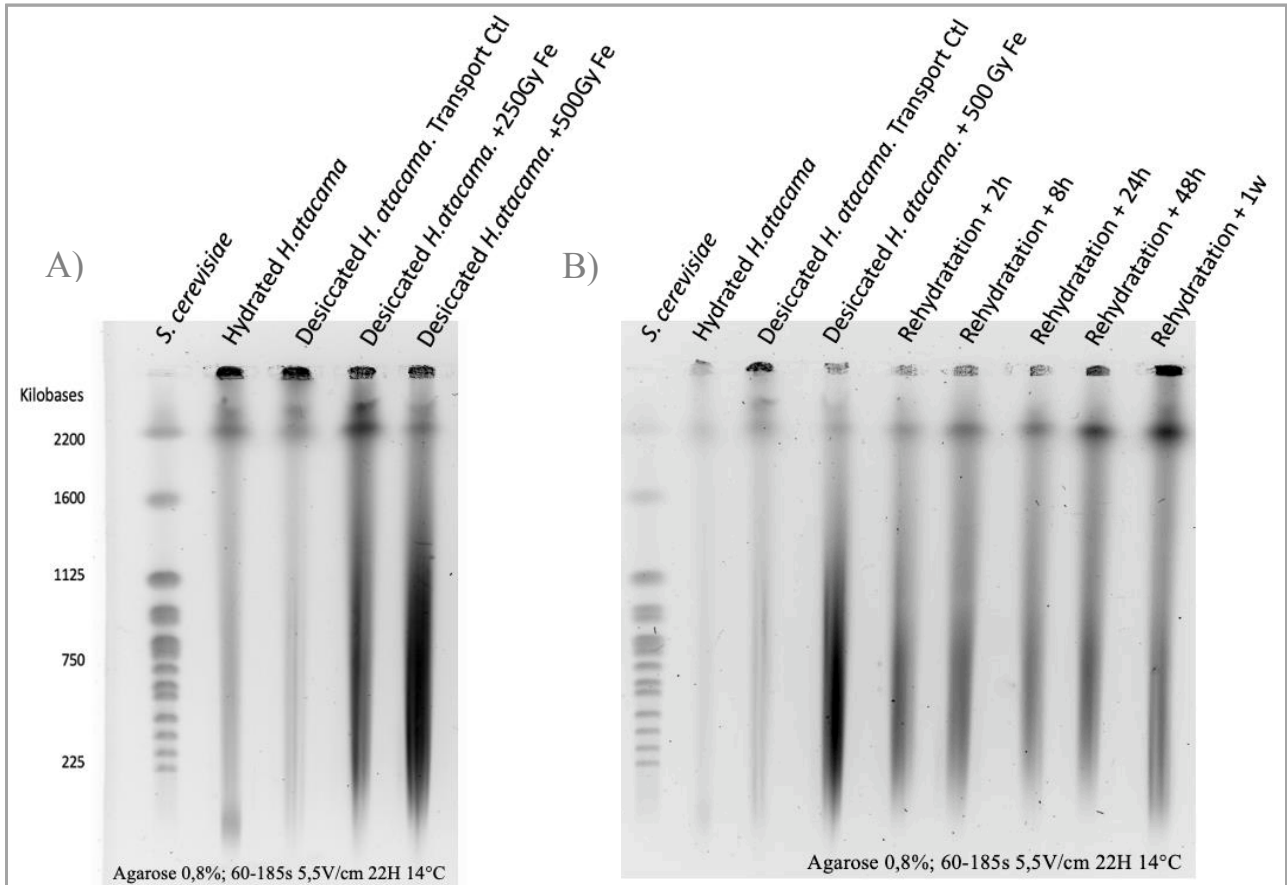


Figure 24 : Étude de l'intégrité génomique (A) et de la cinétique de la réparation d'ADN durant une semaine (B) des individus *H. atacamana* desséchés suite à une irradiation au ions Fe grâce à une PFGE. Le ladder utilisé est composé de chromosomes de *S. cerevisiae*. (A) L'état du génome est observé chez des conditions contrôles, tels que des individus hydratés et desséchés ainsi que chez des individus ayant subi une dose de 250 et 500 Gy d'exposition au Fer. (B) Après une irradiation de 500 Gy, la capacité de réparation de l'ADN est mesurée chez l'espèce *H. atacamana*.

Ensuite, un mois après l'irradiation, la capacité de se reproduire malgré les dommages causés par ce type d'exposition a été mesurée (Fig. 23 B). La fertilité des individus *H. atacama* restait stable entre les individus non irradiés qu'ils soient restés au laboratoire ou qu'ils aient été transportés. Il n'y a pas eu de différence significative de la capacité de reproduction entre les individus non irradiés et ceux exposés à 250 et 500 Gy à laquelle ils présentaient une survie de 83,8 % (SD \pm 10,1 %). Pour les individus *A. vaga*, une diminution du taux de fertilité en fonction de la dose était observée. En comparaison avec les individus desséchés qui présentaient une capacité de reproduction de 96 %, le taux de fertilité des individus *A. vaga* irradié à 500 Gy chute significativement à 29,4 % (SD \pm 3,4 %) (Fig. 23 B; groupe a - b). La stérilité des deux espèces n'a pas été atteinte à ces doses testées, car les individus irradiés étaient toujours capables d'engendrer une descendance.

3.2.2 Réparation rapide et similaire de l'intégrité génomique chez l'espèce *H. atacama* après une irradiation de 500 Gy aux ions Fer

Ces rayonnements à haut LET sont plus nocifs pour les cellules à cause des dommages qu'ils induisent. Ils pourraient donc avoir un impact sévère sur le génome ou sur l'efficacité du mécanisme de réparation d'ADN. Pour évaluer la perte de l'intégrité du génome face à des doses de 250 Gy et 500 Gy de Fe, une première PFGE a été réalisée sur le même nombre d'individus *H. atacama* desséchés. Ensuite, une deuxième PFGE a été faite sur base des mêmes échantillons dans le but d'analyser la cinétique de la réparation d'ADN.

Tout d'abord, cette première PFGE (Fig. 24A) a révélé des fragments de grandes tailles (\geq 2.200 kbp) pour les individus hydratés (Fig. 24A ; voie 2). Les individus transportés et non irradiés étaient similaires et présentaient un nombre élevé de ces fragments de grandes tailles (Fig. 24A ; voie 3-4). L'apparition des fragments de petite taille (de 225 kbp à 750 kbp) était proportionnelle à la dose. Ils étaient donc plus importants après une exposition à 500 Gy (Fig. 24A ; voie 5).

Deuxièmement, la cinétique de réparation de l'ADN était analysée (Fig. 24 B). Les individus hydratés présentaient un génome avec un nombre élevé de fragments de grandes tailles \geq 2.200 kbp (Fig. 24B ; voie 2). Ce signal était encore plus intense chez les individus desséchés et transportés (Fig. 24B ; voie 3). Les individus irradiés aux ions Fe présentaient beaucoup de fragments de taille réduite entre 225 à 1000 kbp, comme cela a été montré précédemment (Fig. 24B ; voie 4). Après 2h, leur nombre était déjà réduit alors que les fragments de taille \geq 2.200 kbp étaient de nouveau présent (Fig. 24B ; voie 5). Cette tendance semblait se confirmer au cours du temps car après une semaine, les fragments de taille \geq 2.200 kbp étaient plus nombreux (Fig. 24B ; voie 9). Une restauration de cette intégrité génomique, même après une irradiation aux ions lourds, était alors observée ainsi que la persistance de fragments de faible taille.

3.3 Impact de l'exposition au vide, aux variations de température et optionnellement aux UVs sur les rotifères bdelloïdes

Ce mémoire a également pour objectif de préparer à la mission Rotifer-A qui enverra en dehors de l'ISS, différentes espèces de rotifères bdelloïdes. Ainsi, nous avons simulé les conditions spatiales auxquels seront soumis ces rotifères pour évaluer quelle espèce serait capable de supporter un environnement aussi extrême. *H. atacama*, étant l'espèce étudiée ici, a été sélectionnée pour être exposée à long terme au vide, aux variations de température et sélectivement aux UVs. Ces données ont été comparés à celle de l'espèce *A. vaga*, l'espèce de

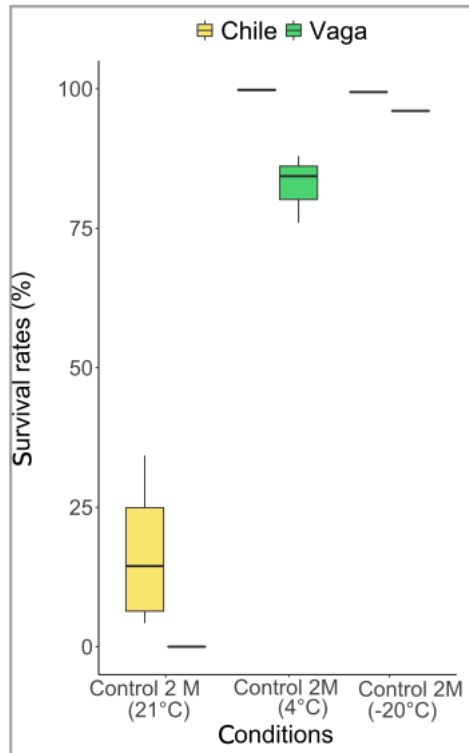


Figure 25 : Taux de survie (%) illustré par un box-plot des *H. atacama* (Jaune) et des *A. vaga* (Vert) desséchés pendant une période de 2 mois et stockés à des températures différentes.

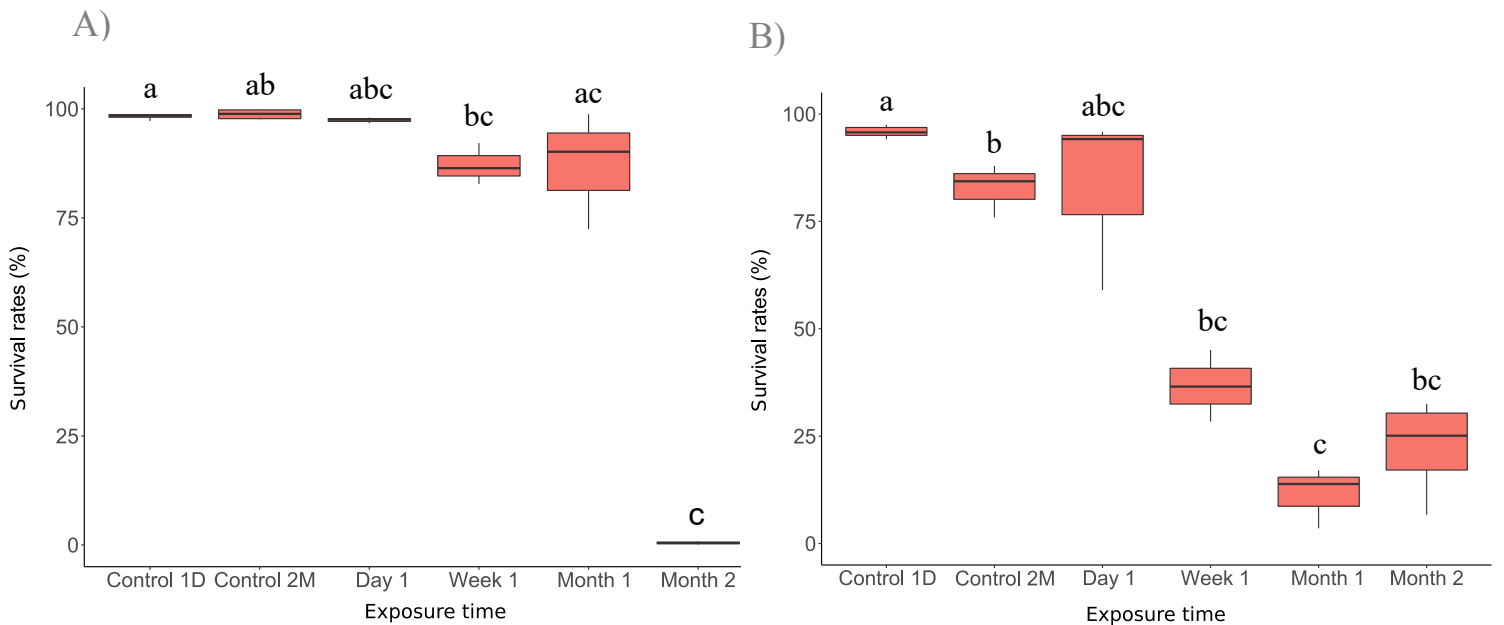


Figure 26 : Taux de survie (%) illustré par un box-plot des *H. atacama* (A) et des *A. vaga* (B) desséchés exposés au vide et aux variations de température pendant différentes périodes. La quasi-totalité des *H. atacama* sont morts après 2 mois à l'inverse des *A. vaga* qui montrent une survie plus importante. Les lettres indiquent les différences significatives entre les groupes (valeur $P < 0,05$).

référence, aussi soumise à ces conditions simulées. Ces espèces desséchées ont été placées dans le simulateur paramétré pour cette mission (voir matériels et méthodes). De nouveau, leur résistance à ces conditions spatiales ont été évaluée par la mesure de leur survie et de leur fertilité après un temps d'exposition variable.

3.3.1 Survie des *H. atacama* et *A. vaga* dans un état desséché pendant 2 mois

Tout d'abord, avant de réaliser ces mesures, *H. atacama* et *A. vaga* ont été desséchés pendant deux mois qui est la plus longue période d'exposition, et cela dans le but d'affirmer que les possibles diminutions de survie observées ne seront pas des conséquences de la dessiccation, mais l'impact des conditions spatiales simulées. Ces contrôles ont donc également permis de mesurer la survie et la fertilité des individus desséchés à long terme.

Ces deux espèces de rotifères ont subi une dessiccation sur une période de 48h et ont ensuite été stockées à une température de 21°C, 4°C et -20°C pendant une période de 2 mois. La survie de ces deux espèces a été mesurée avec réhydratation (Fig. 25). La survie des individus *H. atacama* desséchés pendant un jour était de 98,2% (SD ± 0,5 %) alors que, après 2 mois dans un état desséchés à 21°C, la survie des *H. atacama* a diminué à 16,84% (SD ± 13,92%). Quant aux *A. vaga* desséchés, aucun n'était vivant après deux mois à 21°C. Lorsque les *H. atacama* et *A. vaga* desséchés étaient stockés à 4°C pendant deux mois, le taux de survie était resté stable. Il a été évalué respectivement à 99,7% (SD ± 0,08%) et de 82,7% (SD ± 6,1%). Une survie importante était également observée pour les *H. atacama* et *A. vaga* desséchés pendant 2 mois à -20°C et était évaluée respectivement à 99,4% et à 96%.

La fertilité des contrôles a été explorée en vis-à-vis des données d'expositions obtenues et sera présentée par la suite.

Le contrôle, qui est généralement utilisé dans les comparaisons avec les conditions expérimentales, est caractérisé par un stockage à 21°C comme les conditions de culture, mais pour celles de longues durées, les contrôles à 4°C ont été sélectionnés.

3.3.2 Persistance de l'espèce *A. vaga* après 2 mois d'exposition au vide et aux variations de température

Comme indiqué précédemment, la survie et la fertilité de l'espèce *H. atacama* et *A. vaga* ont été évaluées après des expositions au vide et aux variations de température à des temps variables de un jour, une semaine, un mois et deux mois. Pour cette expérience, les UVs n'ont pas été appliqués, mais occultés à l'aide d'un filtre. Les échantillons étaient d'abord soumis à une dessiccation de 48h pour être ensuite placé dans une capsule en aluminium qui restera dans le simulateur pour une période déterminée.

Premièrement, la survie des rotifères bdelloïdes exposés aux conditions spatiales simulées a été mesurée. Face au vide et aux variations de température, la survie diminuait avec le temps d'exposition. Cette capacité de survivre variait en fonction de l'espèce. La survie globale était supérieure pour les *H. atacama* (Fig 26 A). Par rapport aux individus desséchés pendant une journée avec une survie moyenne respective de 98% (SD ± 0,5%), les individus desséchés exposés pendant une semaine ont montré une diminution significative de la survie (Fig. 26A ; groupe a - bc). Cette survie restait stable après un mois puisque les individus présentaient une survie moyenne de 87% (SD± 13,4%). Après 2 mois passés dans ces conditions spatiales simulées, une petite centaine d'*H. atacama* ont survécu. Le taux de survie final observé était de 0,5% (SD ± 0,37%).

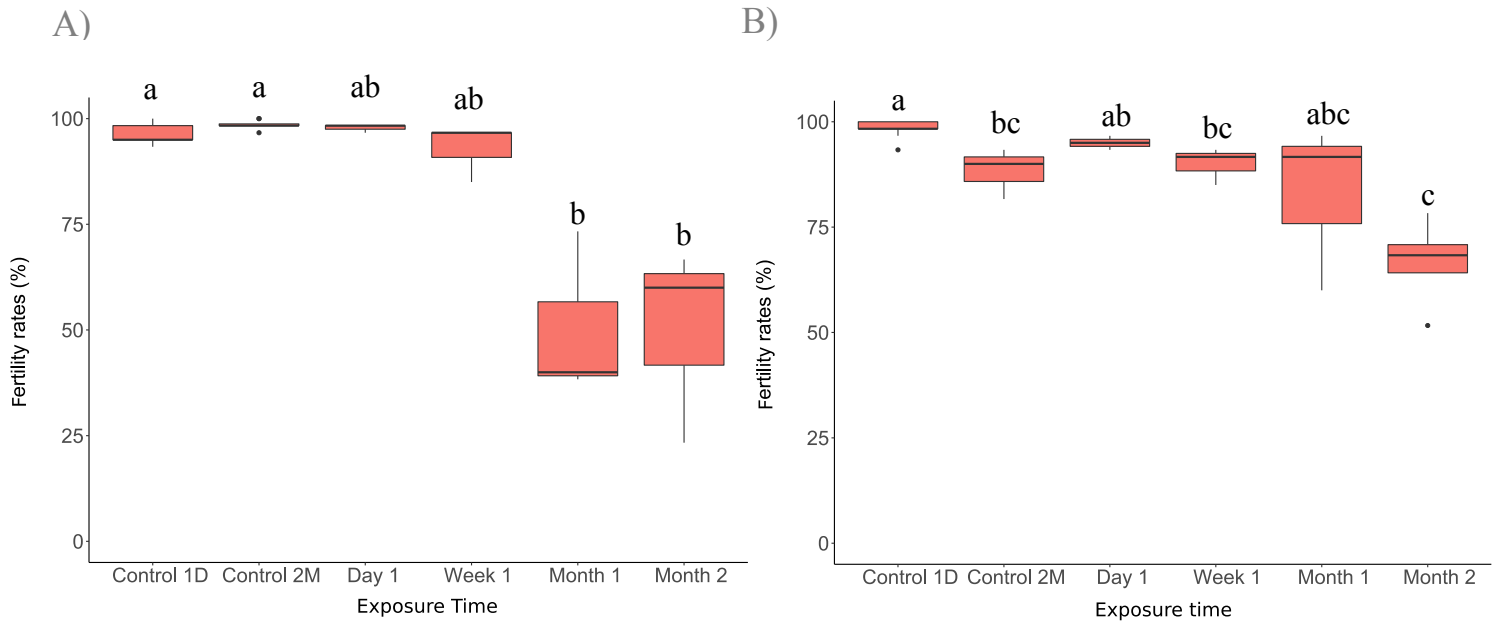


Figure 27 : Capacité de reproduction (%) illustré par un box-plot des *H. atacama* (A) et des *A. vaga* (B) desséchés exposés au vide et aux variations de température pendant différentes périodes. La quasi-totalité des *H. atacama* sont morts après 2 mois à l'inverse des *A. vaga* qui montrent une survie plus importante. Les lettres indiquent les différences significatives entre les groupes (valeur $P < 0,05$).

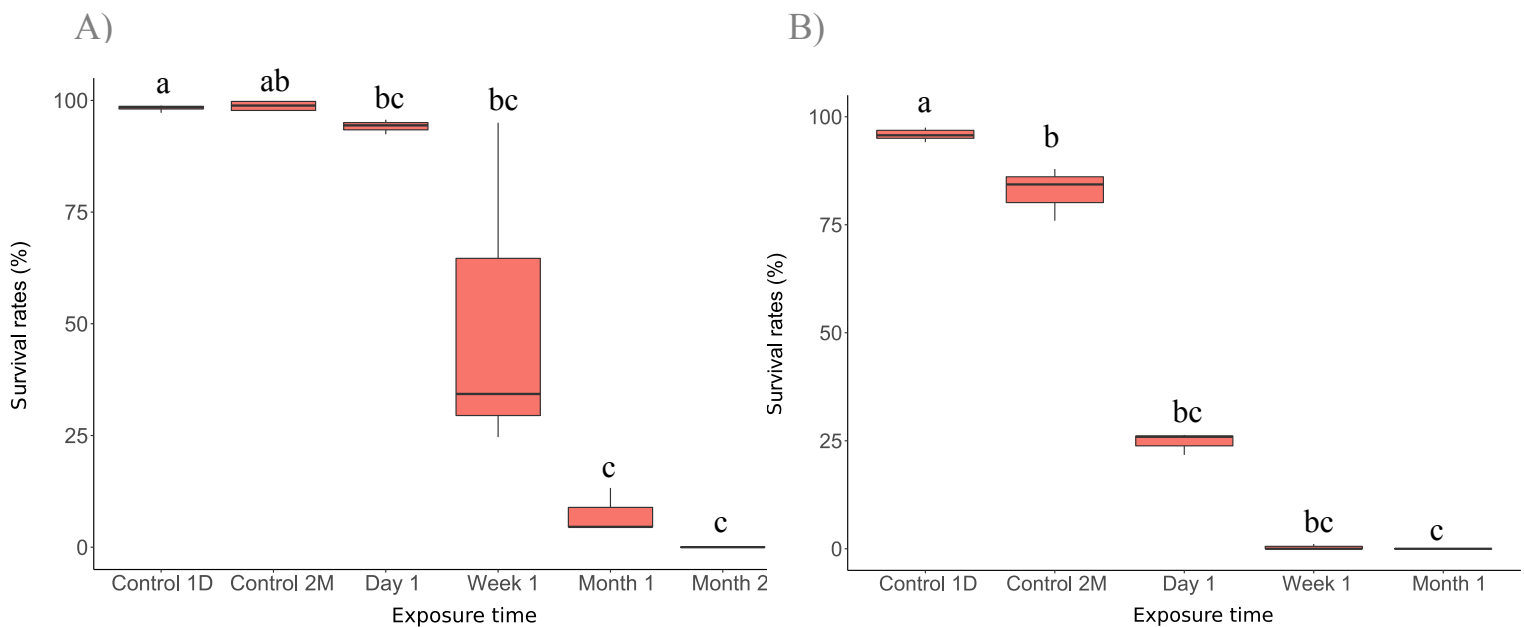


Figure 28 : Taux de survie (%) illustré par un box-plot des *H. atacama* (A) et des *A. vaga* (B) desséchés exposés au vide, aux variations de température et aux UVs pendant différentes périodes. Après une semaine, la plupart des *A. vaga* sont morts. Les lettres indiquent les différences significatives entre les groupes (valeur $P < 0,05$).

Cependant, la persistance dans le temps était meilleure pour *A. vaga* (Fig 26 B). Les individus *A. vaga* desséchés pendant un jour, mais non exposés présentaient une survie élevée de 95,7 % (SD \pm 1,2 %) qui diminuaient légèrement après 2 mois passés desséchés à 82,7 % (SD \pm 6,1 %). Après une semaine d'exposition, les individus *A. vaga* desséchés présentaient un taux de survie significativement réduit de 36,7 % (SD \pm 8,3 %) par rapport au contrôle desséché pendant un jour (Fig. 26B ; groupe a - bc). Les individus survivaient de moins au moins face au temps d'exposition. Après deux mois, la survie a chuté significativement à 22,3 % (SD \pm 11,6 %) mais des individus vivants étaient encore présents (Fig. 26B ; groupe a - bc).

3.3.3 Capacité de reproduction maintenue après 2 mois d'exposition au vide et aux variations de température pour les deux espèces

Deuxièmement, la capacité de se reproduire suite à une exposition au vide et aux variations de température chez *H. atacama* et *A. vaga* a été mesurée (Fig 27). Une diminution de la fertilité était observée pour les deux espèces plus le temps de l'exposition était important.

Les individus *H. atacama* desséchés pendant un jour présentaient un taux de fertilité moyen de 96,48 % (SD \pm 2,27 %) (Fig 27A). Il n'y a pas eu de différence significative de la capacité de reproduction chez ces individus exposés jusqu'à une période d'une semaine qui était estimée à 92,7 % (SD \pm 6,7 %). Après un mois, le taux de fertilité moyen a diminué significativement à 50 % et s'était maintenu au même pourcentage après 2 mois d'exposition (Fig. 27A ; groupe a - b). Les écarts-types étaient élevés après un et deux mois d'exposition et étaient respectivement de \pm 19,7 % et 23,3 %. La stérilité n'a pas été atteinte pour les *H. atacama* après des périodes de longues expositions puisque certains individus continuaient d'engendrer une population. Cette stérilité n'a pas non été plus atteinte par les individus *A. vaga*. Les individus *A. vaga* desséchés pendant un jour présentaient un taux de fertilité moyen de 98,1 % (SD \pm 2,1 %) (Fig 27B). Une différence significative entre ces individus desséchés et les individus exposés pendant une semaine et deux mois a été observé (Fig. 27B ; groupe a - bc - c). Ces derniers présentaient une survie respective de 89,9 % (SD \pm 4,4 %) et de 66,6 % (SD \pm 11 %).

3.3.4 Persistance de l'espèce *H. atacama* après un mois d'exposition au vide, aux variations de température et aux UVs

Toujours dans le but d'évaluer l'impact de l'environnement spatial sur les espèces sélectionnées, les rayonnements solaires ou UV (représentant tous les types d'UVs : UVA, UVB, UVC) ont été ajouté. Cette association est importante, car généralement les effets d'expositions sont étudiés indépendamment les unes des autres. Nous allons étudier ici l'effet de la superposition d'expositions sur les espèces *H. atacama* et *A. vaga*. Des résultats préliminaires ont montré l'absence de survie après l'exposition d'une monocouche d'*A. vaga* aux UVs reproduits par le simulateur. Les expériences ultérieures ont donc été réalisées à l'aide d'un filtre UV ne laissant passer que 0.01% du flux lumineux.

De nouveau, les échantillons ont subi une dessiccation de 48 heures pour être ensuite soumis à différents temps d'exposition aux conditions spatiales simulées. La survie de ces individus a été alors mesurée 48h après réhydratation (Fig 28). L'ajout d'UVs à une concentration de 0,01% induisait une diminution plus importante et plus rapide de la survie pour les deux espèces. Les individus *H. atacama* desséchés pendant un jour présentaient une survie moyenne de 98,3 % (SD \pm 0,5 %)(Fig 28A). Le taux de survie restait majoritairement stable même deux mois desséchés. Après une semaine, les individus exposés aux UVs présentaient un taux de survie moyen de 51,3 % avec un écart-type élevé de \pm 38,1. D'autres répliques seront alors nécessaire pour préciser ces données. Après un mois, le taux de survie avait diminué significativement à

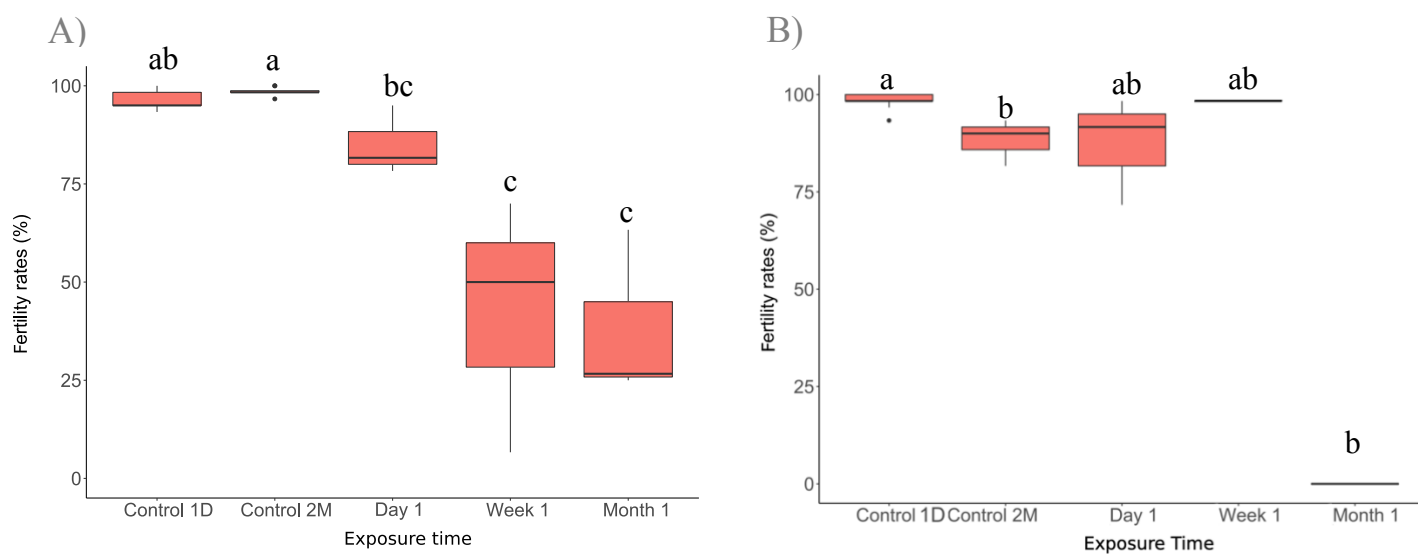


Figure 29 : Capacité de reproduction (%) illustré par un box-plot des *H. atacama* (A) et des *A. vaga* (B) desséchés exposés au vide, aux variations de température et aux UVs pendant différentes périodes. Après un mois, tous les *A. vaga* étaient morts donc la fertilité n'a pas pu être obtenue. Les lettres indiquent les différences significatives entre les groupes (valeur $P < 0,05$).

7,4 % par rapport aux *H. atacama* desséchés (Fig. 28A; groupe a et c). Cependant, aucun des individus exposés pendant 2 mois n'a survécu.

Les individus *A. vaga* ont été plus impactée par l'exposition supplémentaire aux UVs (Fig 28B) puisque la survie après un jour d'exposition avait déjà diminué significativement à 24,6 % (SD \pm 2,5 %) par rapport aux individus desséchés pendant un jour qui présentaient une survie de 95,7 % (SD \pm 1,2 %) (Fig. 28B ; groupe a - bc). La survie diminuait encore après une semaine, car seules quelques centaines d'individus desséchés ont survécu, réduisant d'autant plus la survie à 0,37 % (SD \pm 0,67 %). Un mois d'exposition a été fatal à tous les individus *A. vaga*.

3.3.5 Capacité de reproduction maintenue pour les deux espèces *H. atacama* et d'*A. vaga*

De nouveau, la capacité de se reproduire est mesurée après une exposition au vide, aux variations de température ainsi qu'aux UV. L'effet à long terme des UVs sur la fertilité a été mesuré dans le but de savoir si la plupart des mécanismes de résistance sont maintenus. L'ajout d'UV nous permettra de savoir également si certains stress peuvent engendrer des réponses spécifiques.

Une diminution de la capacité de reproduction chez les *H. atacama* proportionnellement avec la durée des expositions (Fig. 29) a été observée. En effet, à partir d'un taux de fertilité de 96,48 % (SD \pm 2,3 %) et 98,5 % (SD \pm 1 %) pour les individus *H. atacama* desséchés après un jour et deux mois, la capacité de reproduction avait diminué significativement à 42,2 % après une semaine d'exposition combinée aux UVs (Fig. 29A ; groupe ab - a - c). La variabilité entre les taux de survie des trois réplicas était importante puisqu'elle est mesurée à \pm 32,4 %. Il en va de même pour les individus exposés durant un mois qui présentaient un taux de survie moyenne de 38,3 % mais une variabilité trop importante de \pm 21,6 %.

À l'inverse, le taux de fertilité des *A. vaga* à la suite d'exposition au UV pendant un jour et une semaine restait importante et constante (Fig. 29B). La capacité de reproduction des individus desséchés pendant un jour a été évaluée à 98,1% (SD \pm 2,1 %) et diminuait significativement pour les individus desséchés pendant une période à long terme de 2 mois (Fig. 29B ; groupe a – b). Après une semaine, un des trois réplicas des individus exposés aux UVs ne présentaient aucun individu vivant. Le deuxième présentait uniquement trois individus vivants qui sont morts deux semaines plus tard. Seul le dernier réplicas présentait le nombre adéquat de 60 individus vivants isolés dont la fertilité après un mois a été mesurée et valait 96,6%. Cependant, ce résultat doit être confirmé puisque la fertilité n'est mesurée que sur un réplica. La capacité de reproduction des individus exposés après un mois n'a pas été évaluée puisqu'aucun individu n'avait survécu.

3.4 Impact de l'irradiation aux rayons X : évaluation de la carbonylation des protéines

La dessiccation et les radiations induisent des dommages au niveau cellulaire. Parmi ces dommages, l'oxydation des protéines, telle que la carbonylation, est potentiellement un dommage fondamental qui peut avoir des conséquences importantes sur les cellules. Le but de cette expérience est donc de tester si une espèce sensible aux radiations accumule plus de groupements carbonyles qu'une espèce résistante. Ceci nous permettrait de confirmer le rôle de l'oxydation dans la sensibilité à la radiation de certaines espèces. Les résultats précédents

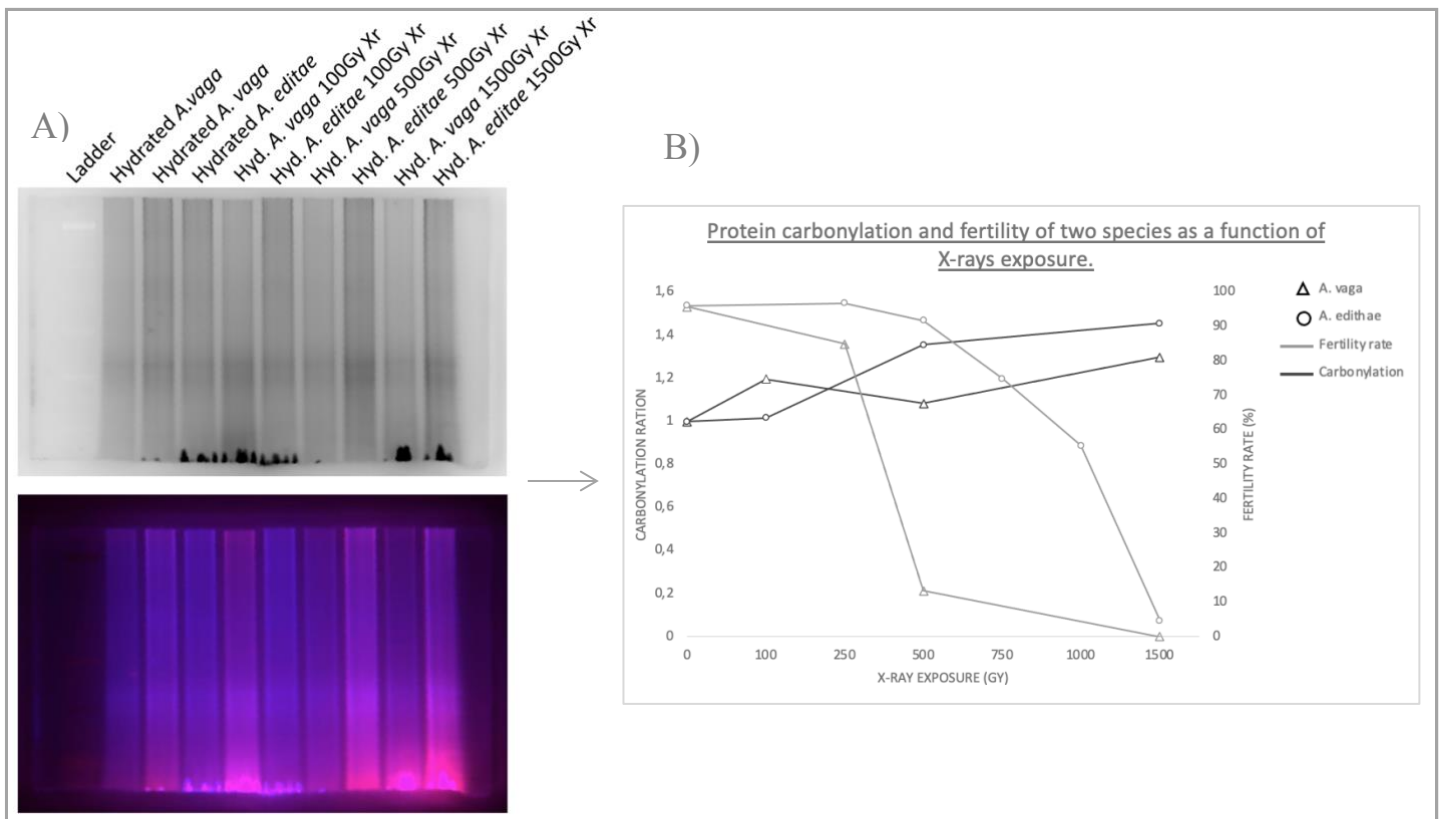


Figure 30 : Analyse de la présence de carbonylation sur les protéines des *A. vaga* et *A. editae* irradiés à différentes doses. (A) Illustration de l'imagerie du gel avec un bleu correspondant aux protéines en général et le rouge à la carbonylation sur les chaînes latérales des protéines. (B) Les valeurs de l'intensité de la fluorescence montrant la carbonylation et les valeurs du taux de fertilité observés chez ces mêmes individus soumis aux mêmes doses sont mises en parallèle pour étudier une corrélation des résultats.

montrent que même si *R. rotatoria*, radiosensible, répare son ADN, cette espèce est néanmoins rapidement stérilisée. Une des hypothèses serait donc que certaines protéines soient carbonylées et non fonctionnelles, ce qui affecterait la fertilité. Ainsi, nous avons sélectionné deux espèces résistantes à la dessiccation, l'une étant stérile à des doses avoisinantes 500 Gy de rayon X, *Adineta editae*, espèce trouvée dans l'Antarctique, et l'autre étant stérile à des doses avoisinantes de 1000 Gy, *A. vaga*. Tous les individus sont restés hydratés pour mesurer uniquement l'impact de la radiation.

La figure 30A montre la révélation d'un gel après traitement à différents fluorochromes. Les protéines ont été quantifiées avec le fluorochrome Cy2-NHS qui émet dans le bleu et la carbonylation est quantifiée à l'aide du fluorochrome Cy5-Hz qui émet dans le rouge. Afin de pouvoir comparer les conditions entre elles, il était important de faire un ratio entre la quantité de protéines et la quantité de carbonylation (Fig 30B). Ces données ont été mises en graphe en plus des données de fertilité pour chaque espèce.

Les individus *A. editae* desséchés non irradiés présentaient une capacité de reproduction moyenne de 95,8 %. Cette capacité a diminué à une dose de 500 Gy et a été évaluée à 13,4 % (SD \pm 15,7 %). Ces individus étaient totalement stériles à 1500 Gy. Le taux de fertilité des *A. vaga* desséchés non irradiés a été mesuré à 95,6 % et restait stable jusqu'à une exposition de 500 Gy. Ce taux diminuait ensuite à 77 % à 1000 Gy. La capacité de se reproduire des individus *A. vaga* chutait alors pour arriver à 7% après 1500 Gy. Une diminution du taux de fertilité a été observée pour chaque espèce à des doses différentes.

La tendance observée ici est une augmentation du pourcentage de la carbonylation en fonction de la dose. Les dommages oxydatifs de l'espèce *A. vaga* et *A. editae* hydratés et non irradiés présentaient une intensité émise par le fluorochrome Cy5-Hz de 1. Certaines variations ont été observées. La carbonylation de l'espèce *A. vaga* a augmenté pour les individus irradiés à 100 Gy et est égale à 1,2. Ce taux était plus important que pour les individus irradiés à 500 Gy qui présentaient une intensité de 1,08. Le taux de carbonylation était le plus élevé pour les individus irradiés à 1500 Gy et a été mesuré à 1,3. Pour les individus *A. editae*, le taux de carbonylation restait stable à une exposition de 100 Gy mais augmentait fortement après une exposition de 500 Gy et a été évalué à 1,35. La carbonylation était d'autant plus élevée pour ces individus irradiés à une dose de 1500 Gy et est de 1,45.

3.5 Dynamique spatio-temporelle de la réparation d'ADN au sein des cellules germinales

3.5.1 Hypothèses

Nous avons montré précédemment que suite à une irradiation, les cellules somatiques accumulent les cassures doubles brins qui se réparent au cours du temps après réhydratation. Les cellules germinales peuvent accumuler ces mêmes cassures, mais la cinétique et l'efficacité de la réparation d'ADN au sein de ces cellules est inconnue. Nous avons alors essayé de savoir si la réparation de l'ADN de l'œuf a lieu dans la mère au niveau de l'oogenèse ou lorsqu'il est pondu et se développe. Analyser les cellules germinales est un challenge, car leur nombre est réduit au sein du rotifère (30 cellules pour un adulte de 100 cellules). Tout comme l'analyse des cellules somatiques, nous avons utilisé une PFGE pour étudier l'intégrité du génome des cellules germinales, mais cette fois-ci, des œufs précédemment isolés de mère irradiée ont été placés dans les puits. Nous avons donc analysé si les cassures doubles brins étaient toujours

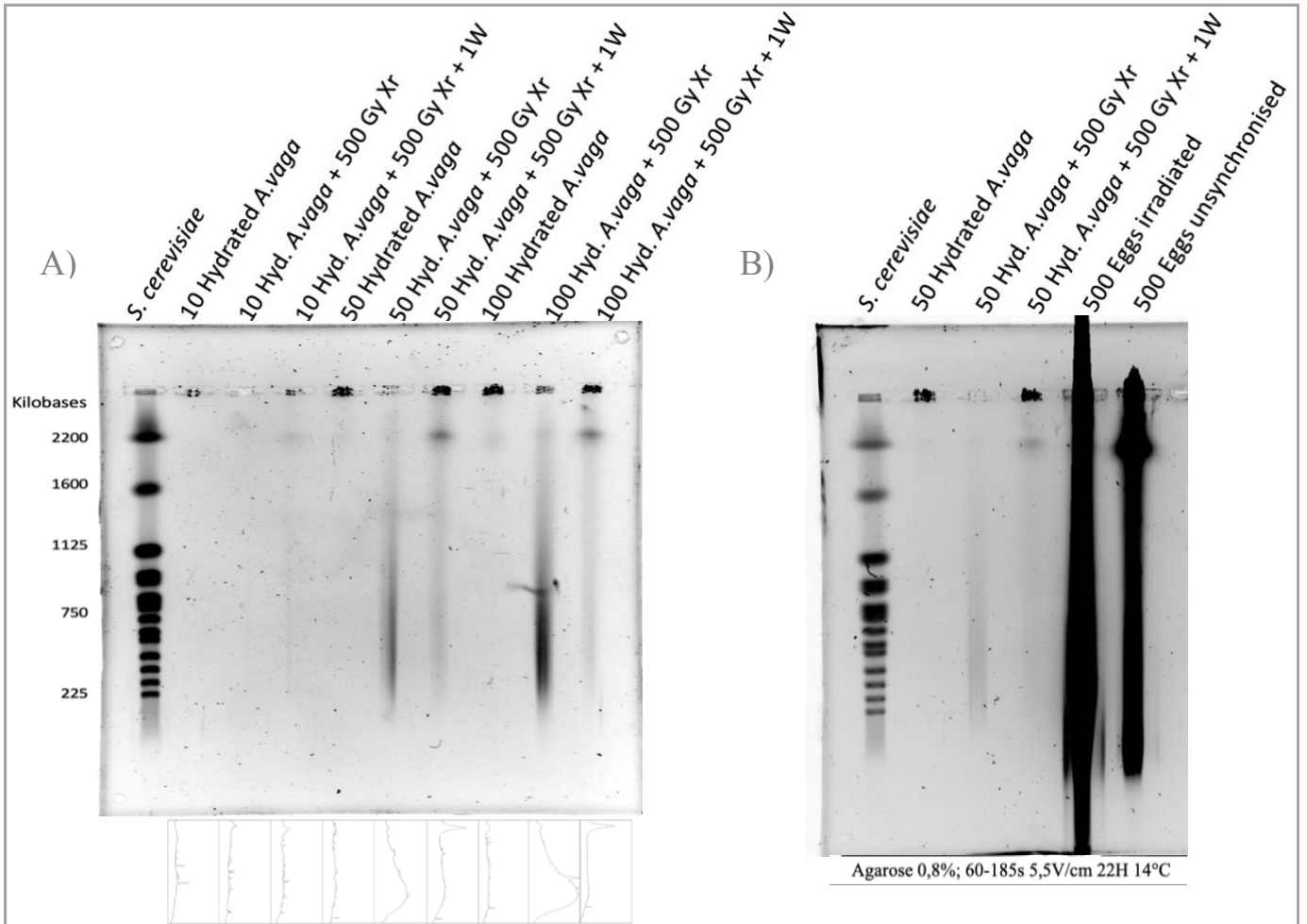


Figure 31 : Évaluation de la sensibilité du signal d'une PFGE. (A) Pour mesurer cette sensibilité, un nombre différent d'individus é été placé dans les puits : 10, 50, 100. Un signal é était observé pour chaque individus. (B) La surexposition du signal a permis de voir plus clairement le signal des individus ayant subis ou non des stress. Les graphes représentent l'intensité du SyberGold pour chaque bandes.

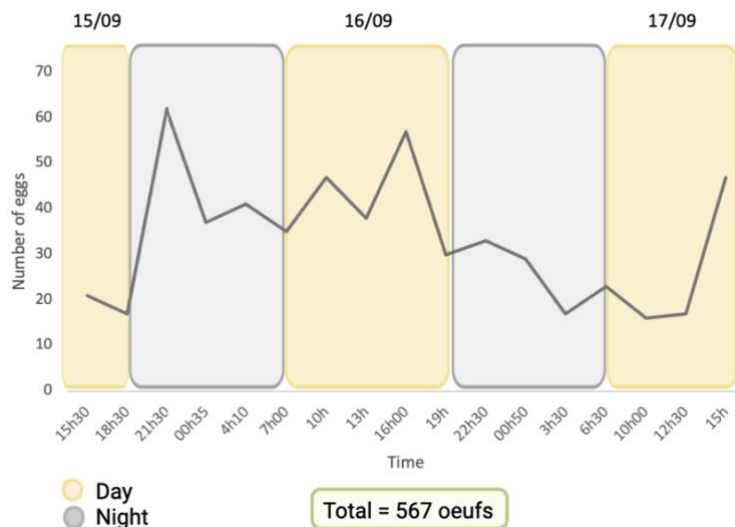


Figure 32 : Collecte en fonction du temps d'environ 500 œufs au stade précoce venant de mère irradiés à 500 Gy de rayons X. La récolte a duré 3 jours (le 15, 16, 17 septembre) et deux nuits. Les œufs é étaient isolés toutes les 3 heures et stockés à -80C dans de la solution A.

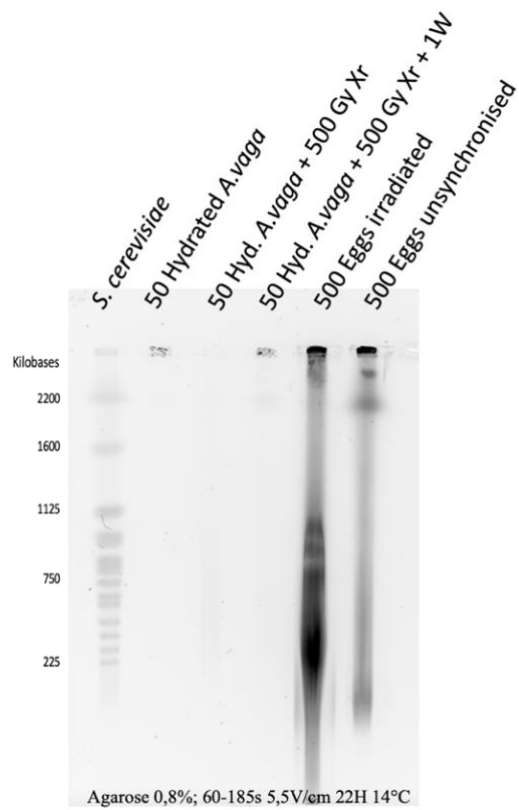


Figure 33 : PFGE analysant la présence ou l'absence de dommages génétiques au sein des cellules germinales. Le signal des trois premières est assez faible mais lors de la surexposition, ils sont visibles. L'échantillon des œufs en stade précoce venant de mère irradiés a été perdu.

présentes chez un œuf pondu à un stade précoce, c'est-à-dire un nombre faible de divisions cellulaires.

Dans un premier temps, nous voulions étudier la sensibilité de la PFGE en termes de détection, car la collecte des œufs représente un nombre de divisions cellulaires réduit, induisant la quantité d'ADN plus faible. Pour ce faire, nous avons réduit le nombre d'individus dans les puits à 10, 50 et 100 individus (Fig. 31). Pour tester la sensibilité minimale de ce signal, nous avons utilisé comme répliques des *A. vaga* hydratés, irradiés à 500 Gy et enfin des individus d'une semaine post-irradiation. Ces conditions sont utilisées, car l'étude des cassures doubles brins provoquée par l'irradiation et leur réparation a déjà été étudiée et évaluée précédemment (Hespeels et al. 2020) ce qui nous permettra de savoir quel signal doit être observé (Fig 31A). Un signal était observé pour les puits chargés avec 100 individus, et les fragments obtenus étaient ceux attendus. Les individus hydratés présentaient uniquement un nombre réduit de fragments de grande tailles (≥ 2200 kbp). À l'inverse, des fragments de faibles tailles de 225 à 750 kbp étaient présents pour les individus irradiés. Pour ceux analysés une semaine après l'irradiation, les fragments de grandes tailles (≥ 2200 kbp) sont présents pour un nombre réduit de fragments de faibles tailles (entre 225 à 750 kbp) ce qui traduirait une réparation des cassures double brins. Les puits chargés avec 50 individus présentaient une diminution du signal par rapport à ceux de 100 individus, mais la présence des différents fragments dans les différentes conditions était semblable. La migration du génome des 10 individus étaient cependant plus difficile à discerner.

En modifiant l'exposition (Fig 31 B), nous avons détecté un signal pour 50 individus et ce signal correspondait à celui attendu. Des fragments de tailles importantes (≥ 2200 kbp) ont été observés chez les individus hydratés et chez les individus une semaine après irradiation, mais en nombre plus élevé. Ces derniers présentaient également des fragments de faibles tailles (entre 225 à 750 kbp) plus nombreux que chez les individus hydratés. Les irradiés montraient uniquement des fragments de faibles tailles dû à des cassures simples brins.

3.5.2 Intégrité génomique des cellules germinales de l'espèce *A. vaga*

Un signal avec 500 œufs pourrait être observé s'ils se répartissent dans le puit mais à l'inverse, si les 10 individus se condensent, le signal pourrait être moins important. Ces paramètres ont été appliqués à l'obtention des œufs. Un protocole d'oogenèse a alors été développé (voir matériels et méthodes). Nous avons fait une expérience dans lequel nous avons collecté des œufs au stade précoce de mère irradié (Fig. 32). D'autres collectes ont été réalisées pour faire cette PFGE : des œufs irradiés, servant de contrôles positifs, et des œufs au stade plus tardifs qui proviennent de mères hydratées, servant de contrôle négatif. Malheureusement au cours de la technique, l'échantillon contenant les 500 œufs au stade précoce venant de mère irradiée a été perdu au cours de la manipulation. Par contre, les échantillons contrôles ont été utilisés pour vérifier ce signal.

Les trois premières voies ont été chargées avec 50 individus *A. vaga* adultes respectivement hydratés, irradiés et une semaine post-irradiation (Fig. 33). Aucun signal n'est visible, car l'intensité du signal des œufs est trop élevée. Le signal se révèle alors après une surexposition de l'ADN. Les résultats obtenus sont fidèles à ceux observés précédemment. Les individus hydratés présentaient des fragments de taille importante (≥ 2200 kbp) alors que les irradiés présentaient des fragments de tailles réduits entre 225 à 750 kbp. Après une semaine, une absence des fragments de tailles réduites est observée ainsi qu'une augmentation des fragments de taille importante (≥ 2200 kb).

Le résultat de la migration du génome des œufs à stade précoce irradiés et des œufs à stade tardif non irradiés était conforme à ce qui était attendu. Les œufs irradiés présentaient essentiellement des fragments de tailles réduites entre 225 à 750 kbp et les œufs non irradiés présentaient essentiellement des fragments de tailles élevées (≥ 2200 kbp). Cependant, le signal était trop élevé.

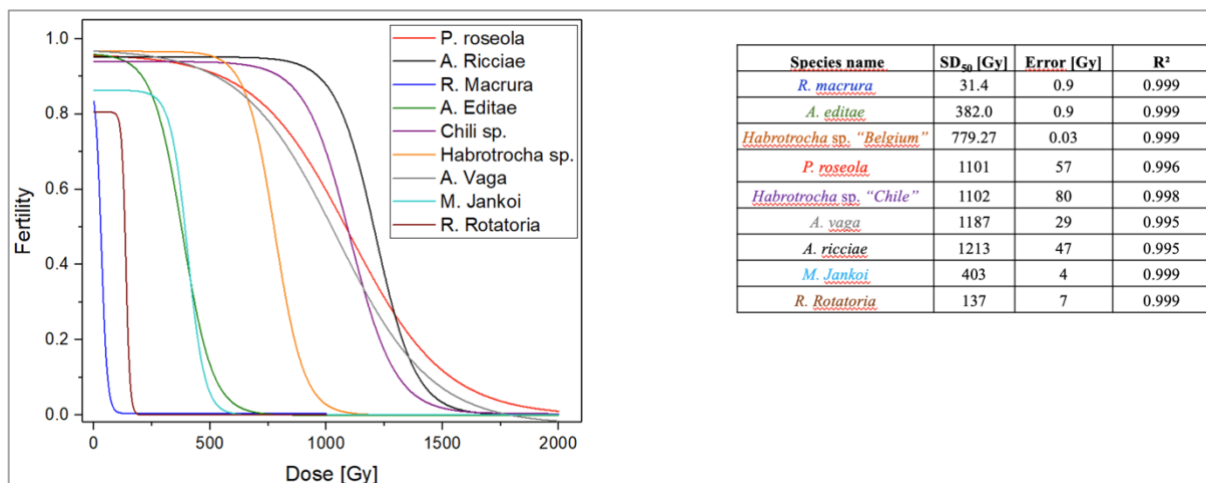


Figure 34 (Hespeels *et al* - non publié) : Comparaison des capacités de reproduction des différents genres et espèces de rotifères bdelloïdes. La SD 50 (dose stérilisante) est indiquée avec le risque d'erreur. Le R² est un indicateur utilisé pour juger la qualité de la courbe. *Habrotrocha* sp. « Chile » correspond au *H. atacama*. A correspond au genre *Adineta*. P correspond au genre *Philodina*. R correspond au genre *Rotatoria*. M correspond au genre *Machrotrachela*.

IV. Discussion et perspectives

4.1 Radiorésistance des rotifères bdelloïdes aux rayons X

L'envoi d'organismes dans l'espace permet d'étudier l'adaptation de la vie dans des conditions extrêmes dans le but d'améliorer notre compréhension des stratégies utilisées par la vie pour survivre dans des endroits éloignés et hostiles. Les études approfondies des effets biologiques du champ de rayonnement dans l'espace sont nécessaires afin d'évaluer les risques de ces rayonnements. Les expériences d'astrobiologie sont dorénavant basées sur des organismes ayant la capacité de résister à des doses de radiation importante telles que *Bacillus Subtilis*, *Deinococcus radiodurans* ou encore les tardigrades. Les rotifères sont aujourd'hui inclus dans cette continuité de modèles à l'exposition spatiale possédant également une résistance non négligeable aux radiations ionisantes. La prochaine mission incluant ces multicellulaires est prévue pour 2025. Lors de cette prochaine expédition, il est prévu d'exposer hors de l'ISS différentes espèces de rotifères.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons mené une étude sur *H. atacama*, une espèce résistante à la dessiccation et trouvée dans l'un des environnements les plus secs de la planète. Cette espèce est définie comme un candidat probable pour ce futur voyage. Nous avons alors commencé par évaluer sa résistance à la dessiccation et sa radiorésistance à des doses croissantes de rayons X en mesurant sa capacité de survivre et de se reproduire. Ces individus survivaient jusqu'à la plus haute dose testée de 2000 Gy avec un pourcentage de survie de 99,4% (SD \pm 0,38 %) (Fig. 29A). Sa capacité de se reproduire ne présentait aucun impact jusqu'à 500 Gy mais presque la totalité des individus était stérile à 1000 Gy (Fig. 20B).

Ces résultats ont été comparés à ceux d'une espèce vivipare et sensible à la dessiccation, *Rotaria rotatoria*, vivant dans un milieu constamment hydraté, ce qui nous a permis d'explorer la diversité des tolérances aux radiations. Cela apportera des éléments de réponses pour élucider les mécanismes qui rendent certaines espèces résistantes et d'autres non. L'hypothèse émise est que la radiorésistance des bdelloïdes pourrait être une conséquence de la résistance à la dessiccation, tels qu'il est généralement admis pour *D. radiodurans*. Dans ce contexte, les bdelloïdes exposés à une longue période de dessiccation ou exposés à un stress sévère comme une température élevée ou forte, une exposition au soleil pourrait être associée à une plus grande capacité à faire face à la dessiccation et aux radiations par la suite. Cependant, dans ce travail, nous avons montré que *R. rotatoria* présente un taux de survie élevé après une exposition à des rayons X (Fig. 19A). En effet, le taux de survie, 48h après l'irradiation, était de 98,8% pour une dose de 1000 Gy. Malgré ce taux de survie élevé, la capacité de reproduction a été rapportée comme étant affectée à des doses plus faibles (Fig. 19B). Si aucun impact n'a été signalé pour des doses égales ou inférieures à 100 Gy, les individus *R. rotatoria* étaient complètement stériles après une exposition à 250 Gy ou plus. Avec une SD50 (dose permettant de stériliser 50% de la population) de 137 Gy (\pm 7 Gy), cette espèce s'est avérée être significativement plus sensible aux radiations en termes de reproduction que l'espèce *H. atacama* avec une SD50 de 1102 Gy (\pm 80 Gy) ou que l'espèce *A. vaga* cultivée depuis des années en laboratoire avec une SD50 de 1187 (\pm 29 Gy) (Fig. 34). Si nous comparons ces données avec celles précédemment acquises sur d'autres rotifères, *R. rotatoria* se rapproche d'une autre espèce de bdelloïde, *R. macrura* avec une SD50 de 31 Gy (\pm 1 Gy). Le genre *Rotatoria*, associé à une absence de résistance à la dessiccation, semble être caractérisé par des SD50 plus basses (entre 30 et 145 Gy) comparées aux autres espèces de rotifères bdelloïdes qui se situent entre 380 et 1250 Gy (Hespeels et al., 2021 en préparation).

Nous pouvons également avancer que les différences observées à la tolérance à la radiation ionisante entre les espèces résistantes à la dessiccation et les espèces sensibles à la dessiccation peuvent être liées à l'état desséché ou hydraté des animaux exposés. En effet, l'état hydraté peut engendrer des dommages supplémentaires à cause de la radiolyse de l'eau. Cependant, Hespeels et al (2021) ont démontré que le taux de survie et de fertilité ne variait pas après des irradiations entre des *A. vaga* hydratés et desséchés. Ces données ont également été confirmées sur une autre espèce : *A. editae* (Hespeels et al., in prep). Cette absence de protection liée à la dessiccation lors de l'irradiation a aussi été démontré chez l'eutardigrade *Richtersius coronifer* (Jönsson et al., 2005).

Cette radiosensibilité de la fertilité est probablement associée au type de cellules. Étant eutéliques, les cellules somatiques des bdelloïdes ne se divisent pas au contraire des germinales qui se multiplient activement durant le développement. Ces cellules nécessitent une récupération de l'intégrité du génome et sont donc plus sensibles aux réparations incomplètes (Beltran-Pardo et al., 2015). Cette sensibilité de la fertilité aux radiations a été aussi observée chez une espèce de tardigrade, *Milnesium tardigradum* qui survit à des doses élevées de rayonnements et à la dessiccation, mais qui est stérile à une dose inférieure de 1000 Gy (Horikawa et al., 2006). Cependant ce n'est pas toujours le cas.

Ces données de fertilité consolident l'idée que la résistance aux radiations des bdelloïdes est liée à leur capacité à faire face à la dessiccation, certaines espèces de bdelloïdes ayant pu perdre ce trait lors de la colonisation d'habitats aquatiques. Cette grande différence de radiosensibilité présente pour *R. rotatoria* et *R. macrura* en termes de fertilité pourrait être aussi liée à leur mode de reproduction vivipare. Toutes les autres espèces testées comme résistantes à la dessiccation étaient ovipares. Pour répondre à cette interrogation, il faudrait étudier une espèce sensible à la dessiccation, mais ovipare tel que l'espèce *Adineta grandis* qui est précisément ovovivipare.

En nous intéressant aux espèces résistantes à la dessiccation, nous nous apercevons qu'il y a une variation de la radiorésistance. En effet, par exemple, certaines espèces de bdelloïdes, comme *A. editae* venant de l'Antarctique, se sont avérées être résistantes à la dessiccation, mais sont plus sensibles aux radiations que *A. vaga* et *H. atacama* puisque cette espèce présentait la SD50 la plus basse (Hespeels 2021 en préparation). Il y a également *Adineta ricciae* qui présentait une résistance à la dessiccation plus faible avec un taux de survie de 80%, mais qui présente une SD50 aussi importante que celle de l'espèce *A. vaga*. Leur résistance à la radiation serait donc toujours due aux adaptations cellulaires prévues pour la résistance à la dessiccation. Cependant, la différence de radiotolérance entre espèces résistantes à la dessiccation pourrait résulter d'autres accommodations qui divergeraient en fonction de l'espèce. Nous pouvons émettre comme hypothèse que les différences entre espèces pourraient être la conséquence d'une variation d'efficacité du système antioxydant ou de la présence d'un nombre plus important de gènes inclus dans la préparation ou une régulation plus élevée de l'une à l'autres acquise par HGT. Nous pourrions alors faire une étude de l'importance de l'oxydation entre chacune des espèces (par la technique utilisée) ou des études fonctionnelles du génome.

Nous ne pouvons pas négliger que cette différence de radiotolérance entre espèces pourrait être due à de la variabilité liés aux expériences en laboratoire.

4.2 Mécanisme de réparation des cellules somatiques des rotifères bdelloïdes aux rayons X

Nous voulions vérifier si la différence de radiorésistance et la réduction significative de la stérilité observée à des doses inférieures à 250 Gy chez *R. rotatoria* pouvaient être liées à une diminution de la capacité à réparer les dommages de l'ADN. Nous avons ainsi évalué par une PFGE si chez des individus stérilisés, les protéines de réparation sont toujours capables de réparer l'ADN au niveau somatique. La cinétique de réparation de l'ADN obtenue chez *R. rotatoria* a été ensuite comparée avec celle obtenue pour l'espèce résistante à la dessiccation et non stérilisée par une dose de 800Gy *H. atacama*.

Chez *R. rotaria*, après 8 heures, nous observons une diminution de l'intensité des fragments de tailles comprises entre 225 kbp et 750 kbp (Fig 21A ; voie 5). La restauration des fragments génomique de hauts poids moléculaires (taille ≥ 2200 kbp) a été évaluée jusqu'à 48h après irradiation (Fig 21A ; voie 7). Ces résultats suggèrent un réassemblage de fragments génomiques illustrant un mécanisme de réparation d'ADN. Une majeure partie de la réparation de l'ADN est effectuée dans les 24 heures suivant l'irradiation. Elle semble ensuite ralentir puis s'arrêter en laissant certaines cassures doubles brins puisqu'il y a toujours des fragments de faible taille après une semaine (225 kbp et 750 kbp).

De manière générale, l'intensité du signal est plus élevée pour la PFGE des *H. atacama* puisqu'elle est réalisée avec un nombre plus élevé d'individus. Indépendamment de la résistance, *H. atacama* et *R. rotatoria* possèdent une capacité à réparer l'ADN dans les cellules somatiques qui s'activent dans les premières heures et qui se stabilisent dans les 48 heures. Quant aux individus *Adineta vaga*, la cinétique de réparation de l'ADN est aussi comparable à celle obtenue pour ces espèces (Hespeels et al. 2020). Cette absence d'impact sur la réparation d'ADN chez une espèce sensible à la dessiccation nous montre que même si une espèce est stérile, sa capacité de réparer son ADN en partie au sein des cellules somatiques persiste. Cela suggère que les protéines de réparation sont toujours fonctionnelles à une dose de 800 Gy et cette efficacité de réparation somatique n'a pas diminué malgré une sensibilité à la dessiccation. Cette observation va à l'encontre de ce que démontrait Krisko et al, (2012) puisqu'ils montraient que la fertilité était due à un taux de carbonylation important qui inactivait les protéines. Cependant, la cinétique de réparation de l'ADN fournie ici ne reflète que la réparation de l'ADN au niveau somatique et il n'est pas connu si une réponse différente peut être rapportée au niveau germinale, ce qui serait logique au vu de l'impact important sur la fertilité chez *R. rotatoria*. Nous pourrions évaluer la réparation au sein des cellules germinales par la technique PFGE sur œufs, mais après certaines périodes de temps mais également une technique d'hybridation in situ sur des œufs.

4.3 Mécanisme de réparation des cellules germinales de l'espèce *A. vaga* aux rayons X

Les études cytologiques présentées précédemment (M. Terwagne et al, en préparation) démontrent que, après l'irradiation d'un adulte, il y a une incorporation de nucléotides fluorescents dans les cellules germinales, indiquant une synthèse d'ADN. Ce signal est retardé, indiquant que ce processus se déroule lors de l'oogenèse. Cependant, il n'a pas été démontré que l'œuf pondu, issu d'un animal irradié, est exempt de cassures ou qu'il y a eu réparation des DSBs. Cette réparation pourrait se dérouler avant la maturation de l'œuf, autrement dit s'il a lieu chez la mère, ou lorsque l'œuf commence à se diviser après la ponte. Ainsi, pour en savoir plus, l'intégrité génomique d'œufs en stade précoce après irradiation a été étudiée en utilisant la PFGE. Une PFGE (Fig 33), analysant la présence de cassures doubles brins, pourrait montrer soit une présence de fragments de taille élevée (≥ 2200 kbp) indiquant une réparation d'ADN déjà réalisée au sein de la mère soit une présence de fragments de faible taille (entre 225 kbp

et 750 kbp). Malheureusement, l'échantillon a été perdu. La manipulation des œufs reste délicate. À ce jour, il est indispensable d'isoler les œufs manuellement et individuellement. Grâce à une approche expérimentale mise au point lors de ce mémoire, il a été possible d'isoler 500 œufs en 48h. Cependant, lors de la manipulation, il a été observé une polymérisation rapide et un durcissement de l'agarose en présence des œufs contrairement aux expériences précédentes. En conséquence, il n'a pas été possible de manipuler les échantillons. Des optimisations sont nécessaires pour éviter ce problème. Une solution pourrait être de travailler avec des échantillons préalablement chauffés à 56°C afin de réduire la polymérisation. Lors du prélèvement des œufs, il a pu être observé que chez des individus irradiés, le développement embryonnaire est plus lent par rapport aux individus non irradiés ce qui suggère un effet sur la vitesse de division. Les rayonnements pourraient alors perturber la réparation ou engendrer d'autres impacts. Cela pourrait être intéressant de quantifier cette différence, par exemple par suivis de division.

Les contrôles positifs et négatifs regroupant respectivement des œufs irradiés et des œufs hydratés à stade tardif ont tout de même été analysés par PFGE (Fig 33). Nous avons pu observer que les œufs isolés à un stade précoce puis irradié présentaient un génome composé de fragments de taille réduite entre 225 kbp et 750 kbp. À l'inverse, les œufs isolés à un stade tardif et non irradiés présentaient majoritairement des fragments de taille importantes (≥ 2200 kbp). Cependant, un bruit de fond était observé au vu de l'importance du signal de l'ADN. Cette augmentation du signal pourrait être causée par des problèmes de manipulation engendrant plus de cassures ou par de l'ADN contaminant présent lors du prélèvement des œufs.

La principale amélioration à apporter à cette technique est la limitation de la contamination par de l'ADN étranger. Lors du prélèvement des œufs, une contamination a été observée dans les puits. Celle-ci pourrait être limitée par l'ajout de certains traitements antibactériens ou fongiques tels que Penstrep ou Amphotéromycine B. Cependant, il faudrait s'assurer de l'absence de problèmes au niveau du développement des individus ou de leur intégrité génomique. Lorsque cette expérience sera reproduite, nous analyserons les cassures de l'échantillon contenant les œufs précoce de mère irradiées, mais également d'un autre contrôle négatif car les œufs à un stade tardif non irradiés ont été sélectionnés en fonction du temps imparti. Uniquement des œufs à stade précoce permettraient une comparaison plus précise entre les différents échantillons.

4.4 Efficacité du système anti-oxydant

Nous avons précédemment observé une radiosensibilité importante de certaines espèces à la radiation ainsi qu'une persistance du mécanisme de réparation à une dose stérilisante. Grâce au protocole permettant d'isoler des œufs, il serait intéressant d'analyser la réparation d'ADN au niveau germinale lorsque l'espèce est stérile. En effet, les espèces ovipares continuent à pondre des œufs qui ne se développeront pas (Suppl. Fig. 2).

La sensibilité aux radiations pourrait être due à une oxydation importante engendrant des dommages tels que la carbonylation. La détection des groupements carbonyles est couramment utilisée pour analyser le degré de dégradation des protéines dans des conditions de stress oxydatif. Pour évaluer le rôle de ces dommages dans la radiorésistance, le degré de carbonylation a été mesuré chez deux espèces, *A. editae* et *A. vaga*.

Suite à des doses croissantes de rayons X, les données de fertilité montraient que *A. editae* est plus radiosensible que l'espèce *A. vaga* car une diminution de sa fertilité est observée à plus ou moins 500 Gy et celle de *A. vaga* diminue à partir de 1000 Gy (Fig. 30). Les SD50 de ces deux espèces sont respectivement de 382 Gy ($\pm 0,9$ Gy) et de 1187 Gy (± 29 Gy) (Fig 34). En

comparaison avec les données obtenues par Krisko *et al* (2012), nous pouvons observer la même augmentation du degré de carbonylation avec la dose reçue entre deux espèces de rotifères (Fig. 30). Cependant, les deux espèces n'accumulent pas de la même façon ces dommages pour une même quantité de protéines mesurées. Un taux plus important de groupements carbonyles après une irradiation aux rayons X est observé chez l'espèce radiosensible, *A. editae* par rapport à l'espèce plus radiorésistante, *A. vaga*.

Cette radiosensibilité pourrait être due à l'absence du système antioxydant ou à sa saturation à des doses importantes. La sensibilité de la fertilité aux rayonnements ionisants pourrait donc être due à la priorité donnée par ces individus à la résistance au stress oxydatif afin d'assurer le maintien des cellules somatiques plutôt que la capacité de reproduction, mais cela reste à vérifier (Latta, Tucker, and Haney 2019). Nous pourrions émettre l'hypothèse que le système de réparation de l'ADN des rotifères reste performant, mais l'augmentation de la quantité de dommages pourrait être difficile à surmonter et diminuerait son efficacité. La question de la différence radiorésistance entre les espèces reste ouverte.

Le fait d'avoir un outil qui permet de quantifier la carbonylation ouvre des perspectives. Tout d'abord, il faudrait faire des répliques de cette expérience pour confirmer les données car nous avons pu observer une incohérence pour le individus irradiés à 100 Gy. Des rotifères exposés à d'autres types de rayonnements ou au vide pourraient présenter une oxydation différente et seront alors à investiguer. D'autres espèces radiorésistantes et radiosensibles pourront alors être utilisées pour mesurer l'impact de ce dommage. Attention, les expériences sont dépendantes de notre capacité à cultiver les rotifères. Durant ce mémoire, un protocole de culture a été réalisé sur *R. rotatoria* qui serait un bon modèle pour évaluer le lien entre l'oxydation et la radiosensibilité chez une espèce sensible à la dessiccation. Cette espèce particulière était complexe à cultiver et leur nombre était réduit. Il a fallu fournir un mélange précis de différents apports en nutriments, les nourrir fréquemment et ne pas laisser un nombre trop réduit d'individus par conditions. Afin d'étudier si la survie de cette espèce nécessite le contact avec un certain microbiote, le milieu d'une condition propice à la vie de cette espèce pourrait être transféré sur des individus en déclin. Cela permettrait de mettre en évidence certaines bactéries ou autres organismes importants pour la vie des rotifères.

4.5 Radiorésistance de l'espèce *H. atacama* et *A. vaga* aux ions lourds tels que le Fe

Étant pressentis comme candidats pour les prochaines missions spatiales, *H. atacama* et *A. vaga* ont été exposés à d'importantes doses d'un autre type de rayonnements qui sont à haut LET comme les ions lourds, particulièrement le Fe. L'étude de ces IR, important dans les GCR, est fondamentale car peu d'informations sur leur impact n'a été recensé chez la plupart des organismes et pourtant il s'agit d'un des rayonnements les plus présents. Nous avons donc analysé l'importance de leur stratégie de résistance par mesure de leur survie et de leur fertilité face à des doses de 250 et 500 Gy, correspondant à la campagne d'irradiation limitée du GSI. Les résultats obtenus pour *A. vaga* ont été réalisés par J. Berthe dans le but d'avoir le plus de données sur différentes espèces et de pouvoir déterminer l'implication des résultats.

La survie de l'espèce *H. atacama* restait stable (au-dessus de 95 %) même après une irradiation allant jusqu'à 500 Gy (Fig. 23A). À l'inverse, *A. vaga* présentait une diminution de sa survie jusqu'à 73 % suite à une exposition de 500 Gy. La tendance était semblable pour le taux de fertilité (Fig. 23B). La capacité de se reproduire pour *H. atacama* diminuait progressivement en fonction de la dose, mais présentait un taux de fertilité toujours au-dessus de 75 %. Au contraire, la diminution de la capacité de reproduction pour l'espèce *A. vaga* était beaucoup plus importante puisqu'elle était mesurée à 29,4 % pour une irradiation de 500 Gy.

Les individus *H. atacama* semblent être moins affectés en termes de survie et de fertilité que les individus *A. vaga*. Ces espèces, vivants dans un des endroits les plus exposés aux UVs, pourraient avoir développé une protection contre certains types de dommages spécifiques ou contre un nombre élevé de dommages. Cela pourrait être également dû à un système antioxydant important qui protégerait davantage ces protéines. Nous pourrions alors analyser son taux de carbonylation près irradiation. Au niveau de la reproduction, les données démontrent un impact différent des rayonnements à haut LET par rapport aux faibles LET. L'exposition à des doses très élevées de ce rayonnement cosmique, ce n'est pas une limitation pour la vie des rotifères dans l'espace.

Cependant, lors d'une expérience antérieure, ces résultats n'ont pas été obtenus. La survie et la fertilité des individus *A. vaga* étaient supérieures à ceux obtenus ci-dessus. Nous ne pouvons donc pas exclure une erreur de manipulation.

4.6 Mécanisme de réparation de l'espèce *H. atacama* face aux ions lourds tels que le Fer

Les conséquences sur l'état du génome induites par ces rayonnements pourraient être différentes de ceux observés pour les LET faibles. En réalisant une PFGE (Fig. 24A) sur *H. atacama* desséchés, il a été observé que plus doses augmentait, plus le nombre de fragments de taille réduite augmentaient (225 kbp et 750 kbp), illustrant un nombre grandissant de cassures doubles brins. La cinétique de réparation de l'ADN a ensuite été évaluée par l'étude des cassures double brins par PFGE avec une exposition à une dose de 500 Gy (Fig. 24 B). Les fragments de taille réduite (225 kbp et 750 kbp) étaient essentiellement présents pour les individus irradiés à 500 Gy. Après 2h, la restauration des fragments de taille importante (≥ 2200 kbp) pouvait déjà être observée et s'intensifiait plus le temps après réhydratation augmentait. La cinétique de la réparation d'ADN arrive assez rapidement, car après 2h30, une majeure partie des fragments de grande taille ≥ 2200 kbp sont apparents. Ce mécanisme est similaire à ceux déjà observés chez l'espèce *A. vaga* que ce soit pour ce type de rayonnements, pour des protons ou pour des rayons X. L'impact du transport n'a été que partiel. La perte d'intégrité du génome engendré par ces rayonnements n'empêche pas la restauration des cassures doubles brins ou des fragments de grandes tailles. Au sein des cellules somatiques, les dommages sont réparés au moins partiellement. La cinétique de la réparation ne semble donc pas être sensible aux rayonnements à haut LET.

Cette similarité du mécanisme de réparation de l'ADN pourrait être due à la résolution à laquelle sont effectués les PFGE. Seul l'ADN de haut poids moléculaire est migré avec ces paramètres de PFGE. Une autre PFGE à une autre résolution pourrait être faite pour analyser les cassures réalisées à des distances proches (inférieure à 225 Kbp). Cela nous permettrait d'évaluer s'il y a éventuellement une différence dans la reconstitution des fragments de faibles tailles induits par des hauts LET. La radiosensibilité observée pour les individus *A. vaga* après une irradiation de ce type de rayonnements pourrait être due à une altération du mécanisme de réparation. Cela pourrait être exploré en réalisant une PFGE des individus *A. vaga* irradiés. Cependant, il est attendu que ce mécanisme se déroule de la même manière que chez les *H. atacama* et que la raison de cette différence se situerait autre part. Pour déterminer la nature de leur mécanisme de réparation de l'ADN, une étude de la génétique fonctionnelle pourrait être envisagée ainsi que d'autres études pour s'informer sur la réponse à ces rayonnements LET faibles ou élevés.

La plupart des doses appliquées aux rotifères durant ce mémoire sont considérablement plus importantes que celles trouvées sur Terre. Il est remarquable d'observer des organismes étant

capables de survivre à des doses de radiation auxquels ils n'ont jamais pu être exposés durant leur évolution. Ces résultats nous ramènent à la question de l'origine de cette radiorésistance et notamment que celle-ci pourrait être une conséquence d'autres mécanismes de résistances ayant lieu lors du développement normal de ces animaux. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé des irradiations de 800 Gy de rayon X et 500 Gy d'ions de fer. Même dans le cadre d'expérience d'astrobiologie, ces doses restent fortement plus élevées en comparaison avec les doses attendues. Dans l'ISS, le débit de dose est d'environ 20 $\mu\text{Sv/h}$ soit 200 fois plus élevé que sur Terre (Moreels et al. 2020). Pour être le plus pertinent possible pour les vols spatiaux, les rayonnements doivent être délivrés à faible débit mais pendant une longue période. Les expositions sont donc plus importantes non seulement pour documenter l'impact de dose élevée liée à des voyages plus lointains, mais également une accumulation de la dose qui surviendrait avec le temps passé dans l'espace. De plus, nous possédons des modèles qui permettent l'étude des hautes doses. Leur utilisation permettrait donc d'analyser si les effets observés à petites doses, comme un impact important des dommages directs, sont similaires, mais avec une plus forte intensité ou sont différents et ferait intervenir des dommages indirects en grand nombre.

4.7 Radiorésistance de rotifères bdelloïdes face au vide, aux variations de température et alternativement aux UV

Après « Rob-1 » en 2019 et « Rob-2 » en 2020, un autre vol spatial est prévu pour 2025 (« Rotifer-A ») durant lequel, différentes espèces seront envoyées à l'extérieur de la station spatiale internationale. L'impact de l'environnement spatial sans les protections telles que le blindage sera évalué sur différentes espèces. En vue de cette mission, *H. atacama* et *A. vaga* ont été exposés à des conditions spatiales simulées tels que le vide spatial, les variations de température et sélectivement les UV, qui sont paramétrés pour une exposition à orbite basse (400 km d'altitude). Ce mémoire s'inscrit dans les expériences préliminaires visant à optimiser le processus expérimental et à valider la possibilité de ce type d'expérience. Nous avons donc analysé si les rotifères bdelloïdes peuvent survivre et continuer à se reproduire après pareille exposition. *H. atacama*, habitué aux environnements extrêmes puisqu'il est trouvé dans le désert de l'Atacama, a été sélectionné au vu de sa radiorésistance prononcée aux différents rayonnements. Ces résultats ont été comparés à ceux de l'espèce *A. vaga*, précédemment envoyés dans l'espace. Cette comparaison nous permettrait de réviser la position de l'espèce *A. vaga* comme modèle.

Dans un premier temps, des expositions au vide et aux variations de température ont été réalisées sur *H. atacama* et *A. vaga* pendant des périodes de un jour, une semaine, un mois et deux mois (Fig. 26). Nous avons pu observer une survie globale plus élevée pour *H. atacama* par rapport à l'espèce *A. vaga*. Cependant, les individus *A. vaga* sont plus résistants à long terme, car ils étaient toujours vivants après 2 mois au contraire des individus *H. atacama*. La capacité de se reproduire a été plus impactée pour les individus *H. atacama* que pour les individus *A. vaga* pour lesquels elle reste stable (Fig. 27).

Dans un second temps, des expositions au vide, aux variations de température ainsi qu'aux UV ont été effectuées. Nous avons pu observer une survie plus importante pour les individus *H. atacama* puisque leur survie était de 7,4 % après un mois alors que les individus *A. vaga* étaient pratiquement morts après une semaine ; avec une survie de 0,37 % (SD \pm 0,67%) (Fig. 28). La capacité de reproduction des individus *H. atacama* diminuait à 42,2 % (SD \pm 32,4%) après une semaine mais se maintient alors que pour quelques individus *A. vaga* trouvés vivants, la fertilité n'était presque pas modifiée par rapport aux contrôles (Fig. 29). Ces résultats ont été observés pour un seul réplicas car les individus *A. vaga* des deux autres réplicas après une semaine étaient tous morts. Ces durées d'exposition seront alors à reproduire.

Nous observons donc que les UV ont un impact important sur la survie et sur la fertilité des deux espèces. Ces données sont cohérentes avec celle obtenues par Hespeels *et al* (2014) qui démontre également que leur impact est plus important que ceux des protons. Cela démontre la nocivité des UVs qui pourraient être liés aux dommages qu'ils induisent tels qu'une source importante de DSBs, de lésions oxydatives puisqu'ils engendrent la création de ROS (Hall et al. 2014) ainsi que des dommages spécifiques tels que des dimères de cyclobutane-pyrimidine (CPD) (Fischer et al. 2013). Les individus *H. atacama* semblent être plus résistants à ce type de dommages. Dû à leur environnement natif, il pourrait posséder des adaptations supplémentaires pour résister aux UVs pendant une période de temps importante. Pour évaluer leur stratégie de résistance face à ces expositions, nous pourrions réaliser une PFGE illustrant leur DSB et cinétique de réparation ainsi qu'une étude du taux de carbonylation.

Il est intéressant de noter qu'une expérience supplémentaire. Cette expérience comprenait l'exposition des individus *A. vaga* au vide, aux variations de température, aux UVA et UVB. En l'absence d'UVC, la survie de cette espèce augmentait à 17,38 % (SD ± 13,18). Il en va de même pour la capacité de reproduction qui augmentait à 53,33 % (SD ± 12,47%°. Les UVC pourraient alors être responsables des dommages engendrant la perte de capacité de reproduction et puis la mortalité.

Les individus *A. vaga* uniquement desséchés après 2 mois à 21°C étaient tous morts ce qui est en contradiction avec Hespeels et al (2014) (Fig 25). Lors de cette étude, une survie de 75% avait été obtenue après 84 jours de dessiccation. Cependant, les rotifères avaient été maintenus dans une humidité relative contrôlée de 41%. Lors de nos expériences, ce paramètre n'a pas été contrôlé. Cette variable explique vraisemblablement une partie de la baisse de la survie puisque cela peut favoriser le développement de contaminations. Le stockage à long terme, tel que deux mois, des conditions contrôles (individus desséchés) peut se révéler problématique. Pour minimiser ces contaminations mêmes au sein des cultures hydratées qui ont été utilisées après dessiccation pour notre expérience, nous pourrions réaliser améliorer les conditions de laboratoire telles que davantage de lavages ou améliorer le type de nourriture. Une utilisation d'antibiotiques ou d'antifongiques pourrait être envisagée après vérification de leur impact sur les cultures. Lorsque les rotifères desséchés sont placés à 4°C, nous observons une augmentation de la survie. Cela doit être associé à une meilleure préservation des molécules des bdelloïdes ainsi qu'à une limitation du développement de contaminants.

La survie et la fertilité des contrôles hydratés dans les graphiques de ces expériences n'ont pas été réalisés mais ces taux correspondaient à ceux en culture qui dépendent de l'âge des individus.

Dans le but de documenter le plus possible la résistance à ces conditions, différentes espèces de bdelloïdes pourraient également être exposées. D'autres perspectives pour cette expérience seraient d'évaluer la survie et la fertilité face à un temps d'exposition plus long comme 6 mois ou face à une augmentation de la concentration reçue d'UV. Une analyse des dommages induits par ce type d'expositions pourrait également être réalisée par la suite.

4.8 Tentative

Les effets délétères des UVs ont été démontrés lors de précédentes expériences d'astrobiologie sur *Bacillus subtilis* ou *Deinococcus radiodurans* ou encore sur les tardigrades ainsi que lors de ce mémoire puisque nous avons confirmé une diminution de la survie des rotifères bdelloïdes. Nous avons également montré l'impact important des expositions aux hauts LET comparé à ceux aux faibles LET. La différence de l'effet biologique observé serait due aux différents dommages induits par ces différents rayonnements. Nous avons alors réalisé la

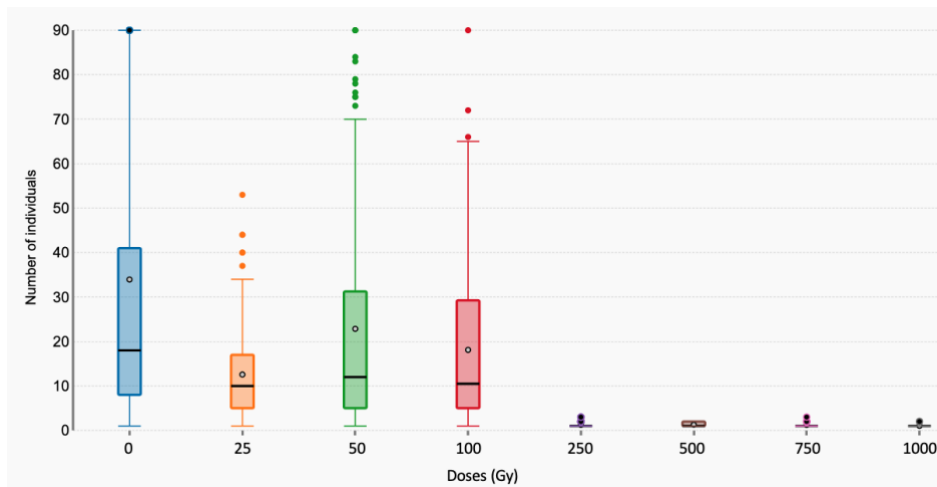
technique de détection des dommages assistée par la réparation (Rapid RADD) qui permet d'observer l'apparition d'autres dommages tels que les bases apuriques ou des lésions oxydatives (8-oxo-DG) ou les cassures simple brin à l'aide d'enzymes de réparation. Cette technique de fluorescence n'a malheureusement pas fonctionné. Cependant, suite à une vérification par NanoDrop de signal de fluorescence du fluorochrome ATTO-550, nous avons remarqué que la dilution de nos échantillons rendait l'ADN et son signal indétectable. Cette technique pourrait être reproduite avec des quantités de réactifs plus élevées.

4.9 Conclusion

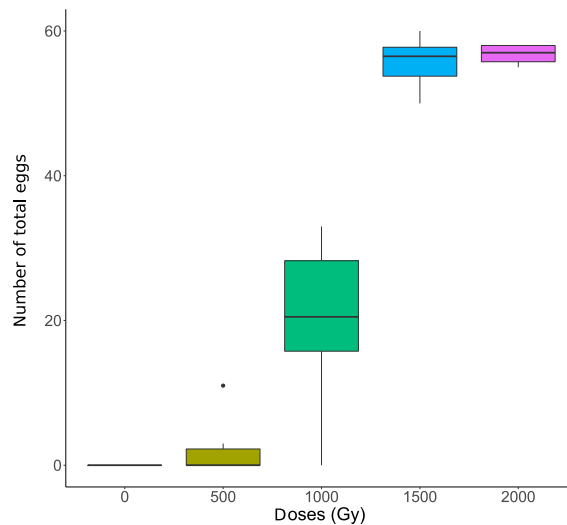
H. atacama est retenue pour les prochaines missions de voyages spatiaux au vu de leur résistance aussi bien aux faibles LET qu'au LET élevé ainsi qu'aux conditions spatiales simulées à long terme. Cette espèce constitue alors un modèle d'exobiologie au même titre que l'espèce *A. vaga*. Leur système antioxydant et leur réparation de l'ADN leur permettent d'avoir cette radiorésistance aussi importante. En fonction des résultats obtenus, non seulement certaines espèces de rotifères bdelloïdes sont retenues pour les futures missions d'exobiologie, mais également des données précieuses ont été obtenues sur des expositions à long terme. Les rotifères semblent être des organismes prometteurs dont beaucoup de leur fonction reste encore à découvrir.

Au vu de la capacité de ces multicellulaires à résister à des doses non envisageables sur Terre, certains émettent des hypothèses sur leur origine et beaucoup pense qu'elle sera liée à une possible litho panspermie supposant un transfert interplanétaire de la vie par l'intermédiaire de roches éjectées par un impact (Panitz et al, 2015). Des problèmes pratiques peuvent découler de leur habilité. Si des organismes terrestres sont capables de résister à un environnement spatial, il faudrait mettre en application des mesures pour éviter leur contamination d'écosystème extra-terrestre préservé. Les modifications engendrées par l'exposition simulée de l'environnement spatial sont étudiées afin d'essayer d'élaborer des contre-mesures pour les humains confrontés au stress de missions prolongées au sein de l'ISS et vers l'espace lointain. De plus, leur étude est toute aussi nécessaire pour la vie sur Terre, essentiellement pendant la radiothérapie du cancer car les effets métaboliques et les effets du rayonnement seraient exploités pour les objectifs thérapeutiques de guérison et pour la limitation de la croissance du cancer (Moreels et al. 2020).

V. Annexes :



Suppl Fig. 2: Nombre d'individus présent dans les puits où un seul individus irradié hydratés au rayons X avait été isolés. Un maximum de deux individus par puits étaient observés à partir des doses de 250 Gy.



Suppl Fig. 2: Nombre d'œufs pondus par les *H. atacamensis* irradiés à des doses divergentes. Aux doses élevées rendant ces individus stériles, ils pondent tout de même des œufs qui sont sans doute incapable de se développer.

VI. Bibliographie

- Alpert, Peter. 2006. "Constraints of Tolerance: Why Are Desiccation-Tolerant Organisms so Small or Rare?" *J Exp Biol* 209(Pt9): 1575–84.
- Amsellem, Jacqueline, and Claudia Ricci. 1982. "Fine Structure of the Female Genital Apparatus of *Philodina* (Rotifera, Bdelloidea)." *Zoomorphology* 100(2): 89–105.
- Bakri, Abdeljelil, Neil Heather, Jorge Hendrichs, and Ian Ferris. 2005. "Fifty Years of Radiation Biology in Entomology: Lessons Learned from IDIDAS." *Annals of the Entomological Society of America* 98(1): 1–12.
- Battista, J.R, M.-J Park, and A.E McLemore. 2001. "No Title." *Cryobiology* 43: 133–39.
- Beltran-Pardo, E. et al., 2015. "Tolerance to Gamma Radiation in the Tardigrade *Hypsibius dujardini* from Embryo to Adult Correlate Inversely with Cellular Proliferation." *PLoS One* 10(7):e0133658.
- Bentfeld, Mary E. 1971. "Studies of Oogenesis in the Rotifer, *Asplanchna* - I. Fine Structure of the Female Reproductive System." *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 115(2): 165–83.
- Benton, E R, and E V Benton. 2001. "Space Radiation Dosimetry in Low-Earth Orbit and Beyond." *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 184(1–2): 255–94.
- Birky C. W, Jr. 2010. "Positively Negative Evidence for Asexuality." *J Hered* 101(Suppl 1): S42-5.
- Boschetti, Chiara et al. 2012. "Biochemical Diversification through Foreign Gene Expression in Bdelloid Rotifers." *PLoS Genetics* 8(11).
- Browne, J, A Tunnaclije, and A Burnell. 2002. "No Title." *Nature* 416: 38–38.
- CEA. 2016. "L'essentiel Sur Les Grandeurs et Unités de La Radioactivité." <https://www.cea.fr/comprendre/Pages/radioactivite/essentiel-sur-grandeur-unites-radioactivite.aspx>.
- Cortese, Franco et al. 2018. "Vive La Radiorésistance!: Converging Research in Radiobiology and Biogerontology to Enhance Human Radioresistance for Deep Space Exploration and Colonization." *Oncotarget* 9(18): 14692–722.
- Crowe, J.H, J.F Carpenter, and L.M Crowe. 1998. "No Title." *Annu. Rev. Physiol.* 60: 73–103.
- Daly, M. J., et al. 2007. "Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance." *PLoS Biol.* 5:769–779.
- Davis, H. 1873. "A New Callidina: With the Result of Experiments on the Desiccation of Rotifers." *The montly microscopical journal* 200–209: 105–12.
- Denekamp, Nadav Y. et al. 2009. "Discovering Genes Associated with Dormancy in the Monogonont Rotifer *Brachionus plicatilis*." *BMC Genomics* 10: 1–17.
- Dobell, C. 1958. "Anton van Leeuwenhoek and His "Little Animals." In ed. Russell and Russell.
- Dueva, Rositsa, and George Iliakis. 2013. "Alternative Pathways of Non-Homologous End Joining (NHEJ) in Genomic Instability and Cancer." *Translational Cancer Research* 2(3): 163–77.
- Dure, L., III, S. C Greenway, and G. A Galau. 1981. "Developmental Biochemistry of

- Cottonseed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations as Shown by in Vitro and in Vivo Protein Synthesis.” *Biochemistry* 20: 4162–68.
- Elgindi, Mei et al. 2021. “May the Force Be with You (Or Not): The Immune System under Microgravity.” *Cells* 10(8): 21–25.
- Fischer, C., Ahlrichs, W., Buma, A., van de Poll, W. and Bininda-Emonds, O. 2013. “How does the ‘ancient’ asexual *Philodina roseola* (Rotifera: Bdelloidea) handle potential UV-B-Induced mutations ?” *J. Exp. Biol* 216: 3090-3095.
- Flot, Jean François et al. 2013. “Genomic Evidence for Aneuploid Evolution in the Bdelloid Rotifer *Adineta Vaga*.” *Nature* 500(7463): 453–57.
- Fontaneto, Diego. 2001. “Rotifera Bdelloidea.” *Systematics*: 1–11.
http://www.atbi.eu/summerschool/files/summerschool/Fontaneto_Syllabus.pdf.
- França, M. B., Panek, a D. and Eleutherio, E.C. 2007. “Oxidative Stress and Its Effects during Dehydration.” *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146(4): 621–31.
- Gasiorowski, Ludwik, Anlaug Furu, and Andreas Hejnol. 2019. “Morphology of the Nervous System of Monogonont Rotifer *Epiphanes Senta* with a Focus on Sexual Dimorphism between Feeding Females and Dwarf Males.” *Frontiers in Zoology* 16(1): 1–13.
- Gladyshev, Eugene A., and Irina R. Arkhipova. 2010. “Genome Structure of Bdelloid Rotifers: Shaped by Asexuality or Desiccation?” *Journal of Heredity* 101(SUPPL. 1): 1–29.
- Gladyshev, Eugene A., Matthew Meselson, and Irina R. Arkhipova. 2008. “Massive Horizontal Gene Transfer in Bdelloid Rotifers.” *Science* 320(5880): 1210–13.
- Gladyshev, Eugene, and Matthew Meselson. 2008. “Extreme Resistance of Bdelloid Rotifers to Ionizing Radiation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(13): 5139–44.
- Goudie, Frances, and Benjamin P. Oldroyd. 2014. “Thelytoky in the Honey Bee.” *Apidologie* 45(3): 306–26.
- Gusev, Oleg et al. 2010. “Anhydrobiosis-Associated Nuclear DNA Damage and Repair in the Sleeping Chironomid: Linkage with Radioresistance.” *PLoS ONE* 5(11).
- Hagiwara, Yoshihiko et al. 2019. “Clustered DNA Double-Strand Break Formation and the Repair Pathway Following Heavy-Ion Irradiation.” *Journal of Radiation Research* 60(1): 69–79.
- Hall Ashley, Sims, L.M and Ballantyne, J. 2014. “Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains: forensic implications. *Forensic Sci. Int. Genet.* 8: 24-32.
- Hartman, PS, and RK Herman. 1982. “Radiation-Sensitive Mutants of *Caenorhabditis Elegans*.” *Genetics* 102: 159–78.
- Havránková, Renata. 2020. “Biological Effects of Ionizing Radiation.” *Casopis Lekarů Ceskych* 159(7–8): 258–60.
- Hecox-Lea, Bette J., and David B. Mark Welch. 2018. “Evolutionary Diversity and Novelty of DNA Repair Genes in Asexual Bdelloid Rotifers.” *BMC Evolutionary Biology* 18(1): 1–25.
- Heethoff, M., R.A. Norton, S. Scheu, and M Maraun. 2009. “Parthenogenesis in Oribatid Mites (Acari, Oribatida): Evolution without Sex.” In *Lost Sex. The Evolutionary Biology*

- of Parthenogenesis, I*, ed. eds I. Schön, K. Martens, and P.J. Van Dijk. , 241–57.
- Hespeels, B. et al. 2014. “Gateway to Genetic Exchange? DNA Double-Strand Breaks in the Bdelloid Rotifer *Adineta Vaga* Submitted to Desiccation.” *Journal of Evolutionary Biology* 27(7): 1334–45.
- Hespeels, B., et al. 2015. “Against All Odds: Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalase Genes in the Bdelloid Rotifer *Adineta vaga* Were Acquired by Horizontal Gene Transfer and Are Upregulated during Desiccation.” *PLoS One* 10(7): e0131313.
- Hespeels, Boris et al. 2020. “Iron Ladies – How Desiccated Asexual Rotifer *Adineta Vaga* Deal With X-Rays and Heavy Ions?” *Frontiers in Microbiology* 11(July): 1–14.
- Horikawa, DD. et al. 2006. “Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*” *Int J Radiat Biol* 82(12): 843-8.
- Horneck, Gerda, David M. Klaus, and Rocco L. Mancinelli. 2010. “Space Microbiology.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(1): 121–56.
- Hsu, W.S. 1956. “Oogenesis in the Bdelloidea Rotifer *Philodina Roseola Ehrenberg*.” *Cellule* 57: 283–96.
- Hsu, W Siang. 1956. “OOGENESIS IN *HABROTROCHA TRIDENS* (MILNE).” *The Biological bulletin* 11: 364–74.
- Jönsson, K Ingemar, Mats Harms-Ringdahl, and Jesper Torudd. 2005. “Radiation Tolerance in the Eutardigrade *Richtersius Coronifer*.” *Int J Radiat Biol* 81(9): 649–56.
- Kanazawa, M., Nanri, T., and Saigusa, M. 2017. “Anhydrobiosis Affects Thermal Habituation in the Bdelloid Rotifer, *Adineta* sp.” *Zoolog Sci* 34(2):81-85.
- Kijak, Hanna, and Ewelina Ratajczak. 2020. “What Do We Know about the Genetic Basis of Seed Desiccation Tolerance and Longevity?” *International Journal of Molecular Sciences* 21(10).
- Konietschke, F. et al. 2015. “nparcomp: An R Software Package for Nonparametric Multiple Comparisons and Simultaneous Confidence Intervals.” *Journal of Statistical Software* 64 (9) : 1-17.
- Krisko, Anita, Magali Leroy, Miroslav Radman, and Matthew Meselson. 2012. “Extreme Anti-Oxidant Protection against Ionizing Radiation in Bdelloid Rotifers.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(7): 2354–57.
- Krisko, Anita, and Miroslav Radman. 2010. "Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*." *Natl. Acad. Sci.* 107: 14373–14377.
- Kutikova, L. A. 2003. “Bdelloid Rotifers (Rotifera, Bdelloidea) as a Component of Soil and Land Biocenoses.” *Biology Bulletin* 30(3): 271–74.
- Lampert, K. P. 2008. “Facultative Parthenogenesis in Vertebrates: Reproductive Error or Chance?” *Sex Dev* 2(6): 290–301.
- Lantin, Stephen et al. 2022. “Interstellar Space Biology via Project Starlight.” *Acta Astronautica* 190(September 2021): 261–72.
<https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2021.10.009>.
- Lapinski, Jens, and Alan Tunnacliffe. 2003. “Anhydrobiosis without Trehalose in Bdelloid Rotifers.” *FEBS Letters* 553(3): 387–90.
- Latta, L., Tucker, N. and Haney, R. 2019. “The relationship between oxidative stress, reproduction, and survival in a bdelloid rotifer.” *BMC Ecol.*19(7) : 1-10.

- Latta, Leigh C., K. Nathaniel Tucker, and Robert A. Haney. 2019. "The Relationship between Oxidative Stress, Reproduction, and Survival in a Bdelloid Rotifer." *BMC Ecology* 19(1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12898-019-0223-2>.
- Leasi, Francesca, and Claudia Ricci. 2010. "Musculature of Two Bdelloid Rotifers, *Adineta Ricciae* and *Macrotrachela Quadricornifera*: Organization in a Functional and Evolutionary Perspective." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48(1): 33–39.
- Lee, Tae-Hee, and Tae-Hong Kang. 2019. "DNA Oxidation and Excision Repair Pathways." *Int J Mol Sci.* 20 (23): 6092.
- Madin, K.A.C, and J.H Crowe. 1975. *J. Exp. Zool.* 193: 335–42.
- Marotta, Roberto et al. 2010. "Dry and Survive: Morphological Changes during Anhydrobiosis in a Bdelloid Rotifer." *Journal of Structural Biology* 171(1): 11–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.04.003>.
- Mattimore, V, and J.R Battista. 1996. "Radioresistance of *Deinococcus Radiodurans*: Functions Necessary to Survive Ionizing Radiation Are Also Necessary to Survive Prolonged Desiccation." *J. Bacteriol* 178: 633–37.
- Maynard Smith, John. 1986. "Evolution: Contemplating Life without Sex." *Nature* 324(6095): 300–301.
- Moreels, Marjan et al. 2020. "Stress and Radiation Responsiveness." In *Stress Challenges and Immunity in Space*, Springer, Cham, 373–404. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16996-1_20.
- Nogrady, T., R, Wallace, and T, Snell 1993. "Biology, Ecology and Systematics." In *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*, ed. H.J.F Dumont. SPB Academic, The Hague, The Netherlands., 142.
- Panitz, C., et al. 2015 "The SPORES experiment of the EXPOSE-R mission: *Bacillus subtilis* spores in artificial meteorites." *International Journal of Astrobiology* 14(1): 105-114
- Paul de Beauchamps. "Rotifères." <https://www.universalis.fr/encyclopedie/rotiferes/> (August 19, 2021).
- Pourriot, Roger, and André-Jean Francez. 1986. "Introduction Pratique à La Systématique Des Organismes Des Eaux Continentales Françaises.- 8 : Rotifères." *Bulletin mensuel de la Société linnéenne de Lyon* 55(5): 148–76.
- Qiu, X., et al. 2006. "Transcriptome analysis as applied to survival of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to ionizing radiation." *J Bacteriol* 188:1199 –1204.
- Ricci, C., and D. Fontaneto. 2009. "The Importance of Being a Bdelloid: Ecological and Evolutionary Consequences of Dormancy." *Italian Journal of Zoology* 76(3): 240–49.
- Ricci, C. N. 1987. "Ecology of Bdelloids: How to Be Successful." *Hydrobiologia* 147: 117–27.
- Ricci, C. 1998. "Anhydrobiotic capabilities of bdelloid rotifers." *Hydrobiologia* 387/388: 321–326.
- Ricci, Claudia and Boschetti Chiara. 2003. "Bdelloid rotifers as model system to study developmental biology in space." *Adv Space Biol Med* 9: 25-39.
- Ricci, Claudia, and Umberto Fascio. 1995. "Life-History Consequences of Resource Allocation of Two Bdelloid Rotifer Species." *Hydrobiologia* 299(3): 231–39.

- Ricci, Claudia, and Giulio Melone. 2000. "Key to the Identification of the Genera of Bdelloid Rotifers." *Hydrobiologia* 418(1): 73–80.
- Ricci, Claudia, Giulio Melone, Nadia Santo, and Manuela Caprioli. 2003. "Morphological Response of a Bdelloid Rotifer to Desiccation." *Journal of Morphology* 257(2): 246–53.
- Rice, William R., and Urban Friberg. 2009. "A Graphical Approach to Lineage Selection between Clonals and Sexuals." In *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*.
- Schön, I, G Rossetti, and K Martens. 2009. "Darwinulid Ostracods: Ancient Asexual Scandals or Scandalous Gossip?" In *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis, I*, ed. and P.J. Van Dijk Schön, K. Martens. , 217–40.
- Schwander, Tanja. 2016. "Evolution: The End of an Ancient Asexual Scandal." *Current Biology* 26(6): R233–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.034>.
- Scully, R., et al. 2019. "DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(11): 698-714.
- Segers, H. 2004. "Rotifera Monogononta." In *Freshwater Invertebrates of the Malaysia Region*, ed. Yong HS Yule CM. , 106–20.
- Segers, Hendrik. 2007. "Annotated Checklist of the Rotifers (Phylum Rotifera), with Notes on Nomenclature, Taxonomy and Distribution." *Zootaxa*: 1–104.
- Senaratna T and McKersie BD. 1986. "Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: Leopold AC (ed) Membranes, metabolism, and dry organisms." *Cornell University Press*, Ithaca, pp 85-101
- Simion, Paul et al. 2021. "Chromosome-Level Genome Assembly Reveals Homologous Chromosomes and Recombination in Asexual Rotifer *Adineta Vaga*." *Science Advances* 7(41).
- Smolikova, Galina et al. 2021. "Desiccation Tolerance as the Basis of Long-Term Seed Viability." *International Journal of Molecular Sciences* 22(1): 1–24.
- Svendsen, Nils et al. 2015. "Uncovering Cryptic Asexuality in *Daphnia Magna* by RAD Sequencing." *Genetics* 201(3): 1143–55.
- Nogrady, I., Wallace, R.L, and Snell, T. 1993. "Biology, Ecology and Systematics." In *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*, ed. H.J.F Dumont. SPB Academic, The Hague, The Netherlands., 142.
- Thirsk, Robert, Andre Kuipers, Chiaki Mukai, and David Williams. 2009. "The Space-Flight Environment : The International Space." *CMAJ* 180(12): 1216–20.
- Tilton, Elvin W., and John H. Brower. 1983. "Radiation Effects on Arthropods." In *Preservation of Food by Ionizing Radiation*, eds. Edward S. Josephson and Martin S. Peterson. , 48.
- Tripathi, Rashmi, Chiara Boschetti, Brian McGee, and Alan Tunnacliffe. 2012. "Trafficking of Bdelloid Rotifer Late Embryogenesis Abundant Proteins." *Journal of Experimental Biology* 215(16): 2786–94.
- Vaiserman, Alexander, Jerry M. Cuttler, and Yehoshua Socol. 2021. "Low-Dose Ionizing Radiation as a Hormetin: Experimental Observations and Therapeutic Perspective for Age-Related Disorders." *Biogerontology* 22(2): 145–64.
- Verolet, M. 2007. "Les Rotifères, Morphologie, Anatomie et Écologie." https://www.microscopies.com/DOSSIERS/Magazine/Articles/M_Verolet-Les

Rotiferes/texte.htm.

Waggoner, B. M., and G. O. Poinar Jr. 1993. "No Title." *Experientia* 49: 354.

Wallace, R, and T, Snell. 2010. Rotifera. In : Ecology and classification of North American freshwater Invertebrates. (Eds J. Thorp), pp. 173-235. *Academic Press*.

Wright, William Douglass, Shanaya Shital Shah, and Wolf Dietrich Heyer. 2018.

"Homologous Recombination and the Repair of DNA Double-Strand Breaks." *Journal of Biological Chemistry* 293(27): 10524–35.

Zhu, J., Z. Ren, Y. Chen, and B. Hu. 2021. "The Biological Effects Induced by High-Charged and Energy Particles and Its Application in Cancer Therapy." *International Journal of Radiation Research* 14(1): 1–7.